İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROTEAZ ENZİMİNİN *BACILLUS SUBTILIS* *MEGATHERİUM* VE *BACILLUS POLYMXA* BAKTERİ TÜRLERİNDEN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI VE ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kim. Müh. Ayşe GERZE

Anabilim Dalı : KİMYA MÜHENDİSLİĞİ

Programı : KİMYA MÜHENDİSLİĞİ

MAYIS 2003

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROTEAZ ENZİMİNİN *BACILLUS SUBTILIS* *MEGATHERİUM* VE *BACILLUS POLYMXA* BAKTERİ TÜRLERİNDEN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI VE ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kim. Müh. Ayşe GERZE
(506001109)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 5 Mayıs 2003
Tezin Savunulduğu Tarih : 30 Mayıs 2003

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Yüksel AVCIBAŞI GÜVENİLİR
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN (İ.T.Ü.)
Prof. Dr. Bülent GÜRLER (İ.Ü.)

MAYIS 2003

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimin her aşamasında bana yol gösteren, kendisi ile çalışma imkanını veren, her konuda ilgisini, bilgisini ve manevi desteğini benden esirgemeyen Sayın hocam Doç.Dr.Yüksel AVCIBAŞI GÜVENİLİR'e teşekkür ederim.

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi öğretim üyesi Sayın Prof.Dr.Bülent GÜRLER'e ve Dr.Habibe ERDENİZ'e yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Tavsiyelerinden dolayı Sayın hocam Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN'e teşekkür ederim.

Sayın Yar.Doç.Dr. Hakan BERMEK'e ve Kim.Müh. Hale ÖZTÜRK'e yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarımı birlikte yaptığım çalışma arkadaşım, yakın dostum Kim.Müh. Elif ORHAN'a yardımlarından ve manevi desteğinden dolayı teşekkür ederim.

Laboratuarımı paylaştığım sevgili arkadaşım Kim. Müh. Sevda KARAKAŞ'a, Yük.Kimyager Emel ERGÜN'e, Kim.Müh. Cem AKDERE'ye, İnş.Müh. Zekai AYSAN'a ve her zaman yanımda olan Sayın Şenel KARANCI'ya teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında her türlü desteği, sevgiyi ve hoşgörüyü gösteren sevgili aileme teşekkür ederim.

Mayıs 2003 Ayşe Gerze

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ **ii**

KISALTMALAR **vii**

TABLO LİSTESİ **viii**

ŞEKİL LİSTESİ **ix**

ÖZET **x**

SUMMARY **xi**

1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**

2. ENZİMLER VE GENEL ÖZELLİKLERİ **3**

2.1. Enzimlerin Tarihçesi 3

2.2. Enzimlerin Kullanım Alanları 4

2.3. Enzimlerin Yapısı 4

2.4. Enzimlerin Sınıflandırılması 5

2.5. Enzim Mekanizması 6

2.5.1. Anahtar Kilit Modeli 6

2.5.2. Aktif Site Modeli 6

2.6. Enzim Saflaştırılması 8

2.6.1. Boyut ve Kütleye Bağlı Yöntemler 8

2.6.1.1. Santrifüj 8

2.6.1.2. Jel Filtrasyonu 9

2.6.1.3. Diyaliz ve Ultrafiltrasyon 9

2.6.2. Yüke Bağlı Yöntemler 9

2.6.2.1. İyon Değiştirme Kromatografisi 9

2.6.2.2. İzoelektrik Odaklaşma 10
2.6.3. Çözünürlükteki Değişime Dayanan Yöntemler 10
2.6.3.1. pH Değerindeki Değişim 10
2.6.3.2. İyonik Kuvvetteki Değişim 10
2.7. Enzim İzolasyon Kaynakları 10
2.7.1. Hayvan Organları 11
2.7.2. Bitkiler 11
2.7.3. Mikroorganizmalar 11
3. PROTEAZ ENZİMİ VE ÖZELLİKLERİ 12
3.1. Proteaz Enziminin Yapısı 12
3.2. Proteaz Enziminin Sınıflandırılması 13
3.2.1. Endo Proteazlar 13
3.2.1.1. Serin Proteazlar 13
3.2.1.2. Sistein Proteazlar 13
3.2.1.3. Aspartil Proteazlar 14
3.2.1.4. Metallo Proteazlar 14
3.2.2. Ekzo Proteazlar 15
3.2.2.1. Amino Proteazlar 15
3.2.2.2. Karboksi Proteazlar 15
3.3. Proteaz Enziminin Kullanım Alanları 15
3.3.1. Deri Sanayi 16
3.3.2. Tekstil Sanayi 17
3.3.3. İlaç Sanayi 17
3.3.4. Bakım Ürünleri 17
3.3.5. Klinik Çalışmalar 17
3.3.6. Deterjan Sanayi 17

3.4. Bakterilerden Proteaz Enzimi Eldesi ve Saflaştırılması ile İlgili Yapılan Çalışmalar 19

4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR 21

4.1. Malzeme ve Metod 21

4.1.1. Malzeme 21

4.1.1.1. Tamponlar ve Çözeltiler 23

4.1.2. Metod 25

4.1.2.1. Santrifüjleme 25

4.1.2.2. Doyurma 26

4.1.2.3. Diyaliz 26

4.1.2.4. İyon Değiştirme Kromatografisi 26

4.1.2.5. SDS-PAGE 27

4.2. *Bacillus* Türlerinden Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması 27

4.2.1. *Bacillus* Türü Bakterilerin Genel Özellikleri 27

4.2.2. Besiyeri Hazırlanması ve Ekim İşlemi 28

4.2.3. Amonyum Sülfat ile Doyurma 29

4.2.4. Diyaliz 30

4.2.5. İyon Değiştirme Kromatografisi 31

4.2.6. Aktivite Tayini 31

4.2.6.1. Aktivite Tayin Yöntemi A 31

4.2.6.2. Aktivite Tayin Yöntemi B 32

4.2.7. Protein Tayini 32

4.2.8. Aktivite ve Spesifik Aktivite Hesabı 33

4.3. *Bacillus subtilis megatherium* Çalışmaları 35

4.3.1. Çalışma 1 35

4.3.2. Çalışma 2 37

4.3.3. Çalışma 3 41

4.4. *Bacillus polymxa* Çalışması 43

4.5. Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması 47

4.6. *Bacillus subtilis megatherium* ve *Bacillus polymxa* Türlerinden Elde Edilen Proteaz Enziminin Bazı Özelliklerinin İncelenmesi 48

4.6.1. Enzim Aktivitesi Üzerine pH Etkisi 48

4.6.1.1. Optimum pH 48

4.6.1.2. pH Kararlılığı 51

4.6.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi 54

4.6.2.1. Optimum Sıcaklık 54

4.6.2.2. Sıcaklık Kararlılığı 57

4.6.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi 59

4.6.3.1. Aktivatör Etkisi 60

4.6.3.2. İnhibitör Etkisi 61

4.6.4. Reaksiyon Süresinin ve Substrat Konsantrasyonunu Etkisi 62

4.6.5. Molekül Ağırlığı Tayini 63

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER **66**

KAYNAKLAR **70**

EKLER **72**

ÖZGEÇMİŞ **75**

KISALTMALAR

SDS-PAGE	**:** Sodyumdodasilsülfat-poliakrilamid jel elektroforez
DEAE	**:** Dietilaminoetil
CM	**:** Karboksimetil
ATP	**:** Adenintrifosfat
EDTA	**:** Etilendiamintetraasetik asit
NTA	**:** Nitrilotriasetik asit
BCA	**:** 2,2-Biçinolil 4,4-dikarbonik asit
APS	**:** Amonyum persülfat
BSA	**:** Bovin serum albümin
TEMED	**:** N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
TCA	**:** Trikloroasetikasit
BSM	**:** *Bacillus Subtilis megatherium*
BP	**:** *Bacillus polymxa*
kDa	**:** Kilodalton
U	**:** Ünite

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.1. *Bacillus subtilis megatherium* türü için spesifik aktivite-zaman değerleri (Çalışma 1)……. 36
Tablo 4.2. *Bacillus subtilis megatherium* türü için spesifik aktivite-zaman değerleri (Çalışma 2)…….. 39
Tablo 4.3. *Bacillus subtilis megatherium* türünden elde edilen proteaz enziminin kısmi saflaştırılması (Çalışma 2)……... 40
Tablo 4.4. *Bacillus Subtilis megatherium* türünden elde edilen proteaz enziminin kısmi saflaştırılması (Çalışma 3)……... 42
Tablo 4.5. *Bacillus polymxa* türünden elde edilen proteaz enziminin kısmi saflaştırılması……..... 44
Tablo 4.6. İyon değiştirme kromatografisi değerleri (*Bacillus polymxa* türü)…… 45
Tablo 4.7. Aktivite tayin yöntemi karşılaştırma değerleri (*Bacillus subtilis megatherium*)…… 47
Tablo 4.8. Aktivite tayin yöntemi karşılaştırma değerleri (*Bacillus polymxa)*..... 47
Tablo 4.9. Optimum pH (*Bacillus subtilis megatherium* türü)…… 49
Tablo 4.10. Optimum pH (*Bacillus polymxa* türü)…… 50
Tablo 4.11. pH kararlılığı (*Bacillus subtilis megatherium* türü)……... 52
Tablo 4.12. pH kararlılığı (*Bacillus polymxa* türü)……... 53
Tablo 4.13. Optimum sıcaklık (*Bacillus subtilis megatherium* türü)…… 55
Tablo 4.14. Optimum sıcaklık (*Bacillus polymxa* türü)…… 56
Tablo 4.15. Sıcaklık kararlılığı (*Bacillus subtilis megatherium* türü)…….. 58
Tablo 4.16. Sıcaklık kararlılığı (*Bacillus polymxa* türü)……... 59
Tablo 4.17. Aktivatör etkisi (*Bacillus subtilis megatherium* türü)…… 60
Tablo 4.18. Aktivatör etkisi (*Bacillus polymxa* türü)…… 61
Tablo 4.19. İnhibitör etkisi (*Bacillus subtilis megatherium* türü)…… 61
Tablo 4.20. İnhibitör etkisi (*Bacillus polymxa* türü)……. 62
Tablo 4.21. Reaksiyon süresinin ve substrat konsantrasyonunun etkisi (*Bacillus subtilis megatherium* türü)…….. 62
Tablo 4.22. Reaksiyon süresinin ve substrat konsantrasyonunun etkisi (*Bacillus polymxa* türü)…….. 63

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 4.1.	*Bacillus* türlerinden proteaz enzimi saflaştırma işlemleri……....	34
Şekil 4.2.	*Bacillus subtilis megatherium* türünün spesifik aktivite-zaman eğrisi(Çalışma 1)……	36
Şekil 4.3.	*Bacillus subtilis megatherium* türü için spesifik aktivite-zaman eğrisi(Çalışma 2)……	38
Şekil 4.4.	İyon değiştirme kromatografisi spesifik aktivite-protein-fraksiyon değerleri……..	46
Şekil 4.5.	Optimum pH (*Bacillus subtilis megatherium* türü)……	49
Şekil 4.6.	Optimum pH (*Bacillus polymxa* türü)……...	50
Şekil 4.7.	pH kararlılığı (*Bacillus subtilis megatherium* türü)……...	52
Şekil 4.8.	pH kararlılığı (*Bacillus polymxa* türü)……..	53
Şekil 4.9.	Optimum sıcaklık (*Bacillus subtilis megatherium* türü)……	55
Şekil 4.10.	Optimum sıcaklık (*Bacillus polymxa* türü)……...	56
Şekil 4.11.	Sıcaklık kararlılığı (*Bacillus subtilis megatherium* türü)……..	58
Şekil 4.12.	Sıcaklık kararlılığı (*Bacillus polymxa* türü)……..	59
Şekil 4.13.	SDS-PAGE ile molekül ağırlığı tayini……...	65
Şekil A.1.	Trosin standart eğrisi……..	72
Şekil A.2.	BSA standart eğrisi (280 nm)…….	73
Şekil A.3.	BSA standart eğrisi (BCA Yöntemi)……..	74

PROTEAZ ENZİMİNİN *BACILLUS SUBTİLİS MEGATHERİUM* VE *BACILLUS POLYMXA* BAKTERİ TÜRLERİNDEN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI VE ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Enzimler yaşayan canlılar tarafında üretilen, biyolojik olarak önemli reaksiyonları katalizleyen, proteinler gibi birbirlerine peptit bağlarıyla bağlı uzun aminoasit zincirlerinden oluşan makromoleküllerdir.

Bir enzim üzerinde çalışılmak isteniyor ise öncelikle enzimin kaynağının belirlenmesi ve oradan izole edilip saflaştırılması gerekmektedir. Endüstriyel ve akademik anlamda enzim saflaştırılması için kullanılan ölçekler çoğunlukla aynıdır.

Proteaz , polipeptit ve protein zincirlerini hidrolizleyen bir enzimdir. Ticari olarak deterjan, gıda, ilaç,deri endüstrilerinde çok sık kullanılmaktadır. Endüstriyel olarak kullanılan bu enzimlerin %60' ını mikroorganizma kaynaklı olanları oluşturmaktadır.

Bu çalışmanın amacı proteaz enziminin *Bacillus subtilis megatherium* ve *Bacillus polymxa* bakteri türlerinden kısmi saflaştırılması ve özelliklerinin incelenmesidir.

Enzim ilk olarak çeşitli üreme ve sporlanma koşullarında üretilmiştir. Saflaştırma aşamaları olarak amonyum sülfat ile doyurma, diyaliz ve DEAE-Sefaroz iyon değiştirme kromatografisi uygulanmıştır.

Bacillus subtilis megatherium türü için yapılan saflaştırma işlemlerinde ham homojenatın spesifik aktivitesi 10.5 U/mg olup %80'lik doyurma sonrası çözeltinin spesifik aktivitesi 13.1 U/mg olarak hesaplanmıştır. Çözelti kısmına göre doyurma sonrası 1.3 kat saflaştırma sağlanmıştır.

Bacillus polymxa türü için çalışmalarda ham homojenatın spesifik aktivitesi 15.9 U/mg, %80 doyurma sonrası spesifik aktivite 30.3 U/mg, kolon uygulaması sonunda 161.4 U/mg olarak hesaplanmıştır. Ham homojenata göre yaklaşık 10 kat saflaştırma gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarda ayrıca *Bacillus subtilis megatherium* ve *Bacillus Polymxa* türünden elde edilen proteaz enziminin optimum pH, optimum sıcaklık, pH kararlılığı, sıcaklık kararlılığı gibi özellikleri; aktivite üzerine aktivatör ve inhibitör etkisi, reaksiyon süresi ve substrat etkisi incelenmiş ve molekül ağırlığı tayini yapılmıştır.

PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF PROTEASE FROM *BACILLUS SUBTILIS MEGATHERIUM* AND *BACILLUS POLYMXA*

SUMMARY

The enzymes, which can catalyze the reactions that are biological important, are produced by living cells. The enzymes , which are combined by the peptide chains like the proteins, are macromolecules that have long amino acide chains.

If we want to study a particular enzimatic reaction, the first thing we need to do is to find a source of the enzyme and purify it. The same techniques are used for enzyme purification in the industrial and academic fields.

Protease is an enzyme which specifically hydrolyze the polypeptide and protein bonds . Proteases have wide applications in detergent, tanning, dairy, drug and food industries. The bacterial proteases are the most significant segment, representing, 60% of the total industrial proteases.

The purpose of this study is the partial purification of protease from *Bacillus subtilis megatherium* and *Bacillus polymxa* which are the sources of bacteria, and to determine its characteristics.

The first step of this study is the determination of the growth and sporulation conditions. The protease was purified in a procedure involving ammonium sulphate precipitation, DEAE-Sepharose ionic exchange chromatography.

In the study of *Bacillus subtilis megatherium* species, the specific activity of crude extract is 10.5 U/mg, the specific activity of the solution after 80% ammonium sulphate fraction is 13.1 U/mg then the purification fold is 1.3.

In the study of *Bacillus polymxa* species, the specific activity of crude extract is 15.9 U/mg, the specific activity of the precipitate after 80% ammonium sulphate fraction is 30.3 U/mg, after DEAE-Sepharose ionic exchange chromatography, the specific activity increased up to 161.4 U/mg, and the purification fold is 10.

Some parameters of the partially purified protease enzyme obtained from *Bacillus subtilis megatherium* and *Bacillus polymxa* bacteria species. These are optimum temperature, temperature stability, optimum pH , pH stability, molecular weight, effects of reaction time and substrate concentration on enzyme activity.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Enzimler yaşayan canlılar tarafından üretilen biyolojik katalizörlerdir ve bir dokuda gerçekleşen bir reaksiyonun hızını arttırırlar [1].

Enzimlerin katalitik aktiviteleri, canlı organizmaların kimyasal reaksiyonlarında (metabolizmada) hayati önem taşımaktadır. Benzer koşullar altında, bir enzim reaksiyonunun oranı, katalizörün yokluğundaki reaksiyon oranına göre bir milyon veya birkaç milyon kat daha yüksek olabilir. Çok etkin bir enzim örneği olarak, pH 8'de ve 20°C'nin altında üre hidroliz oranını yaklaşık 10^{14} kat arttıran (üre) üreaz verilebilir [2].

Enzimler klasik kimyasal katalizörlerden, kararlılık ve seçicilik konularında farklılık gösterirler. Enzimler, fiziksel ve kimyasal parametrelerin dar bir aralığında kararlı iken, kimyasal katalizörler çok daha geniş bir aralıkta kararlıdır. Yüksek aktivite sağlanması konusunda bir karşılaştırma yapıldığında enzimler, kimyasal katalizörlere göre daha avantajlıdır. Örneğin , enzim prosesi için uygun olan 25-30°C' lik sıcaklık bir çok klasik kimyasal proses için gerekli olan çok yüksek veya çok düşük sıcaklıklardan daha ekonomiktir. İkinci özellik dikkate alındığında, yani seçicilik, enzimler, kimyasal katalizörler üzerinde üstünlüğe sahiptir. Bunun sebebi de organik reaksiyonlarda farklı biyokatalizör biçimlerinin daha fazla kullanılmasıdır [2].

Bir enzim üzerinde çalışılmak isteniyor ise öncelikle enzimin kaynağının belirlenmesi ve oradan izole edilip saflaştırılması gerekmektedir [3]. Endüstriyel ve akademik anlamda enzim saflaştırılması için kullanılan ölçekler çoğunlukla aynıdır. Fakat saflaştırılan enzimin kullanım alanına göre farklılık göstermektedir. Gıda sanayinde ve deterjan sanayinde genellikle çok miktarda ve düşük saflıkta enzimler tercih edilirken klinik teşhis ve ilişkili alanlarda az miktarda ve yüksek saflıkta enzimler tercih edilmektedir. Bu saflık derecelendirmesi ve miktarları çeşitli maliyetleri de beraberinde getirmektedir. Genelde endüstriyel düzeyde büyük miktarlarda düşük saflıkta kullanılan enzimler düşük fiyatlara sahip iken, analitik ve

tıbbi alanlarda kullanılan az miktarda ve yüksek saflıktaki enzimler yüksek maliyetler getirmektedir [4].

Şimdi bir çok firma, araştırma amacı için yüksek saflıktaki enzimleri üretmektedir. Bunlar sanayi amaçlı toplam enzim üretiminin sadece küçük bir miktarına karşılık gelseler de, talep kesinlikle artacaktır ve bunlar ticari öneme sahip olan enzimler olarak sınıflandırılabilecekler ve böylece gerekli ilgiye sahip olabileceklerdir [5].

Enzimler genellikle üç kaynaktan elde edilmektedirler. Bunlar bitkiler, hayvan organları ve bakterilerdir. Endüstriyel proseslerde kullanılan saflaştırılmış enzimlerin %90'ı bakteri kaynaklıdır. Enzim üretimi için kullanılan bakterilerin optimum olarak uygun yetiştirme koşullarının belirlenmesi gerekmektedir. Geçen 15 yıl boyunca, kısmen ticari olarak faydalı enzimlerin keşfedilmesi ve bu enzimlerin gelişme koşullarındaki verimini artırmak için ve kısmen de hücre dışı enzimlerinin protein sentezlerinde yer alan etkileri üzerinde çalışmak için önemli avantajlar sundukları için, bakteriler tarafından üretilen hücre dışı enzimlerin araştırılmasına önemli çabalar harcanmıştır. Farklı türlerden veya sınıflardan benzer işlevli enzimler arasındaki farklılıklara kayıtsız kalarak, ayırıcı spesifikliğe sahip olan 70'in üzerinde enzim, mikrobik gelişmenin hücre dışı ürünleri olarak tarif edilmektedir [5].

Proteazlar sanayide kullanım alanı çok geniş olan ve bakterilerden üretilmiş olanları endüstriyel anlamda çok fazla tercih edilen enzimlerdir. Bunun göstergesi ise bakteri kaynaklı proteazların toplam sanayi proteazlarının %60'lık dilimini oluşturuyor olmasıdır [2,6].

Proteaz üretiminde en çok kullanılan bakteri türü ise *Bacillus* türleridir [7].

Gerçekleştirilen bu çalışmada amaç, proteaz enziminin *Bacillus subtilis megatherium* ve *Bacillus polymxa* türlerinden üretip kısmi saflaştırılmasını sağlayıp sonrasında bazı özelliklerini ve aktivitesi üzerine etki eden faktörleri incelemektir.

2. ENZİMLER VE GENEL ÖZELLİKLERİ

Enzimler canlı organizmada oluşan bütün reaksiyonların ılımlı koşullarda oluşmasını sağlayan protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin olmadığı bir ortamda biyokimyasal dönüşümlerin bir çoğu gerçekleşemez veya gerçekleşmeleri çok uzun zaman alır. Bu sebepten enzimler canlılığın devamı için gerekli en temel ögedir [8].

2.1. Enzimlerin Tarihçesi

Enzim kavramı ilk kez 'maya' anlamında KÜHNE tarafından 1876 tarihinde ortaya atılmıştır. Maya fermentasyondaki bilinen öneminden dolayı araştırmaların en önemli konusuydu. Bununla birlikte hücre dışı enzimlerin varlığı bilinmekteydi. 1783 yılında SPALLANZANI, yapay olarak oluşturulmuş mide suyunun eti sindirebileceğini ortaya koymuştur ve SCHWANN 1836 yılında aktif madde pepsini isimlendirmiştir. 19. yy başlarında KÜHNE'nin Tripsin'e şimdiki adını vermiş olduğu düşünülmektedir. 20. yüzyılın başında, enzimlerin protein özellikleri ortaya konmuştur. Proteinlerin kimyasının bilinmesi, 19. yüzyılın ikinci yarısındaki organik kimya teknik ve kavramları üzerinde önemli etkiler yapmıştır. Bu olay, protein yapısının peptit kuramına yol açmış ve genel olarak FISCHER ve HOFMIESTER'e ait olduğu varsayılmıştır. Bununla birlikte, enzimlerin protein olduğu hakkında hiçbir görüş birliği söz konusu değildir. Daha sonra, 1926 yılında, SUMNER, üreazı bezelyegillerden kristal hale getirmiş ve bunun basit bir protein olduğunu açıklamıştır. Buna karşı, WILLSTATTER, enzimlerin protein olmadığını ancak "aktif prostatik gruplu" koloidimsi taşıyıcılar olduğunu ileri sürmüştür. Ancak, 1930 yılında pepsin ile başlayarak, kristal proteolitik enzimlerin serilerini izole etmiş olan NORTHROP ve meslektaşları tarafından yapılan kesinleştirici çalışmayla birlikte, enzimlerin protein yapıları ortaya konmuştur. Hücre içi enzimlerin izolasyonu ve karakterize edilmesi, doğal olarak daha karmaşık idi ve 1940'lı yılların sonlarında, proteinlere uygulanabilen ayırma tekniklerinde önemli iyileştirmelere gerek duyulmuştur. Erişilebilen başlatma malzemesinin büyük miktarları ve fermantasyon

deneylerinin tarihi önemi nedeniyle, ilk saf hücre içi enzimleri, mayadan ve iskelet kasından elde edilmiştir. Bununla birlikte saflaştırma yöntemleri iyileştirildikçe, saf halde elde edilen birçok enzimin sayısı aşırı derecede artış göstermiştir ve halen büyümeye devam etmektedir. Protein saflaştırması yöntemleri bugün öylesine karmaşıktır ki, eğer kaynak zayıf ise sadece küçük miktarların elde edilebilecek olmasına rağmen, yeterli çaba ile, her türlü istenen enzim tamamen saf hale getirilebilir [9].

2.2. Enzimlerin Kullanım Alanları

Enzimlerin endüstriyel kullanım alanları oldukça geniştir. Bazı yaygın kullanım proseslerini şöyle sıralamamız mümkündür. Nişastayı şekere indirgeyerek alkol üretiminde, biranın daha hızlı olgunlaşmasında ve soğuğa karşı dayanıklılığında, peynir yapımı sırasında sütteki laktozun uzaklaştırılmasında, nişasta ve yağları parçalamak amacı ile katkı maddesi olarak deterjan sanayinde, özel yağların sentezlerinde, deri sanayinde postların ıslatılmasında ve tüylerinin dökülmesinde, kot pantolon taşlanmasında , dekstroz fruktoz ve özel şurup üretiminde vb. [10].

2.3. Enzimlerin Yapısı

Birçok enzim katalizör işlevleri için, protein kısmına ek olarak protein olmayan bileşenler de içermektedirler. Bu yardımcı grup maddeler prostatik grup, kofaktör veya koenzim olarak adlandırılırlar.

Prostatik grup, proteine bağlı, aminoasit olmayan ve enzime belli özellikler kazandıran gruptur.

Kofaktörler, kataliz için gerekli küçük organik moleküllerdir.

Bazı enzimler kofaktör olarak inorganik anyon veya katyona gereksinirler. Koenzim terimi ise bir enzimin aktivitesi için gerekli olan ve sıklıkla bir vitaminden türeyen organik moleküllerdir. Bazı koenzimler enzimin protein kısmına çok sıkı bağlıdırlar ve proteinden uzaklaştırılmaya çalışılmaları proteinin bozunmasına sebep olur. Bazı durumlarda ise koenzim protein kısmına o kadar gevşek bağlıdır ki proteinden basit diyalizle ayrılır.

Bir enzimin işlevi için gerekli tüm yardımcı faktörleri içeren biçimi, haloenzim, kofaktörlerini kaybetmiş yalnızca protein kısmını içeren kısmı ise apoenzim olarak adlandırılmaktadır.

Enzimlerin apoenzim kısımları büyük protein moleküllerinden oluşmuştur. Amino asit türleri ve dizilişleri bakımından apoenzimlerin yapıları enzimden enzime farklılık göstermektedir. Bu sebepten enzimin özelliğini ve spesifikliğini sağlayan kısım apoenzimdir. Enzimlerin makromoleküller olmasının sebebi de apoenzim kısmının protein yapısındandır [1].

2.4. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzim terminolojisi ve sınıflandırılması için 1961 yılındaki ilk Enzim Komisyonun raporuna göre,enzimler, katalizörlük yapılan tepkimenin tipine göre altı ana sınıfına ayrılmıştır. Her bir enzim belli bir sınıfa, alt sınıfa ve alt sınıfın alt sınıfına bölünürler ve buna ve alt alt gruplardaki sırasına bağlı olarak, dört rakamlı bir sınıflandırma kodu (EC numarası) her bir özel enzime verilmektedir.

1.) Oksidoredüktazlar: Bu sınıf, redoks tepkimelerini katalize eden tüm enzimleri içine alır. Önerilen adı dehidrogenazdır ancak redüktaz da kullanılabilir. Oksidaz, sadece oksijenin indirgeme için kabul edici olduğunda, kullanılır.

2.) Transferazlar: Transferazlar, metil, açil, amino, glikozil veya fosfat gibi belirli bir grubun bir maddeden diğerine transferini katalize eder. Normal olarak tavsiye edilen adı grup-transferazlar veya verici gruptransferazdır.

3.) Hidrolazlar: Hidrolazlar, ester, peptid, eter, glikoz, asitanhidrit, C-O, C-N, C-C bağlarını hidroliz ederler. Önerilen ismi genel olarak sadece –az son eki olan substrat adından oluşur. Sistematik adı her zaman hidrolaz içerir. Alt grupları şunlardır:

- Proteazlar: Protein ve peptitlerin hidrolizini katalizlerler.
- Esteraz ve Lipazlar: Ester ya da lipidleri asit veya alkole hidroliz ederler.
- Karbohidrazlar: Şekerler ya da şekerlerle alkoller arasındaki glikozid bağlarını hidrolizlerler.
- Fosfatazlar: Fosforik asit-ester ve anhidritleri hidroliz ederler.
- Amilazlar: Çeşitli amid ve peptid bağlarını hidroliz ederler.

4.) Liyazlar: Susuz ortamdaki grupların uzaklaştırılmasını katalizlerler. Dekarboksilaz, aldolaz ve dehidrataz gibi isimleri ardır.

5.) İzomerazlar: Izomerazlar, bir molekül içinde geometrik veya yapısal yeniden ayarlamaları katalize eder.

6.) Ligazlar: Ligazlar, ATP veya diğer nükleosit trifosfat içindeki pirofosfatın hidrolizi ile eşleşmiş olan iki molekülün birleşmesini katalize eder.

2.5. Enzim Mekanizması

2.5.1. Anahtar-Kilit Modeli

Enzimler kimyasal katalizörlerle aynı sistemde çalışırlar. Bir katalizör reaktanla onu aktive etmek amacıyla bağlanır. Enzimatik reaksiyonlarda reaktan substrat(S) olarak isimlendirilmektedir. Reaksiyon sırasında enzim ve substrat, enzim-substrat kompleksini (ES) oluştururlar. Bu kompleks, ürün ortaya çıkarmak ve kullanılan enzimi tekrar geri kazanmak üzere bir enzim-ürün kompleksi (ER) oluşturmak için bir kimyasal değişime uğrarlar.

$E + S \leftrightarrow ES$ (enzim substrat kompleksi)

$ES \rightarrow ER$ (enzim ürün kompleksi)

$ER \rightarrow E + R$

Enzim substrat arası etkileşimler genellikle iyon-iyon, iyon-dipol etkileşimler, hidrojen bağları gibi non-kovalent kuvvetleri içerirler. Bununla birlikte enzim ve substrat arasında kovalent bağların oluştuğu durumlar da mevcuttur. Aralarındaki bağlar ne çeşit olursa olsun sonunda ürün ve enzimi açığa çıkartacak kadar zayıf olmalıdırlar [10].

2.5.2. Aktif Site Modeli

Enzimlerin katalitik özellikleri yapısının tamamından ileri gelmez. Katalitik aktiviteden sorumlu olan enzim üçüncü zaman yapısının parçası, enzimin "aktif sitesi" olarak adlandırılan kısmıdır. Genel olarak enzimin toplam hacminin sadece % 10-20' sini oluşturmaktadır [3].

Enzimlerin substrat seçimlerinde çok özel olmaları ve genel olarak, üzerinde hareket ettikleri substrattan daha geniş oldukları çabucak ortaya çıkmıştır. Enzim

reaksiyonlarının en önceki kinetik analizi, bir enzimin-substrat kompleksi, geçici oluşumuna işaret etmiştir. Bu gözlemler, substratın bir ürüne dönüşümünün bir enzim molekülü üzerindeki sınırlı bir sitede meydana geldiği varsayılırsa, kolay bir şekilde açıklanabilmektedir. Bu site daha sonra "aktif merkez" olarak veya bugün daha da genel olarak "aktif site" olarak adlandırılmaktadır [9].

Aktif site genel olarak, substratı bağlayan ve enzim reaksiyonunu yerine getiren aminoasit yan zincirlerinin bir sırasını içeren bir hidrofil aralığıdır. Bazı durumlarda enzim aktif sitesi, enzim reaksiyonlarının özel tiplerinin katalizörlüğünde yardımcı olan bir veya daha fazla kofaktörleri bağlar [3].

Enzim katalizörlüğünün önemli özelliklerinden bir tanesi, onun yüksek substrat seçiciliğidir. Aktif site, üç boyutlu yapıda olmasından dolayı , bir eldiven içine elin sığması gibi, substratı bağlayabilmektedir. Aşağıda enzimler tarafından yararlanılmakta olan enzim-substrat etkileşimlerinin dört tipi verilmektedir**.**

a) Elektrostatik Etkileşimler : pH 7 veya onun civarında sulu çözeltiler içinde yüklü olan iyonize edilebilen fonksiyonel grupları içeren substratlar, enzim aktif sitesindeki zıt yüklü aminoasit yan zincirlerine elektrostatik etkileşimler yoluyla bağlanmaktadır.

b) Hidrojen Bağlama : Hidrojen bağları, elektronların tek bir çiftini içeren bir hidrojen bağı vericisi ile bir asidik hidrojen içeren bir hidrojen bağı alıcısı arasında oluşturulabilir. Bu etkileşimler polar substrat fonksiyonel gruplarının bağlanması için geniş ölçüde kullanılmaktadır. Hidrojen bağının gücü, etkileşen grupların kimyasal yapısı ve geometrik hizalanmasına bağlıdır.

c) Polar Olmayan (Van der Waals) Etkileşimler : Van der Waals etkileşimleri, substrat ve aktif site arasındaki atomlar arası temaslardan meydana gelmektedir. Aktif sitenin şekli genel olarak, substratın şekline büyük oranda tamamlayıcı olduğundan dolayı, Van der Waals etkileşimlerinin miktarı, her bir etkileşimin çok zayıf olmasına rağmen, oldukça önemli olabilir.

d) Hidrofobik Etkileşimler: Eğer substrat bir hidrofobik grup veya yüzey içeriyorsa, bu durumda, eğer bu, enzim aktif sitesinin hidrofobik tarafına bağlandıysa, uygun bağlama etkileşimleri gerçekleştirilebilir. Bu hidrofobik etkileşimler, sulu çözelti içinde kalmaktan ziyade polar olmayan çözücü içine toplanma ve biriktirmek için hidrofobik organik moleküllerin eğilimleri yönünden

göz önüne serilebilirler. Bu toplama ve biriktirme süreçleri, enerji olarak, hidrofobik moleküller tarafından başka türlü bozulacak olan su hidrojen bağı arası şebekelerinin maksimizasyonu nedeniyle, uygundur [3].

2.6. Enzim Saflaştırılması

Saflaştırma işlemlerinin amacı, istenilen enzimin en iyi verimle elde etmektir. Enzim verimi ise, elde edilen enzim aktivitesi ile ham homojenatın toplam aktivitesi arasında yapılan yüzde oranı ile belirlenmektedir. Ayrıca elde edilen enzim maksimum katalitik aktiviteye sahip olmalı yani içerisinde bozunmuş veya inaktif olmuş başka enzimler bulunmamalıdır. Elde edilmiş enzimin katalitik aktivitesi, substratın yok olma oranının veya ürünün oluşma oranının, substrat konsantrasyonu, ısı, pH vb. koşullar kapsamında belirlendiği uygun bir deneysel yöntemle belirlenmektedir. Aktivite üniteleri genel olarak, dakikada tüketilen µmol cinsinden substrat olarak veya dakikada oluşan ürün olarak ifade edilebildiği gibi, saniye başına harcanan substrat molü veya oluşan ürüne(SI sisteminde katal) göre ifade edilmektedir. Belli koşullar kapsamında saflaştırılmış bir enzimin katalitik aktivitesini belirlemek kolay değildir. Bu sebepten saflaştırma, elde edilen enzimin spesifik aktivitesinin, daha fazla saflaştırma adımları ile artırılmayan sabit bir değere erişinceye kadar devam ettirilir [8].

Proteinin mg/ml cinsiden, klorimetrik deneylerden faydalanılarak konsantrasyonu ölçülebilir. Enzim aktivitesinin protein konsantrasyonlarına olan oranı (U/mg), enzimin spesifik aktivitesi olarak bilinmekte olup bu enzimin saflığının bir ölçüsüdür [3].

Enzim ayırma ve saflaştırma yöntemleri enzimlerin büyüklük, kütle, yük, çözünürlük gibi özelliklerine göre belirlenmektedir [8].

2.6.1. Boyut veya Kütleye Bağlı Yöntemler

2.6.1.1. Santrifüj

Enzimler gibi büyük moleküller ultrasantrifüj tarafından yaratılan (300000 kat yer çekimi) yüksek santrifüj alanları tarafından çökeltilebilir. Herhangi bir özel enzimin çökeceği oranın molekülün boyutu, şekli ve çözeltinin viskozitesi gibi bir çok etkene bağlı olsa da, görüldüğüne göre molekül ağırlığı yüksek oldukça çökelme oranı da

yüksektir. Küçük hacimlerin, yüksek santrifüj alanlarında faaliyet gösteren ultrasantrifüjlerde işleme tabii tutulabilmesinden dolayı, bu yöntem, bir enzimden diğerini ayırmak için, saflaştırma işlemlerinde geniş şekilde kullanılmaz.

2.6.1.2. Jel Filtrasyonu

Jel filtrasyonunda, farklı boyutlardaki moleküller arasındaki ayrım, bunların tanecikli jelin içindeki gözeneklere girebilme yeteneklerine bağlı olarak yapılmaktadır. Jelin en geniş kullanılan tipleri Sefadeks (çapraz bağlı dekstranlar) ve Bio-Gel P (Akril amidin çapraz bağlı polimerleri)'dir. Taneciklerin gözeneklerine girebilen küçük moleküller, jel içeren bir kolondan geçerken, tutulur. Gözeneklerden geçemeyecek olan büyük moleküller kolondan geçmektedir. Gözeneklerin boyutlarını değiştirerek (tanecikli jelin hazır maddesinde çapraz bağlantı derecesi ile kontrol edilen), parçalara bölünebilen molekül ağırlıklarının yelpazesinin değiştirmek mümkündür.

2.6.1.3. Diyaliz ve Ultrafiltrasyon

Selofan gibi bir diyaliz membranı, 20000 molekül ağırlığına kadar küresel proteinlerin geçişine izin verecek kadar geniş delikli bir elek gibi davranır. Çeşitli mekanik ve kimyasal işlemlerle tanecik boyutlarını değiştirmek olasıdır. Diyalizin genel olarak, enzimlerin birbirlerinden ayrılması için faydalı değildir. Tuzları, organik çözücüleri veya düşük molekül ağırlıklı önleyicileri enzim solüsyonlarından çıkarmak için saflaştırma prosedürleri sırasında geniş ölçüde kullanılmaktadır.

2.6.2. Yüke Bağlı Yöntemler

2.6.2.1. İyon Değiştirme Kromatografisi

İyon değiştirme kromatografisi zıt yüklü türler arasındaki elektrostatik çekime bağlıdır. İyon değiştirici olarak genel olarak, DEAE-selüloz ve CM-selüloz örneklerinde gösterildiği gibi, selüloz, sefadeks vb. gibi bazı destek malzemesinin değişime uğratılmış türevlerinden oluşmaktadır.

İyon değiştirme kromatografisi, geniş veya küçük bir ölçekte yerine getirilebilir. Geniş bir ölçekte de, yığın halinde çalışmak genellikle uygundur. Örneğin, bir iyon değiştirici ekleyerek enzimin yüzeyde yoğun şekilde toplanması ve daha sonra bir iyonik kuvvet gradyeni kullanarak kontrollü desorpsiyonu için bir kolon malzemenin

dökülmesi. Küçük bir ölçekte hem adsorpsiyon ve desorpsiyon bir kolonda yerine getirilir.

2.6.2.2. İzoelektrik Odaklaşma

İzoelektrik odaklaşma, yüklü parçacıkların bir pH gradyeni içerisinde dengeye gelme prensibine dayanmaktadır. Bir bileşiğin izoelektrik noktası, net yük taşımayıp uygulanan potansiyel farkına rağmen hareketsiz kaldığı noktadır.

2.6.3. Çözünürlükteki Değişime Dayanan Yöntemler

2.6.3.1. pH Değerindeki Değişim

Enzim, pH değerinin izoelektrik noktasına ayarlanması ile çöktürülmektedir. İstenmeyen proteinleri de bu yöntemle uzaklaştırma imkanı da vardır.

2.6.3.2. İyonik Kuvvetteki Değişim

Çeşitli organik çözücüler, metal iyonları, tuzlar vb. ilavesi ile farklı kimyasal ve fiziksel koşullar değiştirilerek proteinlerin çözünürlülükleri değişime uğratılabilmektedir.

2.7. Enzim İzolasyon Kaynakları

Enzimler, genel olarak canlı organizmalar içindedir. Her bir hücre, kendi metabolik reaksiyonlarını sürdürmek üzere birçok farklı enzim sentezler. Enzim saflaştırılması için prosedürlerin seçimi, onların yerlerine bağlıdır. Hücre içi enzimlerin izolasyonu genel olarak kompleks biyolojik karışımların ayrılmasını içine alır [9].

Enzimler çok karmaşık proteinlerdir ve bunların, katalizörler olarak yüksek dereceli özellikleri sadece onların orijinal durumlarında kaynaklanmaktadır. Orijinal bir araya gelme olayı, pH, ısı ve iyon gücünün özel koşulları altında meydana gelmektedir. Bu durumda, enzim izolasyonları için sadece uygun ve özel yöntemlerden yararlanılabilir [9] .

Ticari enzimlerin saflık derecesi ham enzimlerden yüksek derecede saflaştırılmış biçimlere kadar geniş bir alan içinde yer alıp, uygulamaya bağlıdır. Enzimlerin izolasyonu için ham maddeler hayvan organları, bitki malzemesi ve mikroorganizmalarıdır [9].

2.7.1. Hayvan Organları

Hayvan organları, enzim aktivitesinin korunması için, düşük ısılı bir ortamda taşınmak ve muhafaza edilmek zorundadır. Organlar dondurulmadan önce, yağdan ve bağlantı dokularından arındırılmış olmalıdır.

Donmuş organlar, genel olarak et sanayinde kullanılan makinelerle kıyılabilir ve enzimler bir tampon çözelti ile çıkarılabilir. Ayrıca mekanik öğütme de kullanılabilir. Organlara bağlı olan yağlara, sonraki saflaştırma adımlarında müdahale edilebilir ve organik çözücüler ile ortadan kaldırılabilir. Ancak, enzim aktivitesi, bu uygulamadan olumsuz olarak etkilenebilir.

2.7.2. Bitkiler

Bitki malzemesi, çeşitli ezici veya öğütücülerle elde edilebilir ve istenen enzimler tampon çözeltilerle ortaya çıkarılabilir.

2.7.3. Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar, enzimlerin önemli bir kaynağıdır. Genetik ve protein mühendisliği kapsamında özetlenmiş olan yeni tekniklerin, enzim sanayisine sunacak çok şeyi vardır. Bir gen, ilgili organizmanın üretmediği bir proteini üretmesini sağlamak üzere, bir mikroorganizmaya transfer edilebilir. Ya da, bir mikroorganizmanın genomu, proteinlerin daha kolay izole edilebileceği ve saflaştırılabileceği şekilde proteinlerin özelliklerini değiştirebilir. Bu tür değişiklikler, hücre içi enzimlerin ortama karışmasına neden olabilir, net yükü değiştirir ve böylece, proteinlerin kromatografik özelliklerini değiştirir veya birleştirilmiş proteinlerin oluşumuna neden olabilir.

Ticari olarak kullanılan bir çok enzim, hücre dışı enzimdirler ve bunların izolasyonundaki ilk adım, solüsyondan hücrelerin ayrılmasıdır. Artan miktarlarda izole edilmekte olan hücre içi enzimlere gelince, ilk adım, hücrelerin koparılması için öğütülmesidir. Hücrelerin bozulması için, farklı hücre tiplerine karşılık gelen bir çok yöntemler ve hücre içi enzimlerinde söz konusu olan sorunlar bilinmektedir. Bununla birlikte, bu yöntemlerden sadece bir kaçı sanayi ölçeğinde kullanılmaktadır [9].

3. PROTEAZ ENZİMİ VE ÖZELLİKLERİ

3.1. Proteaz Enziminin Yapısı

Hücre metabolizmasında pek çok reaksiyon gerçekleşmektedir ve canlılar için en büyük öneme sahip olan reaksiyonlar ise hidroliz reaksiyonlarıdır. Hidroliz reaksiyonları, biyolojik maddeleri yararlı moleküller haline getiren reaksiyonlardır. Bu reaksiyonları katalizleyen en önemli enzim ise proteazdır.

Proteazlar, polipeptit ve protein zincirlerini hidrolizleyen, proteinaz veya peptidaz olarak da bilinen enzimlerdir. Proteazlar, alınan besinlerdeki proteini, polipeptit zincirlerindeki amid bağlarını hidrolizleyerek parçalarlar. Proteazlar, sindirim sisteminde bol bulunmasından dolayı ilk keşfedilen enzimler arasında yer almaktadır. Canlılarda genellikle pankreas ve midede üretilmektedirler. Diğer spesifik hidroliz reaksiyonları için kullanılan proteaz çeşitleri vücudun diğer bölgelerinde de üretilmektedir. Bazı hormonların faaliyetleri proteaz tarafından düzenlenmektedir. Kan pıhtılaşması kademesi içinde bir seri serin proteazlar vardır. Bağışıklık sisteminin aktif hale getirilmesinde de serin proteazlar kullanılır. Metallo proteazlar ve tiyol proteazlar hücrelerin yıkımında kullanılmaktadır. Virüsler, olgunlaşmalarında rol alan proteazları şifrelemektedirler. Adeno virüsleri bir sistein proteazı, picorna virüsleri bir serin proteazı ve HIV gibi retro virüsler de aspartil (asit) proteazı şifrelerler. Sonuç olarak proteazlar, bır kısmı mekanizmaya dayalı inhibitörler olan bir çok ilaç için hedefdir [11].

Proteazlar da diğer enzimler gibi protein yapısındadırlar ve belli pH ve sıcaklık aralığında verimli olarak çalışmaktadırlar.

3.2. Proteaz Enziminin Sınıflandırılması

Proteazlar aktif ve fonksiyonel gruplarına göre çeşitli şekilde sınıflandırılmaktadır.

3.2.1. Endo Proteazlar

Endo proteazların dört ana sınıfı bulunmaktadır. Bunlar serin proteazlar, sistein proteazlar, aspartil proteazlar ve metallo proteazlardır [12].

3.2.1.1. Serin Proteazlar

Serin proteazlar katalizde kovalent bir şekilde yer alan aktif site serin tortusu içeren ve alkalin pH civarında maksimum aktivite gösteren proteazlardır. Ester veya amid substratların hidrolizleri, serin proteazlar tarafından katalize edilirler. Bunların hidroksil gruplarının ortasında bir açilenzim bulunmaktadır. Açil enzimin yapısı, amid substratlarının doygun konsantrasyonlarının reaksiyonlarında yavaş adımı oluşturur. Esterlerin hidrolizinden genellikle açil enzim birikir. Serin proteazların kataliz mekanizması ve reaksiyonlarının ara kademeleri hakkında diğer enzimlere göre daha fazla deneysel kanıt vardır. Yapısının bilinmesinin temel sebebi, tripsin ve bazı doğal yollarla oluşmuş polipeptid inhibitörlerin kristalize komplekslerinin kristal yapılarının çözülebilmesidir [3,13].

3.2.1.2. Sistein Proteazlar

Tiyol proteazlar olarak da bilinmektedirler. Serin proteazlar gibi, tiyol yan zinciri kovalent bir katalize dahil olmuş olan bir aktif site sistein tortusu ile karakterize edilmektedir. Sistein proteazları, sindirim amaçları için daha az sıklıkta kullanılan enzimlerin geniş bir ailesi olup, daha sık olarak hücresel proteinlerin dönüşüm süreci için kullanılan hücre içi proteazlar olarak kullanılmaktadırlar. Bu, enzimlerin hafif azaltıcı maddelerin varlığında saflaştırılması ve işlenmesi gerektiği anlamına gelir. Aktif site sisteini, güçlü bir civa sülfür bağını oluşturmak amacıyla işlev gösteren bir organo civa bileşeni olan p-kloro civa benzoat gibi sistein yönetimindeki reaktifler tarafından kolaylıkla değişime uğratılır [1,3].

Tiyol proteazlar çoğunlukla doğadan elde edilmektedirler. Bitki enzimleri olan papayadan elde edilen papain, incirden elde edilen fisin, ananastan elde edilen bromelain, kivi meyvesinden elde edilen aktinidin yapısal olarak benzer bir ailenin üyeleri olup, bunlar üzerinde geniş araştırmalar yapılmıştır. Bakteriyel tiyol

proteazlar olan clostripain ve streptococcal proteazlar ise homojen değildirler. Bir tiyol proteaz olan katepsin B_1 ve B_2 memelilerde lizozomların içinde yer alır.

Papain enzimi 212 aminoasidin tek bir polipeptidinden oluşmuştur. Kinetik çalışmalar aktif sitesine 7 aminoasidin yerleşebileceğini göstermiştir [11, 13].

3.2.1.3. Aspartil Proteazlar

Düşük pH değerlerinde aktif olduklarından dolayı asit proteazlar olarak da bilinmektedirler. Ailenin en iyi bilinen üyesi, isimlendirilme ayrıcalığına sahip ilk enzim olan pepsindir. Diğer üyeler kimosin (renin), katepsin D, rhizopus pepsin ve penisilinopepsindir. Renin, kan basıncını düzenlemede kullanılmaktadır. Bunlar birleşik bir aile meydana getirirler. Aspartil proteazlar, AIDS'in tedavisi için hedef olan HIV'in keşfedilmesi ile dikkat çekmiştir. Tüm aspartil proteazlar iki önemli aspartil tortusu içerir. Bunların reaksiyon mekanizması tüm proteazlar içinde en karmaşık olanıdır ve yönlendirme için basit kimyasal modeller yoktur [11].

3.2.1.4. Metallo Proteazlar

Çinko proteazlar olarak da bilinmektedirler. Çinko proteazlar, nötr pH değerlerinde aktivite gösteren metallo enzimlerdir. Bu proteazların çoğunluğu, kinetik ve yapısal çalışmaya uyum gösteren 15000 ile 35000 molekül ağırlığında küçük monomerik enzimlerdir. Bu nedenle bunlar, en iyi anlaşılan enzimler arasındadır. Farklı sınıfların aynı tepkimesini kataliz etmelerine rağmen, bunlar farklı mekanizmalardan yararlanırlar. Bazıları iyi anlaşılmış olup kimyasal modellere sahiptir. Diğerleri ise daha karmaşıktır [11].

Çinko bağlama sitesinin yapısına göre sınıflandırılmış olan beş ayrı çinko proteaz ailesi mevcuttur. Bu aileler ve bunların çeşitli önerilen mekanizmaları son zamanlarda derinlemesine incelenmektedir. Üzerinde en fazla çalışılan üye, kendi 307 aminoasit ve molekül ağırlığı 34472 olan tek polipeptit zincirine bağlı tek çinko atomu içeren bir metallo enzim olan, sindirim enzim büyükbaş hayvan pankreas karboksil peptidazı A dır [11].

Metallo proteazlar, katalitik çemberi içinde yer alan genellikle çinko (Zn^{2+}) olan bir aktif site metal iyonunun gerekliliği ile karakterize edilmektedir. Bu enzimler, metal iyon kofaktörünün ortadan kalkmasına veya inaktifliğe neden olacak şekilde, EDTA

veya 1,10-fenantrolin gibi metal reaksiyonu maddeleri ile işleme tabi tutularak diğer sınıflardan kolaylıkla ayrılabilirler [3].

3.2.2. Ekzo Proteazlar

3.2.2.1. Amino Proteazlar

Amino proteazlar her zaman bulunabilirler. Ancak ticari ürün olarak daha az mevcutturlar. Çünkü bunların bir çoğu hücre içidir veya membran bağlantısıdır. *Streptomyces griueus'* tan izole edilmiş olan ticari enzim Pronaz® endo peptidaz, amino peptidaz ve karboksi peptidaz aktiviteleri içerir. Pronaz, genel olarak, kusursuz proteinlerin hidrolizine erişmek için laboratuarda kullanılır Ancak hazır madde gıda kullanımı için çok maliyetlidir. Hayvan dokusu homojenatları da aynı zamanda, amino peptidaz aktivitelerinin kaynakları olarak yarı-sanayi ölçeğinde uygulanmaktadır [12].

3.2.2.2. Karboksi Proteazlar

Karboksi proteazlar, katalitik sitenin yapısına göre, serin karboksi proteazlar, metallo karboksi proteazlar ve sistein karboksi proteazlar şeklinde ayrılırlar. Birçok ticari proteazlar, özellikle de mantarlardan olanlar, karboksi proteaz aktivitesinin önemli bir miktarını içerirler. Sindirim sisteminde metallo karboksi proteazlar A ve B belli başlı serin sindirim proteazları (tripsin, kimotripsin ve elastaz) ile bağlantılı olarak hareket etmektedir. Böylece bunlar saf olmayan şekilde oluşurlar. Ticari olarak mevcut olan hazır madde geniş ölçüde pankreatin olarak adlandırılan tripsinden oluşur [12].

3.3. Proteaz Enziminin Kullanım Alanları

Proteaz enzimi en önemli endüstriyel enzimlerden bir tanesidir. Sanayi proteazları, bir sınıf olarak, sanayi enzimlerinin en geniş kategorisini oluşturmaktadırlar. Elde edildiği kaynaklar açısından bakterilerden üretilen proteazlar, sanayide kullanılan proteazların % 60'lık dilimini oluşturmaktadır [6].

Proteaz enzimi üretiminde kullanılan bakteriler arasında *Bacillus* türleri en çok kullanılanlardır. Tüm *Bacillus* türleri hücre enzimlerini salgılamaktadırlar [6].

Proteaz enziminin pek çok çeşidi gıda, tekstil, deterjan, deri ve ilaç sanayi vb. gibi sanayinin değişik kollarında kendine kullanım alanı bulmuştur.

3.3.1. Deri Sanayi

Derinin üretiminde postlar ve hayvan derilerinin işlenmesi aşamalarında farklı proteazlar kullanılabilir. Derinin üretimi için postlar ve hayvan derilerinin işlenmesinde proteazların kullanımının sebebi, kıl ve derinin başlıca yapı taşının protein olmasıdır. Saç(kıl), lifli ve suda çözünmeyen protein moleküllerinden oluşan α-keratin yapısındadır. Bu protein molekülleri α-helis yapısına sahip olup sistein tortularının birçoğunu içerirler. Farklı deri tabakaları, kolajen, α-keratin(epidermis) ve bazı elastinlerden oluşur. Ayrıca yapısında, albümin, globülin, glikoproteinler ve diğer küresel proteinler mevcuttur. Kolajen, büyük miktarlarda, glisin, alanin, prolin ve hidroksiprolin içerir. Bu yapı üçlü helis biçiminde düzenlenmiştir. Farklı özelliklere sahip enzimlerin kullanımı, hayvan derisinin kolajen olmayan içeriklerinin hidrolizini mümkün kılmaktadır. Deri işlemenin iyileştirme, ıslatma, kıldan arındırma, yünden arındırma ayırma ve tabaklama gibi aşamalarında değişik proteazlar kullanılmaktadır [9].

Islatma aşamasında postlar ve hayvan derileri yüzey aktif maddeler ve antimikrobik içerikler içinde yıkanır ve ıslatılırlar. Albüminler ve globülinler gibi lifli olmayan proteinlerin çıkarılması için alkalin proteazlar kullanılır. Pankreatin, deri yumuşatması için ana madde olmuştur [6,9].

Yünden arındırma, derinin etli kısmına yünden arındırma boyasının uygulanmasıyla ve derinin, yün çekilmeden önce 10-20 saat boyunca 20-35°C'de tutulması ile gerçekleştirilmektedir. Yünden arındırma boyası, hidratlı kireç, sodyum klorit, alkalin proteazlar ve sudan oluşmaktadır. İnce yünlü deriler için kullanılan alternatif bir yöntem, etli kısma bir tozun uygulanmasını ve derilerin 24 saat boyunca 25°C'de tutulmasını gerektirir. Bu toz, sodyum sülfat ve klorit, amonyum sülfat ve klorit ve mikroorganizmalar tarafından üretilen nötr proteazlardan oluşmaktadır [9].

Ayırma adımında, postlar ve hayvan derileri, yumuşak ve esnek hale getirmek ve ayrıca tabaklama için hazırlamak için enzimler ve kimyasallarla işlenir. Bugün, başlıca tripsin ve az miktarlı alkalin ve nötr proteazlar kullanılmaktadır [9].

3.3.2. Tekstil Sanayi

Tekstil sanayi, enzim alanındaki gelişmeleri yakından takip eden bir sanayi koludur. Proteazlar, tekstil alanında yün ve ham ipeğin işlenmesi aşamasında tercih edilen bir enzim çeşididir.

3.3.3. İlaç Sanayi

Enzimler ilaç sanayinde geniş uygulama alanına sahiptir. Vücuttaki çeşitli ihtiyaçları gidermek veya eksik enzim ihtiyacını karşılamak için enzim takviyeleri üretilmektedir. Sindirim sistemini desteklemek için üretilen ilaçlarda proteazlar kullanılmaktadır.

3.3.4. Bakım Ürünleri

Kozmetik ürünlerinde enzimlerin kullanım alanı her geçen gün artmaktadır. Cilt bakımı, diş sağlığı, saç bakımı ve kontak lens bakım solüsyonlarında uygulama alan vardır. Proteazlar,diş macunu, istenmeye tüylerin giderilmesi ve lens solüsyonlarında kullanılmaktadır.

3.3.5. Klinik Çalışmalar

Kan ve dokuda uyuşturucu madde tanımlanmasında proteazlar kullanılmaktadır. Çünkü uyuşturucu madde ara ürünleri vücuttaki proteinleri bağlamakta, proteazla uygulama yapıldığında protein çözünmekte ve diğer madde ortaya çıkmaktadır. Böylece analizleri yapılmaktadır.

3.3.6. Deterjan Sanayi

Günümüzde deterjanların tercih edilmesinin sebebi, yıkama sıcaklığından bağımsız olarak en zor kirleri bile çıkarmasıdır. Bunlar için kullanılan deterjan enzimleri değişik özellikli enzimlerdir ve bunların arasında proteazların olmaması söz konusu değildir. Çamaşır deterjanlarında ilk kullanılan enzim proteazdır. Günümüzde ise proteazlar, lipazlar, amilazlar ve sellülazlarla desteklenmektedir.

Bakteriyel proteazların çamaşır deterjanlarında aktif içerik olarak kullanılması enzimlerin en geniş kullanım alanını oluşturmaktadır. Enzimler, düşük fosfat içeriğine sahip, ılık ve soğuk su yıkama ısıları için formüle edilmiş olan deterjanların, önemli bir bileşiği haline gelmiştir. Sıcak yıkamalar için formüle edilmiş olan deterjanlar, sodyum fosfat ve yüksek ısılarda (60°C üzeri) aktif hale

gelen bir beyazlatma maddesi sodyum perborat içermektedir. Fosfat kirlenmesini azaltmak için ortaya çıkan çevresel baskılar ve polyester kumaşların kullanımının artması nedeniyle, bu içerikler deterjanlarda azaltılmış hatta kaldırılmıştır. Çevresel güvenliliği nedeni ile bakteriyel proteaz kullanımı artmıştır.

Çevresel amaçlarla deterjanlardan fosfatların çıkarılması ve deterjanın raf ömrü boyunca içerisine ilave edilen bakteriyel proteazların kararlı olması için gereken şartlar, deterjanların genel oluşumunda büyük değişikliğe neden olmuştur. Daha iyi fosfatsız ürünlerde kullanılan yüzey geriliminin azaltan maddeler ve beyazlatıcı maddeler, iyi bilinen serin proteaz inhibitörleridir. Özellikle alkil benzen sülfonatlar gibi yüzey gerilimini azaltan maddeler proteazların açılmasına ve kendinden ısıyla yumuşamasına neden olmaktadır. Özellikle, zeolit, silikatlar, NTA ve EDTA ciddi olarak destabilizatör olarak bilinmemektedir.

Genellikle lekelerin %95'inin çıkarılması yeterlidir. Ancak kalan %5 yeni kirlerin eskilere yapışarak yerleşmesi açısından önemlidir. İşte bu %5'lik kısmı enzimler çıkarmaktadır.

Bulaşık makinesi deterjanlarında ise nişasta bazlı lekelerin çıkarılması önemlidir. Bunun için değişik proteazlar kullanılmaktadır. Nişasta lekeleri çıkarılmazsa zamanla birikerek donuk bir görünüme dönüşmektedir. Protein lekeleri ise bardak , çatal ve kaşıklar için problem yaratmaktadır. Yapışan protein lekeleri zamanla sert sudaki kirecin bardak ve çatal üzerinde birikmesine sebep olur. Proteaz kullanımı bu sorunu gidermektedir.

Endüstriyel çamaşırhanelerde pH 12 gibi yüksek alkali şartlar altında aktifliğini koruyacak enzimler gerekmektedir. Örneğin, esperaz proteazı yüksek pH değerlerinde ve 60-70°C'lerde optimum aktiviteye sahiptir. Bu sebepten endüstriyel çamaşırhanelerde tercih edilmektedir. Savinaz ve everlaz bu tip kullanımlar için uygun diğer proteazlardır [6].

3.4. Bakterilerden Proteaz Enzimi Eldesi ve Saflaştırılması ile İlgili Yapılan Çalışmalar

HİTTU MATTA ve VASU PUNJ tarafından 1998 yılında *Bacillus polymxa* türünden termostable proteaz üretimi ve saflaştırması ile ilgili çalışmada amonyum sülfat çöktürmesi ve Sefadeks G-100 ile jel filtrasyonu yapılarak 40 kat saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Optimum pH 7.5, optimum sıcaklık ise 50°C olarak bulunmuştur. Molekül ağırlığı tayini sonucu ise 30kDa bulunmuştur [14].

1999 yılında JEN-KUO YANG ING-LUNG SHİH tarafından *Bacillus subtilis* türünden proteaz üretimi ve saflaştırılması ile ilgili bir çalışma yapılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sefaroz ile iyon değiştirme kromatografisi, Sefakril S-200 ile jel kromatografisi uygulanmış ve 37 kat saflaştırma sağlanmıştır [15].

CHARLES LOSHON ve PETER SETLOW tarafından 1981 yılında yapılan çalışmada ise *Bacillus megatherium* türünden proteaz izolasyonu ve saflaştırılması konu alınmıştır. DEAE-Sefadeks kullanılarak 133 kat saflaştırma sağlanmıştır [16].

C.G. KUMAR ,M.P. TİWARİ ve K.D.JANY tarafından alkalofilik *Bacillus* türlerinden iki tane alkalin serin proteaz üretimi ve özelliklerinin incelenmesi ile ilgili bir çalışma yapılmıştır. Saflaştırma aşamalarında aseton çöktürmesi, DEAE- ve CM- Sefaroz iyon değiştirici ve Sefakril S-200 gel filtrasyon teknikleri kullanılmıştır. SDS-PAGE ile yapılan molekül ağırlığı tayinlerinde 28 ve 29 kDa molekül ağırlıkları bulunmuştur. Optimum aktivite verdiği sıcaklıklar ise 50 ve 55°C olarak bulunmuştur. Yapılan çalışma sonunda 27.7 kat saflaştırma yapılmıştır [17].

Alkalofilik *Bacillus* türlerinden alkalin proteaz eldesi çalışması, substrat olarak kazein kullanıldığında optimum pH değeri 10-12.5 arasında, pH kararlılığı ise 6.5-13 arasında bulunmuştur. Bu proteaz çeşidinin sodyum dodasil sülfat ve sodyum alkilbenzen sülfonata karşı kararlı olduğu gözlenmiştir. Aktivite ise 70°C'de maksimuma ulaşmıştır. Elde edilen proteazın serin proteaz olduğu, fenil metan sülfonil florid ve diizopropilflorfosfata olan duyarlılığından dolayı tespit edilmiştir [18].

Bacillus stearothermophilus TLS33 bakteri türünden üç ayrı termostable proteaz eldesi ile ilgili çalışmada, Lisin affinity kromatogafisi, anyon değiştirici QHyperD kromatografisi ve gel filtrasyonu yapılmıştır. Molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 36, 53

ve 71 kDa olarak bulunmuştur. Optimum pH değerleri sırasıyla 8.5 7.5 ve7 olarak, optimum sıcaklıklar ise 70, 85, 90°C olarak bulunmuştur. EDTA'nın her üçü için inhibitör olduğu tespit edilmiştir [19].

Alkalofilik bakteri türlerinin topraktan izole edilerek milk agar ortamında üretilerek alkalin proteaz eldesi çalışmasında, 15 *Bacillus* türünün güçlü birer alkalin proteaz üreticisi olduğu bulunmuştur. En yüksek enzim aktivitesinin glukoz ve amonyum klorit varlığında olduğu gözlenmiştir. 20 saat, pH 10.5 ve 40°C'de üreme yapılmıştır [20].

Bacillus türlerinin üremeleri, sporlanmaları ve hücre dışı proteaz üretimi için yapılan çalışmada 37°C'de büyütülen hücrelerin yaklaşık 12 saat sonra sporlanmaya başladığı gözlenmiştir [21].

Bacillus cereus türünden nötral proteaz eldesi ile ilgili çalışmada saflaştırma aşamaları olarak amonyum sülfat çöktürmesi, aseton çöktürmesi, Bio-Jel filtrasyonu, DEAE-Selüloz kolon kromatografisi kullanılmıştır. Spesifik aktivitesi 72 U/mg, molekül ağırlığı ise 29kDa olarak bulunmuştur. Substrat olarak hemoglobin kullanıldığında maksimum aktiviteyi pH 7 ve 40°C'de vermiştir. Enzim aktivitesi, EDTA, β-Merkaptoetanol, benzamidin 1mMlık konsantrasyonları kullanıldığında, diizopropilflorfosfat, L-sistein, L-histidin, 1,10-fenantrolinin 10mM'lık konsantrasyonları kullanıldığında inhibe edilmiştir. Özellikle Ca^{2+} varlığında aktivitesinde artış görülmüştür [22].

4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

4.1. Malzeme ve Metot

4.1.1. Malzeme

- Pepton, Sigma
- Et Ekstraktı, Sigma
- Bakto Tripton, Sigma
- Bakto Soyton, Sigma
- Bakto Agar, Sigma
- Sodyum Klorür (NaCl), Merck
- Asetik Asit (CH_3COOH), Merck
- Trikloroasetik Asit (CCl_3COOH), Carlo Erba
- Sodyum Asetat (CH_3COONa), Carlo Erba
- Borik Asit (H_3BO_3), Merck
- Sodyum Hidroksit (NaOH), Carlo Erba
- Süt Kazeini ($C_8H_{12}O_3N_2$), Merck
- Amonyum Sülfat [$(NH_4)_2SO_4$], Teknik
- Tris-HCl , Merck
- Hidroklorik Asit (HCl), Merck
- BSA, Sigma
- Trosin, Sigma
- BCA, Sigma
- Sodyum Karbonat ($NaCO_3$ .H2O), Merck

- Sodyum Tartarat ($C_4H_8Na_2O_8$), Merck
- Sodyum Bikarbonat ($NaHCO_3$), Merck
- Bakır Sülfat ($CuSO_4.5H_2O$), Merck
- Akrilamit (C_3H_5NO), Biorad
- Bis-akrilamit , Biorad
- Tris, Merck
- SDS, [$C_{12}H_{25}O_4SNa$], Sigma
- APS, [$(NH_4)_2S_2O_8$], Sigma
- TEMED, Biorad
- Gliserol ($C_3H_8O_3$), Merck
- β –Merkaptoetanol (C_2H_6OS), Merck
- Bromfenol mavisi, Merck
- Glisin ($C_2H_5NO_2$), Merck
- Coomassie parlak mavisi, Sigma
- Metanol (CH_3OH), Merck
- Distile Su
- Nessler Reaktifi, Fluka
- Diyaliz Bandı (çap:16 mm, Kapasite: 60ml/ft), Sigma
- Mavi Bant Süzgeç Kağıdı, Filtrak
- DEAE Sefaroz Anyon Değiştirici, Sigma

Cihazlar

- Su Banyosu, Julabo SW 22
- Su Banyosu, Clifton
- Santrifüj, Hereus Christ UJ III (25000dev/dak)
- Hassas Terazi, Oerling Na 264

- Manyetik Karıştırıcı, IKA-Schütter –Mas 2
- UV Spektrometre, Hewlett Packard -8452 A
- pH metre, NEL
- SDS-PAGE Elektroforez Cihazı, EC-120
- Çalkalayıcı, Edmund Bühler
- Etüv, Elektro-mag
- Otoklav, Hirayama

4.1.1.1. Tamponlar ve Çözeltiler

Sodyum–Borat Tamponu A (0.135 mol/l): 30.9 g borik asit ile 10.8 g sodyum hidroksit tartılarak 1 litre distile suda çözünmüştür.

Sodyum–Borat Tamponu B (0.01mol/l; pH:10.5): Sodyum–Borat Tamponu A'dan 74 ml alınıp 1 litreye tamamlanmış ve pH, 0.1N sodyum hidroksit ile 10.5'e ayarlanmıştır.

Sodyum–Borat Tamponu C (0.01mol/l; pH: 9.3): Sodyum–Borat Tamponu A'dan 74 ml alınıp 1 litreye tamamlanmış ve pH, 0.1N sodyum hidroksit ile 9.3'e ayarlanmıştır.

Tris-HCl Tamponu (0.5mol/l; pH: 7.2): 79.8 g Tris-HCl tartılıp 1 litre distile suda çözünmüş ve pH, 0.1N sodyum hidroksit ile 7.2'ye ayarlanmıştır.

Sodyum Klorür Çözeltisi (1mol/l): 58.44 g sodyum klorür tartılıp 1 litre distile suda çözülmüştür.

Sodyum Hidroksit Çözeltisi (0.1 N): 4 g sodyum hidroksit tartılıp 1 litre distile suda çözülmüştür.

Hidroklorik Asit Çözeltisi (1N): 8.28 ml hidroklorik asit ölçülüp distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Süt Kazeini Substrat Çözeltisi A (% 0.6 Ağ./hacim): 6 g süt kazeini tartılıp Sodyum-Borat Tamponu B ile 1 litreye tamamlanmıştır.

Süt Kazeini Substrat Çözeltisi B (% 0.6 Ağ/hacim): 6 g süt kazeini 100 ml 0.1N sodyum hidroksit çözeltisinde çözülmüş, üzerine 400 ml distile su ve 40 ml Tris-HCl

tamponu ilave edildikten sonra 1N hidroklorik asit çözeltisi ile pH 7.2'ye ayarlanmış ve distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

TCA Karışım Çözeltisi A (0.11 mol/l TCA; 0.22mol/l Sodyum asetat; 0.33mol/l Asetik asit):17.97 g TCA; 29.94 g sodyum asetat ve 31.4 ml asetik asit karıştırılarak distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

TCA Karışım Çözeltisi B : Hazırlanan sodyum asetat (220 ml) ve asetik asit (330 ml) çözeltilerinin tamamı ile %50(Ağ./hacim)'lik TCA çözeltisinin 36 ml'si karıştırılıp distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

• **Asetik Asit Çözeltisi (1 mol/l):** 31.43 ml asetik asit, distile su ile 330 ml'ye tamamlanmıştır.

• **Sodyum Asetat Çözeltisi (1 mol/l):** 29.94 g sodyum asetat tartılıp distile su ile 220 ml'ye tamamlanmıştır.

• **TCA Çözeltisi (%50 Ağ./hacim):** 50.5 g TCA tartılıp distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler:

• **Çözelti A:** 1 g BCA, 2 g sodyum karbonat, 0.16 g sodyum tartarat, 0.4 g sodyum hidroksit ve 0.95 g sodyum bikarbonat tartılarak 100 ml distile suda çözülmüş ve pH'ı 11.25'e sodyum hidroksit veya sodyum bikarbonat ile ayarlanmıştır.

• **Çözelti B:** 4 g bakır sülfat tartılarak 100 ml distile suda çözülmüştür.

• **Çözelti C:** Çözelti A'nın 100ml'si ile Çözelti B'nin 2 ml'si karıştırılarak elde edilmiştir.

SDS-PAGE için Kullanılan Çözeltiler:

• **Monomer çözeltisi:** 58.4 g Akrilamit, 1.6 g Bisakrilamit tartılıp 200 ml distile suda çözülmüştür.

• **4X Ayırıcı Jel Tamponu (1.5 M Tris-Cl, pH: 8.8):** 36.3 g Tris bir miktar distile su ile çözülüp pH hidroklorik asit çözeltisi ile 8.8'e ayarlanmış ve distile su ile 200 ml'ye tamamlanmıştır.

• **4X Yığın Jel Tamponu (0.5 M Tris-Cl, pH: 6.8):** 3 g Tris bir miktar distile su ile çözülüp pH 6.8'e ayarlanmış ve distile su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır.

• **%10'luk SDS Çözeltisi:** 10 g SDS tartılıp 100 ml distile suda çözülmüştür.

• **%10'luk APS Çözeltisi:** 0.1 g APS tartılıp 1 ml distile suda çözülmüştür.

• **2X Örnek Tamponu:** 2.5 ml 4X Yığın Jel Tamponu, 4 ml %10'luk SDS çözeltisi, 2 ml gliserol ve 1 ml β-Merkaptoetanol karıştırılıp 10ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

• **Tank Tamponu:** 3 g Tris, 14.4 g glisin tartılıp 10 ml SDS ile karıştırılıp distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

• **Coomassie Blue Stain:** 1 g Coomassie parlak mavisi tartılıp, 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ile karıştırılıp distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

• **Jel Destain:** 25 ml metanol, 50 ml asetik asit ölçülüp distile su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.

4.1.2. Metot

Enzim Ayırma ve Saflaştırma İşlemleri

Yapılan temel işlemleri şöyle sıralamamız mümkündür:

- Santrifüjleme
- Doyurma
- Diyaliz
- İyon Değiştirme Kromatografisi

Kısmi saflaştırma işlemleri yapıldıktan sonra, proteaz enziminin molekül ağırlığı tayini için aşağıdaki yöntem uygulanmıştır.

- SDS-PAGE

4.1.2.1. Santrifüjleme

Santrifüjleme işleminin esası, santrifüj kuvvetinin etkisiyle çözelti içindeki katı parçacıkları sıvı kısımdan ayırmaktır. Enzimler ise büyük moleküller olmasından dolayı ultrasantrifüj tarafından yaratılan (300000 kat yer çekimi) yüksek santrifüj alanları tarafından çökeltilebilirler. Enzimlerin çökme hızı moleküllerin büyüklüğüne, şekline ve çözeltinin viskozitesine bağlı olmakla birlikte molekül ağırlığı ile de doğru orantılıdır. Bu yöntemde küçük hacimlere ultrasantrifüjleme işlemi uygulandığından bir enzimin diğerinden ayrılması için bu yöntem saflaştırma metodu olarak tercih edilmemektedir [8].

4.1.2.2. Doyurma

Saflaştırma işleminin diğer bir aşaması ise çözeltiden ayrıştırılmak istenen enzimi çöktürerek diğer proteinlerden ayırmak veya istenmeyen proteinleri çöktürerek çözelti kısmını saf elde etmektir [23].Yüklü ve büyük moleküller saf suda az çözünürlüğe sahiptirler. Çözünürlüğü arttırmak büyük molekül tarafından taşınan yükün dağıtılması ile olur. Bunun için iyon ilavesi gerekmektedir [8]. Amonyum Sülfat sıklıkla bu amaç için kullanılmaktadır. Çünkü suda kolaylıkla çözünür, maliyeti düşüktür ve birçok enzim için zararsızdır. Bu yöntem çözelti hacminin azaltılması için de kullanılır. Çöktürülen kısım daha sonra uygun tamponun en küçük hacmi ile tekrar çözülür [8,9].

4.1.2.3. Diyaliz

Diyaliz işleminde kullanılan tüpler bir elek vazifesi görmektedir. 20000 molekül ağırlığına kadar olan küresel proteinlerin geçişine izin vermekte daha büyükleri tutmaktadır. Ayrıca doyurma sonrası kalan tuzları, organik çözücüleri ve küçük moleküllü inhibitörleri uzaklaştırmak için de iyi bir yöntemdir [8].

4.1.2.4. İyon Değiştirme Kromatografisi

İyon değiştirme kromatografisi, protein moleküllerinin yüklerine dayalı bir ayırma tekniğidir. Proteinleri öncelikle yük tipine (pozitif veya negatif) sonrasında ise yük gücüne (zayıf veya kuvvetli) göre ayırır [24]. Net yük pH'dan etkilenir ve bu özellikten dolayı proteinlerin hangi (anyon veya katyon) değiştiriciden geçirileceği belirlenir. Numuneye, düşük iyonik güçte sulu bir çözelti uygulanmaktadır ve ayırma, en iyi olarak, artan konsantrasyonun tuz değişim ölçüleri ile yerine getirilmektedir.

İyon değiştirme kromatografisinin temeli şöyledir: Yüklü iyonlar aynı tipli iyonlarla serbest şekilde alış veriş yapabilirler. Bu durumda, bir iyon değiştirici tıpkı bir negatif yüklü protein gibi Cl^- iyonları değişim yapması mümkündür. Bu süreç daha sonra, Cl^- iyonlarını NaCl çözeltisi biçiminde Cl^- iyonları ile yıkamak suretiyle tersine çevrilebilir. Bu tür bir yıkama ilk olarak zayıf bağlı proteinleri ortadan kaldırır ve daha sonra daha büyük net negatif yüklü olan daha güçlü bağlı proteinleri ortadan kaldırır [9]. Birçok kolon kromatografi teknikleri gibi iyon değiştirme

kromatografisinde genel olarak selüloz, sefadeks, sefaroz, dekstran gibi kolon malzemeleri kullanılmaktadır [24].

4.1.2.5. SDS-PAGE

SDS-PAGE yöntemi molekül ağırlığı tayini için kullanılmaktadır. Numune bir ortak noktaya yüklenir ve oluşturulan elektrik alanda hareketi sağlanır. Bu hareket genelde yatay yöndedir. Her molekül kendisiyle aynı yük ve büyüklükteki diğer moleküllerle aynı bölgeye gider. Yayılmayı en aza indirmek için bütün işlem boyunca genellikle katı ama içerisinden protein ve tampon geçirebilecek bir ortam kullanılır. Bu genelde bir jeldir. Bu sırada, içerisinde molekül ağırlıkları belli olan protein karışımı bir marker da numune ile aynı zamanda yürütülür. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel kurutulur ve numunenin yoğun olarak toplandığı bant aralığının marker ile karşılaştırılması yapılarak numunenin molekül ağırlığı tayin edilir [23].

4.2. *Bacillus* Türlerinden Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

4.2.1. *Bacillus* Türü Bakterilerin Genel Özellikleri

Bacillus türleri toprak, gübre, toz, bitki, hayvan, süt ve sularda bulunan patojen olmayan bakteri türleridir.

Bakteriler renksiz ve şeffaf oldukları için, çeşitli boyama metotları ile şekilleri ve bazı yapı özellikleri incelenebilir. Bu yapı özelliklerinin tanınması ile bakteriler teşhis edilebilir ve sınıflandırılabilir. Boyama metotlarının en önemlisi 1884 yılında GRAM tarafından bulunan Gram Metodu'dur. Bu metoda göre bakteriler, gram pozitif ve gram negatif olmak üzere 2 büyük gruba ayrılırlar. Gram pozitif türleri saydam zeminle kontrast oluşturacak şekilde mor veya mavi rengi alırken, gram negatif türleri ise kırmızı rengi alırlar. *Bacillus* türleri gram pozitiftirler. *Bacillus subtilis megatherium* türünün gram boyama metodu ile yapılan incelemesinde uzun ve kalın çubuk (çomak) şekline sahip olduğu gözlenmiştir.

Bakterilerin üremesi için besin maddelerine ihtiyaçları vardır. Besiyeri, bakterinin gelişmesi ve çoğalması için gerekli maddeleri içerirler. Besiyerleri katı, sıvı ve özel besiyerleri gibi çeşitlere sahiptir.

Bacillus türlerinin bazıları katı besiyerinde yuvarlak, kuru ve belirgin halde ürerken *Bacillus subtilis megatherium* gibi bazı türleri de dağınık halde üreyebilirler.

Bakterilerin sıvı besiyerlerinde üremeleri ise çeşitli aşamalardan meydana gelmektedir. Bakteri sıvı besiyerine girdiğinde ortama uyum sağlaması için geçen kısa bir gizli aşamadan sonra ikiye bölünerek çoğalmaya başlar. Bu aşamadan sonra üreme hızının arttığı aşama başlar. Bunu, çoğalmanın sabit bir hızla devam ettiği logaritmik aşama takip eder. Daha sonra ortamdaki besinler bittiğinden bölünme hızının azaldığı aşama başlar. Bu sırada bazı bakteri hücreleri ölür. Canlı ve ölü bakterileri hücreleri arasında bir denge oluşur. Çoğalan ve ölen bakterilerin sayısı aynı olduğundan canlı bakteri sayısının sabit aşaması ortaya çıkar. Bu aşamada üreme durur. Bu aşamadan sonra ölü bakteriler fazla olduğundan canlı bakteri sayısının azalma aşaması ortaya çıkar. Bundan sonraki son aşamada sayıları azalmış olmakla birlikte bakteri hücrelerinin bir kısmı bakterinin yapısına bağlı olarak uzunca bir süre ölmeden kalırlar. Bakterinin ölmeden kalması türün sporlu veya sporsuz olmasına bağlıdır. Sporlu bakteriler, son aşamada ölmemek için spor şekillerini alırlar ve sporlanma sırasında besiyerine çeşitli metabolizma ürünleri bırakırlar. *Bacillus* türlerinin sporlanma sırasında ortama bıraktığı ürün proteaz enzimidir.

Bakteriler sıvı besiyerinde homojen bir bulanıklık oluşturacak şekilde üreyebildiği gibi dipte çöküntü veya yüzeyde zar oluşturarak da üreyebilirler. *Bacillus subtilis megatherium* ve *Bacillus polymxa* türleri yüzeyde zar oluşturacak şekilde üremektedirler [25].

4.2.2. Besiyeri Hazırlanması ve Ekim İşlemi

Sıvı besiyeri hazırlanırken 5 g pepton ve 3 g et ekstraktı tartılıp distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. pH, 1M Na_2CO_3 ile 7'ye ayarlanmıştır. Sıvı besiyerine sporlanmayı hızlandırması için 10 mg $MnSO_4.2H_2O$ ilave edilmiştir.

Petri kabına dökülen katı besiyeri ve eğri katı besiyeri hazırlanırken 15 g bakto tripton, 5 g bakto soyton, 5 g sodyum klorür, 15 g bakto agar tartılıp distile su ile 1 litreye tamamlanmış ve pH 7.3'e ayarlanmıştır.

Bütün besi yerleri hazırlandıktan sonra, sterilizasyon işlemi için 121°C'de 15 dakika otoklavda tutulur.

Bacillus türleri liyofilize edilmiş olarak ampullerde alınmıştır. Bu ampullere önce kırılma işlemi uygulanmıştır. Ampuller 2 yöntemle kırılabilir. İlk yöntemde, ampuller önce elmasla çizilir daha sonra, ucu bek alevinde eritilen bir cam çubuk ile

kırılır. İkinci yöntemde ise, ampulün uç kısmı çizilip ısıtılır ve ani su ilavesi ile çatlatılır. Kırılma işleminden sonra ince pipet ile sıvı besiyerinden alınan az miktardaki sıvı, ampulün içine yavaş yavaş ilave edilip süspansiyon haline getirilmiştir. Aynı pipetle süspansiyon haline getirilen sıvının tamamı çekilerek sıvı besiyerine eklenmiştir. Burada kullanılan sıvı besiyeri, yukarıda hazırlanışı anlatılmış olan sıvı besiyerinin az miktarda hazırlanmış olanıdır.

Daha sonra katı besiyeri içeren petri kutusuna Azaltma Metodu ile ekim işlemi yapılmıştır. Azaltma metodunda, petri kutusunun arka kısmı cam kalemi ile dörde bölünmüş ve saat yönünde ilerleyerek numaralandırılmıştır. İğne ile sıvı besiyerinden alınan az miktardaki bakteriler, sırasıyla bu bölgelere zigzaglar çizilerek ekilmiştir. Daha sonra petri kutuları 37°C'deki etüve kaldırılmış ve 1 gün boyunca üremeleri izlenmiştir. Petri kutularında üreyen kolonilerden saf kültür eldesi işlemi yapılmıştır. Bu işlem için tek koloniden iğne ile alınan bakteri, eğri katı besiyerine ekilmiş ve 1 gün boyunca 37°C'lik etüvde bekletilmiştir. Eğri katı besiyerine ekilen numunelerden genç kültür üretimi için öze yardımı ile örnek alınıp başka bir eğri katı besiyerine ekilmiştir. Burada 48 saat bekletilmiş ve daha önceden hazırlanan sıvı besiyerine öze yardımı ile ekim yapılmıştır. Uygun üreme koşulları denenerek üremeleri ve sporlanmaları gözlenmiştir.

4.2.3. Amonyum Sülfat ile Doyurma

Bakterilerin üreme ve sporlanma süreleri beklendikten sonra enzim çözeltisi ile bakteri kısmını birbirinden ayırmak için besi yeri, 20000 devir/dakika hızla 30 dakika santrifüjlenmiştir. Çökelti kısmı atılmıştır. Elde edilen sıvı kısım ise ham homojenattır. Ham homojenata amonyum sülfat doyurması uygulanmış ve böylece çözeltideki proteinlerin çöktürülerek ayrılması sağlanmıştır. Doyurma işlemi üç aşamada yapılmıştır. İlk aşamada %40'lık doyurma yapılmıştır. Bunun için, 100 ml çözelti 25 g amonyum sülfat içerecek şekilde, ham homojenatın miktarı (ml) için ilave edilmesi gereken amonyum sülfat miktarı hesaplanmıştır. Doyurma işleminin bütün aşamaları 4°C'de gerçekleştirilmiştir. Amonyum sülfat ilavesinden sonra 30 dakika karıştırılan çözelti, 20000 devir/dakika hızla 30 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işleminden sonra çözelti (süpernatant) ve çökelti kısımları birbirinden ayrılmıştır. Çözelti kısmı Ç1, çökelti kısmı da uygun tamponun en küçük hacmi ile çözülerek P1 olarak adlandırılmıştır. Aktivite ve protein tayinleri için Ç1'den 5 ml

ayrılıp P1 ile birlikte buzdolabına kaldırılmış ve doyurma işlemine Ç1 ile devam edilmiştir.

Doyurmanın ikinci aşamasında % 70'lik amonyum sülfat doyurması yapılmıştır. Bunun için, 100 ml çözelti 44.2 g amonyum sülfat içerecek şekilde, Ç1 çözeltisinin miktarı (ml) için gereken amonyum sülfat miktarı hesaplanmış ve bu değerden %40'lık doyurma işlemi için gerekli amonyum sülfat miktarı çıkarılarak, %70'lik doyurma için ilave edilmesi gereken amonyum sülfat miktarı hesaplanmıştır. Doyurma işleminin bütün aşamaları 4°C'de gerçekleştirilmiştir. Amonyum sülfat ilavesinden sonra 30 dakika karıştırılan çözelti, 20000 devir/dakika hızla 30 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işleminden sonra çözelti (süpernatant) ve çökelti kısımları birbirinden ayrılmıştır. Çözelti kısmı Ç2, çökelti kısmı da uygun tamponun en küçük hacmi ile çözülerek P2 olarak adlandırılmıştır. Aktivite ve protein tayinleri için Ç2'den 5 ml ayrılıp P2 ile birlikte buzdolabına kaldırılmış ve doyurma işlemine Ç2 ile devam edilmiştir.

Doyurmanın üçüncü aşamasında % 80'lik amonyum sülfat doyurması yapılmıştır. Bunun için, 100 ml çözelti 52.3 g amonyum sülfat içerecek şekilde, Ç2 çözeltisinin miktarı (ml) için gereken amonyum sülfat miktarı hesaplanmış ve bu değerden %40 ve %70'lik doyurma işlemi için gerekli toplam amonyum sülfat miktarı çıkarılarak, %80'lik doyurma için ilave edilmesi gereken amonyum sülfat miktarı hesaplanmıştır. Doyurma işleminin bütün aşamaları 4°C'de gerçekleştirilmiştir. Amonyum sülfat ilavesinden sonra 30 dakika karıştırılan çözelti, 20000 devir/dakika hızla 30 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işleminden sonra çözelti (süpernatant) ve çökelti kısımları birbirinden ayrılmıştır. Çözelti kısmı Ç3, çökelti kısmı da uygun tamponun en küçük hacmi ile çözülerek P3 olarak adlandırılmıştır. Aktivite ve protein tayinleri için Ç3 ve P3 buzdolabına kaldırılmıştır. Yapılan aktivite ölçümlerinde, istenilen değerlerin çökeltilerde olduğu görülmüş ve işlemlere çökeltiler üzerinden devem edilmiştir.

4.2.4. Diyaliz

Doyurma işlemi tamamlandıktan sonra çökelti kısımları birleştirilerek işlemlere toplam çökelti üzerinden devam edilmiştir. Toplam çökeltiye diyaliz işlemi uygulanmıştır. Diyaliz işleminden önce diyaliz tüpleri şartlandırılmıştır. Tüpler, 3-4 saat boyunca su ile yıkanarak gliserin, tüplerden uzaklaştırılmıştır. Kükürt

bileşenlerini uzaklaştırmak için 80°C'de sodyum sülfit (%0.3 Ağ./hacim) çözeltisi içinde 1 dakika kaynatılmıştır. 60°C'de 2 dakika sıcak su ile yıkandıktan sonra sülfürik asit çözeltisi (%0.2 hacim/hacim) ile bir süre temas ettirilmiştir. Son olarak sıcak su ile yıkanarak asit uzaklaştırılmıştır. Şartlandırma işlemlerinden sonra, diyaliz işlemi uygulanacak numunelerden belli miktarda diyaliz tüplerine konulup numune miktarını 100 katı miktardaki uygun tampona karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz işleminin süresi Nessler Reaktifi ile kontrol edilmiştir. Diyaliz işlemi tamamlandıktan sonra, numuneler santrifüjlenmiştir. Numunelerin santrifüj öncesi ve sonrası aktivite ve protein ölçümleri yapılmıştır.

4.2.5. İyon Değiştirme Kromatografisi

İyon değiştirme kromatografisi yalnızca *Bacillus polymxa* türünden elde edilen enzim çözeltisine uygulanmıştır. Enzim çözeltisi DEAE-Sefaroz iyon değiştiriciden geçirilmiştir. Kolon yüksekliği 30 cm, çapı 2 cm'dir. Kolon öncelikle uygun tamponla 3ml/dk hızla 30 dakika boyunca yıkanmıştır. Daha sonra numuneden 10 ml kolona beslenmiş ve akış hızı 1ml/dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Numune beslendikten sonra NaCl içeren tampon 150 dakika boyunca kolondan geçirilmiştir. Toplanan numuneler protein ve aktivite tayini için buzdolabına kaldırılmıştır.

4.2.6. Aktivite Tayini

Yapılan çalışmalarda iki farklı aktivite tayin yöntemi kullanılmıştır. Aktivite tayinlerinde trosin kullanılarak standart eğri çizilmiştir. Standart eğri çizimi için çözelti konsantrasyonu 0.2 M olacak şekilde 21 mg trosin 100ml TCA çözeltisinde çözülüp belli oranlarda seyreltilmiş ve standart çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler kullanılarak standart eğri çizilmiştir. Standart eğri Şekil A.1'de verilmiştir.

4.2.6.1. Aktivite Tayin Yöntemi A

Bu yöntemde tüm aktivite ölçümleri 35°C'de gerçekleştirilmiştir. Bu sebepten su banyosu bu sıcaklığa sabitlenmiştir. Öncelikle, Süt Kazeini Substrat Çözeltisi A'nın 3 ml'si 5 dakika boyunca su banyosunda bekletilmiş ve üzerine enzim çözeltisinden 0.5 ml konularak 10 dakika reaksiyonun gerçekleşmesi için beklenmiştir. Bu süre sonunda reaksiyonu durdurmak için TCA Karışım Çözeltisi A'dan 3.2 ml ilave edilerek 10 dakika beklenmiştir. Şahit numune için ise enzim çözeltisi ilavesi haricindeki bütün işlemler aynı şekilde uygulanmıştır. Mavi bant süzgeç kağıdından

süzülen numunelerin spektrofotometrede 275nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür [18]

4.2.6.2. Aktivite Tayin Yöntemi B

Bu yöntemde tüm aktivite ölçümleri 30°C'de gerçekleştirilmiştir. Bu sebepten su banyosu bu sıcaklığa sabitlenmiştir. Öncelikle Süt Kazeini Substrat çözeltisi B'nin 2.5 ml'si 5 dakika boyunca su banyosunda bekletilmiş ve üzerine enzim çözeltisinden 0.5 ml konularak 10 dakika reaksiyonun gerçekleşmesi için beklenmiştir. Bu süre sonunda reaksiyonu durdurmak için TCA Karışım Çözeltisi B'den 2.5 ml ilave edilerek 20 dakika beklenmiştir. Şahit numune için enzim çözeltisi ilavesi haricindeki bütün işlemler aynı şekilde uygulanmıştır. Mavi bant süzgeç kağıdından süzülen numunelerin spektrofotometrede 275 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür [26].

4.2.7. Protein Tayini

Protein tayini için BCA Yöntemi ve UV Absorbsiyon Yöntemi denenmiştir. Protein Tayinleri sonucu spesifik aktivite hesapları sonucu her iki yöntemde elde edilen sonuçlar birbirine yakın çıktığından çalışmalara UV Absorbsiyon Yöntemi kullanılarak devam edilmiştir.

UV Absorbsiyon Yönteminde, enzim numunelerinin, spektrofotometrede 280 nm'de okunan absorbans değerlerlerinden protein miktarları (mg/ml) hesaplanmıştır. Şahit numune olarak ise çalışmada kullanılan tampon kullanılmıştır. Protein miktarlarının hesabı için BSA standart eğrisi çizilmiştir. Bunun için kullanılan tamponun ml'sinde 0.2-1 mg BSA olacak şekilde çözeltiler hazırlanmış ve kullanılan tampona karşı 280 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Standart eğri Şekil. A.2' de verilmiştir [27].

BCA Yöntemi ile protein tayininde ise 100µl örnek numune 2 ml çözelti C ile karıştırılıp 30 dakika 37ºC'de bekletilmiş ve 562 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Protein miktarının hesabı için BSA standart çözeltileri kullanılarak standart eğri çizilmiştir. Standart eğri için 1 ml distile suda 0.2-1 mg BSA olacak şekilde hazırlanmış olan BSA standart çözeltilerinin 100 µl'si ile çözelti C'nin 2 ml'si karıştırılarak 30 dakika 37ºC'de bekletilmiş ve 562 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre çizilen standart eğri Şekil A.3'de verilmiştir [27].

4.2.8. Aktivite ve Spesifik Aktivite Hesabı

UV spektrofotometrede ölçülen absorbans değerleri aşağıdaki formüller kullanılarak U/ml olarak aktivite değerine ve U/mg olarak spesifik aktivite değerine dönüştürülmektedir.

Aktivite (U/ml) (µmol/dak*ml)= $[Abs_{275,numune} / Abs_{şahit,275(1µmol\ Trosin)}]$* (1/t)*($V_1$/$V_2$)* Seyreltme oranı

Spesifik Aktivite (U/mg) = $[Aktivite_{(U/ml)} / Protein_{(mg/ml)}]$

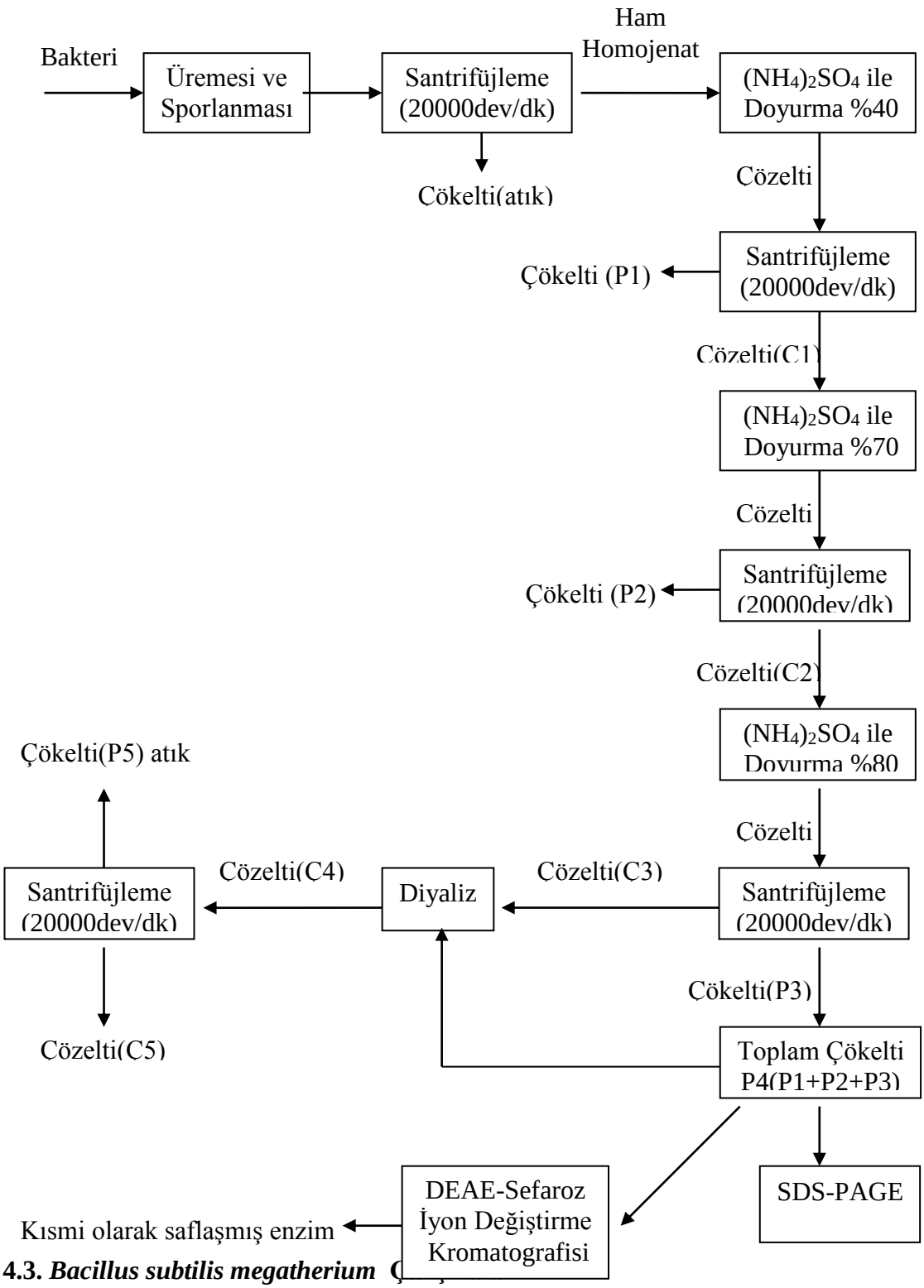
t => Reaksiyon süresi (dak)

V_1 => Reaksiyon Hacmi (ml)

V_2 => Enzim hacmi (ml)

$Abs_{275,numune}$ =>Aktivite tayininde elde edilen absorbans değerleri

$Abs_{şahit,275(1µmol\ Trosin)}$ => Trosin standart eğrisinden elde edilen eğim (Abs/µmol.ml^{-1})



4.3. *Bacillus subtilis megatherium* Ç

Bacillus subtilis megatherium türü için 3 ayrı çalışma yapılmıştır.

4.3.1. Çalışma 1

Şekil.4.1. *Bacillus* Türlerinden Proteaz Enzimi Saflaştırma İşlemleri

Bu ilk çalışmada, *Bacillus subtilis megatherium* türünün belli bir zaman aralığı içinde üremesine ve sporlanmasına bağlı olarak, elde edilen proteaz enziminin spesifik aktivitesindeki değişimler incelenmiştir.

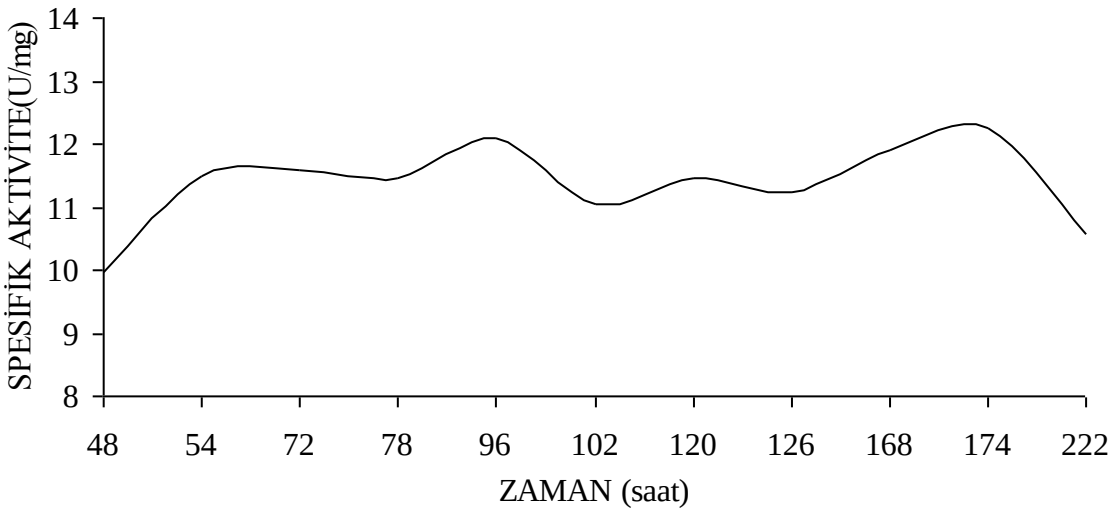
Bu çalışmada besiyeri hazırlanması ve ekim işlemi bölüm 4.2.2'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Yalnızca sıvı besiyerinden 400 ml olacak şekilde hazırlanmış ve 4 tane 250 ml'lik erlene 100'er ml olacak şekilde bölünerek sterilizasyon işlemi için otoklava konulmuştur. *Bacillus subtilis megatherium* türlerinden sıvı besiyerine ekim yapıldıktan sonra erlenler 37°C'deki etüve kaldırılıp üreme ve sporlanma süreleri gözlenmeye başlanmıştır. 48 saat sonunda sabah ve akşam olmak üzere 6 saatte bir 5'er ml numune alınmış ve numune alımı 174 saat sonunda kesilmiştir. Toplanan numuneler santrifüjlenerek çözelti kısımları aktivite ve protein tayinleri için buzdolabına kaldırılmıştır. Erlenlerde kalan çözeltiler de santrifüjlenip çökelti ve çözelti kısımları birbirinden ayrılmış ve aktivite ve protein ölçümleri için 2 gün buzdolabında bekletilmiştir (222.saat). Bu çalışmada bölüm 4.2.6.1'de anlatılan Aktivite Tayin Yöntemi A kullanılmıştır. Protein değerleri çok yüksek çıktığından numuneler Sodyum–Borat Tamponu B (0.01mol/l; pH:10.5) ile 1/20 oranında seyreltilerek ölçümlere devam edilmiştir. Sonuçlar, Tablo 4.1'de, Şekil 4.2'de verilmiştir.

Çalışma 1'de 4 erlenden alınan numunelerin ayrı ayrı ölçümleri yapılmıştır. Tablodaki değerler 4 erlenden alınan numunelerin ortalama değerleridir. Numunelerin ortalama değerlerinden yapılan hesaplamadan çıkan sonuca göre ise en yüksek aktivite 96. ve 174.saatlerde görülmüştür. 174 saatten sonra aktivitede düşüş başlamıştır. 96 ile 174 saat arası üreme ve sporlanma için yeterli ve uygun zaman dilimidir.

Tablo 4.1. *Bacillus subtilis megatherium* türü için spesifik aktivite-zaman değerleri (Çalışma 1)

Zaman(saat)	Aktivite(U/ml)	Protein(mg/ml) (1/20)	Spesifik Aktivite(U/mg)

48	161.8	0.812	9.9
54	153.9	0.67	11.5
72	128.3	0.554	11.6
78	124.3	0.542	11.5
96	114.7	0.474	12.1
102	109.8	0.497	11
120	109.9	0.479	11.5
126	108.7	0.483	11.3
168	115.4	0.485	11.9
174	121.1	0.494	12.3
222	113.6	0.537	10.6



Şekil 4.2. *Bacillus subtilis megatherium* türünün spesifik aktivite-zaman eğrisi(Çalışma 1)

4.3.2. Çalışma 2

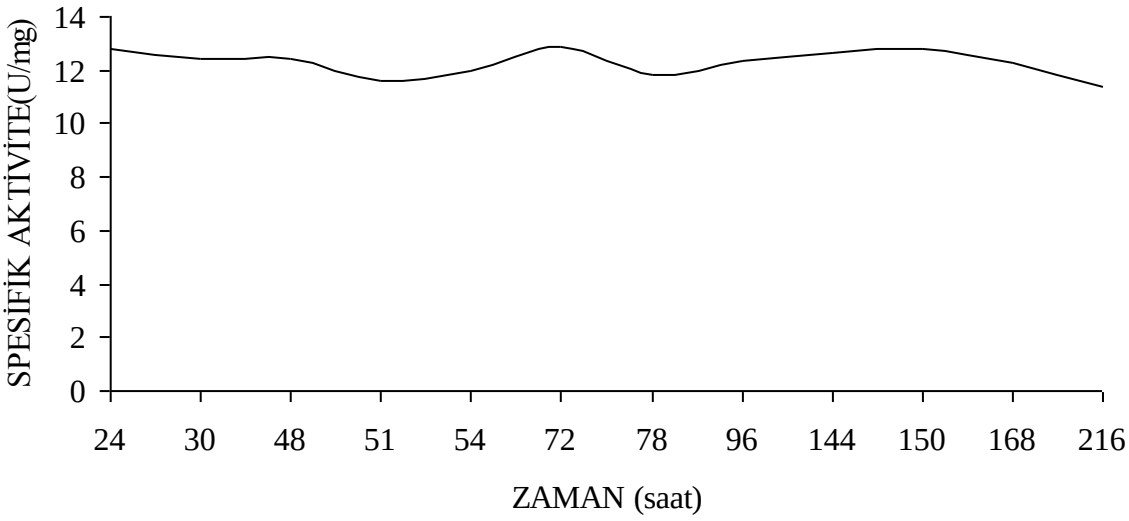
Bu çalışmada öncelikle *Bacillus subtilis megatherium* türünün belli bir zaman aralığı içinde üremesine ve sporlanmasına bağlı olarak, elde edilen proteaz enziminin

spesifik aktivitesindeki değişimler incelenmiştir. Bu inceleme sırasında, daha erken saatlerden başlanarak daha sık aralıklarla numune alınmıştır. Bu işlemden sonra enzim çözeltisine amonyum sülfat ile doyurma işlemi ve diyaliz işlemi uygulanmıştır.

Besiyeri hazırlanması ve ekim işlemi Bölüm 4.2.2'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Yalnızca sıvı besiyerinden 200 ml olacak şekilde hazırlanmış ve 2 tane 500 ml'lik erlene 100'er ml olacak şekilde bölünerek sterilizasyon işlemi için otoklava konulmuştur. *Bacillus subtilis megatherium* türlerinden sıvı besiyerine ekim yapıldıktan sonra erlenler 37°C'lik sıcak odadaki çalkalayıcıda çalkalanarak üreme ve sporlanma süreleri gözlenmeye başlanmıştır. 24 saat sonunda sabah ve akşam olmak üzere 6 saatte bir 5'er ml numune alınmış ve numune alımı 168 saat sonunda kesilmiştir. Toplanan numuneler santrifüjlenerek çözelti kısımları aktivite ve protein tayinleri için buzdolabına kaldırılmıştır. Erlenlerde kalan çözeltiler de santrifüjlenip çökelti ve çözelti kısımları birbirinden ayrılmış ve aktivite ve protein ölçümleri için 2 gün buzdolabında bekletilmiştir (216.saat). Bu çalışmanın tamamında bölüm 4.2.6.1'de anlatılan Aktivite Tayin Yöntemi A kullanılmıştır. Protein değerleri çok yüksek çıktığından numuneler Sodyum–Borat Tamponu B (0.01mol/l; pH:10.5) ile 1/20 oranında seyreltilerek ölçümlere devam edilmiştir. Sonuçlar, Tablo 4.2'de ve Şekil 4.3'de verilmiştir.

Bu sonuçlar elde edildikten sonra erlenlerdeki numuneler santrifüjlenip toplanan diğer numunelerle birleştirilerek (ham homojenat) aktivite ve protein ölçümleri yapılmıştır. Birleştirilen ham homojenatın hacmi ölçülerek amonyum sülfat ile doyurma işlemine geçilmiştir. Doyurma işlemi %40, %70, %80 olmak üzere aşamalı olarak bölüm 4.2.3'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Doyurma işlemi için gerekli amonyum sülfat ilavesinden sonra santrifüjle ayrılan çökelti kısımları (P1, P2, P3), Sodyum–Borat Tamponu C (0.01mol/l; pH:9.3)'nin en küçük hacmi ile çözülmüştür. Doyurma işlemi sonunda Bölüm 4.2.3'de anlatıldığı gibi diyaliz tüpleri şartlandırılmış ve elde edilen toplam çökelti (P4) ve %80'lik doyurma sonrası çözelti (Ç3) kısımlarına diyaliz işlemi uygulanmıştır. P4'ün 5 ml'si 500ml Sodyum–Borat Tamponu C (0.01mol/l; pH:9.3)'ye karşı 1 gece boyunca diyaliz edilmiştir. Diyaliz Nessler reaktifi ile kontrol edilerek sonlandırılmıştır. Diyaliz tüpünden çıkarılan numune Ç4A olarak adlandırılıp hacmi ölçülmüş 20000 devir/dakika hızla 20 dakika boyunca santrifüjlenerek çökelti (P5A) ve çözelti (Ç5A) kısmı birbirinden

ayrılmıştır. Numunelerin santrifüj öncesi ve sonrası aktivite ve protein tayinleri yapılmıştır. Ç3 çözeltisinin de 30 ml'si 3 litre Sodyum–Borat Tamponu C (0.01mol/l; pH:9.3)'ye karşı 1 gece boyunca diyaliz edilmiştir. Diyaliz, Nessler reaktifi ile kontrol edilerek sonlandırılmıştır. Diyaliz tüpünden çıkarılan numune Ç4B olarak adlandırılıp hacmi ölçülmüş 20000 devir/dakika hızla 20 dakika boyunca santrifüjlenerek çökelti (P5B) ve çözelti (Ç5B) kısmı birbirinden ayrılmıştır. P5A ve P5B kısımları atılmıştır. Numunelerin santrifüj öncesi ve sonrası aktivite ve protein tayinleri yapılmıştır. Sonuçlar, Tablo 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3. *Bacillus subtilis megatherium* türü için spesifik aktivite-zaman eğrisi(Çalışma 2)

Tablo 4.2.*Bacillus subtilis megatherium* türü için spesifik aktivite-zaman değerleri (Çalışma 2)

Zaman(saat)	Aktivite(U/ml)	Protein(mg/ml) (1/20)	Spesifik Aktivite(U/mg)
24	105.4	0.412	12.8
30	95.7	0.385	12.4
48	95.2	0.383	12.4
51	91.2	0.394	11.6
54	94.5	0.395	11.9
72	100.8	0.392	12.9
78	98.8	0.418	11.8
96	104.1	0.421	12.4
144	99.6	0.393	12.7
150	101	0.396	12.8
168	99.4	0.404	12.3
216	97.7	0.43	11.4

Tablo 4.2'de verilen değerler 2 erlenin ortalama değerleridir. Spesifik aktivite değerlerinin 168 saat sonuna kadar yaklaşık 12 U/mg civarında olduğu ve bu saatten sonra düşmeye başladığı görülmüştür. Çalkalanarak üreme yapıldığından dolayı Çalışma 1'e göre daha yüksek ve zamana göre daha kararlı olduğu görülen bir spesifik aktivite elde edilmiştir.

Tablo 4.3. *Bacillus subtilis megatherium* türünden elde edilen proteaz enziminin kısmi saflaştırılması (Çalışma 2)

BSM Substrat: Kazein	Hacim (ml)	Protein (1/20) (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Ham Homojenat	126	0.475	98.8	1197	12452	10.4
%40 doyurma (Ç1)	129.5	0.378	102.5	979	13269	13.6
%40 doyurma (P1)	6.5	0.657	77.4	85.4	503	5.9
%70 doyurma (Ç2)	131	0.361	86.8	945.8	11372	12.1
%70 doyurma (P2)	6.7	0.369	53.3	49.4	357	7.2
%80 doyurma (Ç3)	130	0.311	81.7	808.6	10623	13.1
%80 doyurma (P3)	6.5	0.324	44.1	42.1	286	6.8
Toplam çökelti (P4)	19.7	0.418	40.6	164.7	799	4.9
Diyaliz sonrı,santr,önc (Ç4A)	7	0.227	2.4	31.8	16.6	0.5
Diyaliz sonr,santr,öncsi (Ç4B)	74	0.036	1.3	53.3	94.3	1.8
Diyaliz sonr,santr,sonr (Ç5A)	5	0.093	1.6	9.3	8.19	0.8
Diyaliz sonr,santr,sonr (Ç5B)	67	0.016	3.5	21.4	231	10.8

Çalışma 2'de yapılan saflaştırma işlemlerinde ham homojenatın spesifik aktivitesi 10.5 U/mg olup %80'lik doyurma sonrası çözeltinin spesifik aktivitesi 13.1 U/mg olarak hesaplanmıştır. Çökelti kısmının ise %80'lik doyurma sonrası spesifik aktivitesi 6.8 U/mg olduğu görülmüştür. Buna göre enzimin büyük kısmı çözelti kısmında kalmış ve doyurma ile çökelti kısmına geçirilememiştir. Çözelti kısmına göre doyurma sonrası 1.3 kat saflaştırma sağlanmıştır. Çökelti ve çözelti kısmına

uygulanan diyaliz işlemi sonucunda ise spesifik aktivite kaybedilmiş ve saflaştırma sağlanamamıştır.

4.3.3. Çalışma 3

Bu çalışmada sporlanma koşulları, aktivite tayin yöntemi ve kullanılan tampon değiştirilmiştir. Enzim çözeltisine amonyum sülfat ile doyurma işlemi uygulanmıştır.

Besiyeri hazırlanması ve ekim işlemi Bölüm 4.2.2'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Yalnızca sıvı besiyerinden 800 ml olacak şekilde 1000 ml'lik erlene hazırlanmış ve sterilizasyon işlemi için otoklava konulmuştur. *Bacillus subtilis megatherium* türünden sıvı besiyerine ekim yapıldıktan sonra erlen 1 gün süre ile 37°C'deki etüve kaldırılmış ve sporlanması için oda koşullarında 4 gün süre ile bekletilmiştir. Tüm numune santrifüjlenerek çözelti kısmı (ham homojenat) aktivite ve protein tayini için buzdolabına kaldırılmıştır. Bu çalışmanın tamamında bölüm 4.2.6.2'de anlatılan Aktivite Tayin Yöntemi B kullanılmıştır. Protein değerleri çok yüksek çıktığından numuneler Tris-HCl Tamponu (0.5mol/l; pH:7.2) ile 1/20 oranında seyreltilerek ölçümlere devam edilmiştir. Sonuçlar, Tablo 4.4'de verilmiştir.

Ham homojenatın hacmi ölçülerek amonyum sülfat ile doyurma işlemi uygulanmıştır. Doyurma işlemi %40, %70, %80 olmak üzere aşamalı olarak bölüm 4.2.3'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Doyurma işlemi için gerekli amonyum sülfat ilavesinden sonra santrifüjle ayrılan çökelti kısımları (P1, P2, P3), Tris-HCl Tamponu (0.5mol/l; pH:7.2)' nun en küçük hacmi ile çözülmüştür. Sonuçlar, Tablo4.4'de verilmiştir. Elde edilen toplam çökelti, özelliklerinin incelenmesi ve molekül ağırlığı tayini için saklanmıştır.

Tablo 4.4. *Bacillus subtilis megatherium* türünden elde edilen proteaz enziminin kısmi saflaştırılması (Çalışma 3)

BSM Substrat: Kazein	Hacim (ml)	Protein (1/20) (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Ham Homojenat	700	0.777	194.5	10878	136111	12.5
%40 doyurma (Ç1)	730	0.641	146.5	9359	106921	11.4
%40 doyurma (P1)	35	0.36	54.5	252	1908	7.6
%70 doyurma (Ç2)	660	0.697	173.6	9201	114566	12.5
%70 doyurma (P2)	35	0.422	57.1	295	1997	6.8
%80 doyurma (Ç3)	635	0.626	168.4	7950	106915	13.5
%80 doyurma (P3)	21	0.47	81.8	197	1717	8.7
Toplam çökelti (P4)	91	0.273	44.9	496	4094	8.3

Bu çalışmada ham homojenatın spesifik aktivitesi 12.5 U/mg ve %80'lik doyurma sonrası spesifik aktivite ise 13.5 U/ mg dır. Buna göre doyurma sonrası çözeltiye göre 1.08 kat saflaştırma sağlanmıştır. Enzimin büyük kısmı çözelti kısmında kalmış çökelti kısmına geçirilememiştir.

4.4. *Bacillus polymxa* Çalışması

Bu tür için tek çalışma yapılmıştır. Enzim çözeltisine amonyum sülfat ile doyurma

işlemi ve iyon değiştirme kromatografisi işlemi uygulanmıştır. Amonyum sülfat ile doyurma işleminden sonra elde edilen toplam çökeltinin (P1, P2, P3) bir kısmı özelliklerinin incelenmesi ve molekül ağırlığı tayini için saklanmıştır.

Besiyeri hazırlanması ve ekim işlemi Bölüm 4.2.2'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Sıvı besiyeri 800 ml olacak şekilde 1000 ml'lik erlene hazırlanmış ve sterilizasyon işlemi için otoklava konulmuştur. *Bacillus polymxa* türünden sıvı besiyerine ekim yapıldıktan sonra erlen 1 gün süre ile 37°C'deki etüve kaldırılmış ve sporlanması için oda koşullarında 4 gün süre ile bekletilmiştir. Tüm numune santrifüjlenerek çözelti kısmı (ham homojenat) aktivite ve protein tayini için buzdolabına kaldırılmıştır. Bu çalışmanın tamamında bölüm 4.2.6.2'de anlatılan Aktivite Tayin Yöntemi B kullanılmıştır. Protein değerleri çok yüksek çıktığından numuneler Tris-HCl Tamponu (0.5mol/l; pH:7.2) ile 1/20 oranında seyreltilerek ölçümlere devam edilmiştir.

Ham homojenatın hacmi ölçülerek amonyum sülfat ile doyurma işlemi uygulanmıştır. Doyurma işlemi %40, %70, %80 olmak üzere aşamalı olarak bölüm 4.2.3'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Doyurma işlemi için gerekli amonyum sülfat ilavesinden sonra santrifüjle ayrılan çökelti kısımları (P1, P2, P3), Tris-HCl Tamponu (0.5mol/l; pH:7.2)'nun en küçük hacmi ile çözülmüştür. Sonuçlar, Tablo 4.5'de verilmiştir.

Enzim çözeltisi DEAE-Sefaroz iyon değiştiriciden geçirilmiştir. Kolon yüksekliği 30 cm, çapı 2 cm'dir. Kolon öncelikle Tris-HCl Tamponu (0.5mol/l; pH:7.2) ile 3ml/dk hızla 30 dakika boyunca yıkanmıştır. Daha sonra toplam çökelti P4'ün 10 ml'si içindeki safsızlıkları gidermek için ince bir filtreden geçirilmiş ve sonra kolona beslenmiş ve akış hızı 1ml/dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Numune beslendikten sonra 1M NaCl içeren Tris-HCl Tamponu (0.5mol/l; pH:7.2) 150 dakika boyunca kolondan geçirilmiştir. Toplanan numuneler protein ve aktivite tayini için buzdolabına kaldırılmıştır. Elde edilen değerler Tablo 4.6'de ve Şekil 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.5. *Bacillus polymxa* türünden elde edilen proteaz enziminin kısmi saflaştırılması

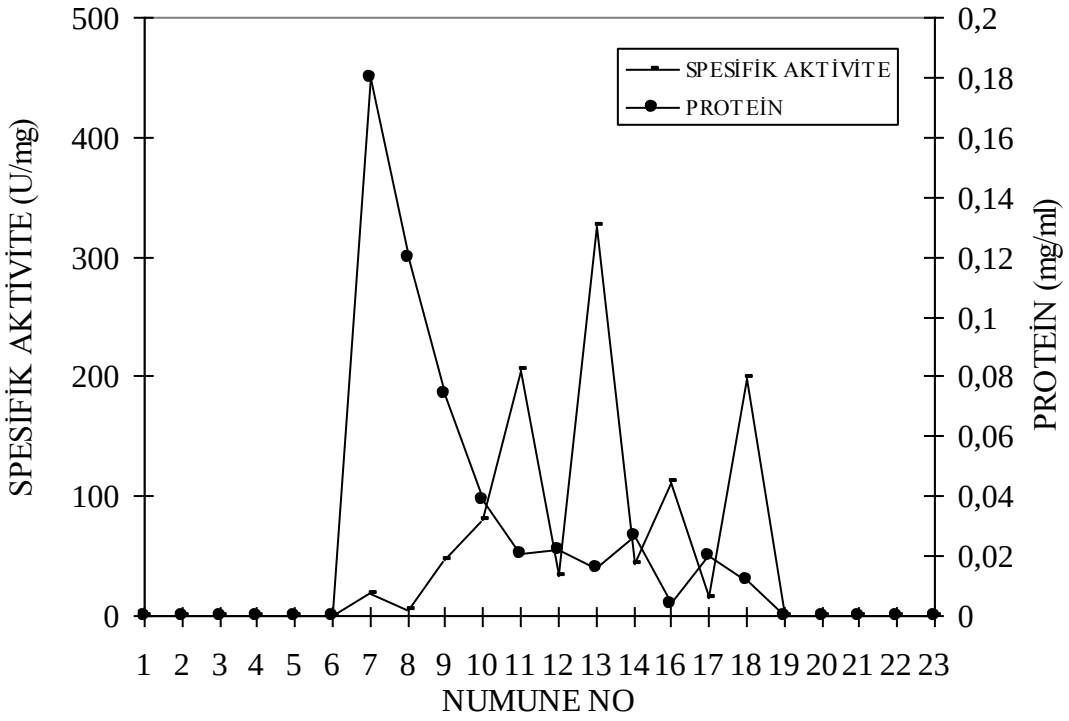
BP Substrat: Kazein	Hacim (ml)	Protein (1/20) (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Ham Homojenat	740	0.662	210	9797.6	155467	15.9
%40 doyurma (Ç1)	720	0.612	195	8812.8	141073	16
%40 doyurma (P1)	30	0.288	52	172	1582	9.2
%70 doyurma (Ç2)	620	0.704	148	8729	92010	10.5
%70 doyurma (P2)	30	0.231	108	138	3267	23.6
%80 doyurma (Ç3)	628	0.571	157	7171	99186	13.8
%80 doyurma (P3)	30	0.351	212	210	6369	30.3
Toplam çökelti (P4)	90	0.248	139	446	12511	28.1

Sonuçlara göre ham homojenatın spesifik aktivitesi 15.9 U/mg, %80'lik doyurma sonrası spesifik aktivite ise 30.3 U/mg olarak hesaplanmıştır. Buna göre kademeli doyurma sonrası yaklaşık 2 kat saflaştırma sağlanmıştır. Enzimin büyük kısmı çökelti kısmına geçirilmiştir.

Tablo 4.6. İyon Değiştirme Kromatografisi Değerleri (*Bacillus polymxa* türü)

Fraksiyon No	Protein (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Fraksiyon No	Protein (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)
1	0	0	0	**13**	0.022	0745	33.9
2	0	0	0	**14**	0.016	5.215	325.9
3	0	0	0	**15**	0.027	1.192	44.1
4	0	0	0	**16**	0.004	0.447	111.8
5	0	0	0	**17**	0.02	0.298	14.9
6	0	0	0	**18**	0.012	2384	198.7
7	0	0	0	**19**	0	0	0
8	0.18	3.278	18.2	**20**	0	0	0
9	0.12	0.596	5.0	**21**	0	0	0
10	0.074	3.427	46.3	**22**	0	0	0
11	0.039	3.129	80.2	**23**	0	0	0
12	0.021	4.321	205.8				

İyon değiştirme kromatografisi uygulanan *Bacillus polymxa* türünden elde edilen doyurma sonrası çökelti kısmı numunesinin spesifik aktivitesi 161.4 U/mg olarak hesaplanmıştır. Bu değer, kolonda elde edilen fraksiyonların en yüksek aktivite gösterdiği numunelerin ortalama değeridir. Ham homojenatın spesifik aktivitesi 15.9 U/mg, %80'lik doyurma sonrası spesifik aktivite ise 30.3 U/mg'dır. Kolon uygulaması sonunda ham homojenata göre yaklaşık 10 kat, %80'lik doyurma sonrasına göre ise yaklaşık 5.5 kat saflaştırma gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.4. İyon Değiştirme Kromatografisi Spesifik Aktivite-Protein-Fraksiyon Değerleri

Şekil 4.4 incelendiğinde protein eğrisinin 10 ile 19. fraksiyonlar arasında spesifik aktivite eğrisinin içinde kaldığı görülmektedir. Buna göre,bu fraksiyonlar arasında numune proteaz enzimi aktivitesi göstermiştir. Protein eğrisinin spesifik aktivite eğrisi altında pik vermemesinin sebebi ise kolona beslenen numunenin yeteri kadar saf olmamasıdır.

4.5. Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması

Yapılan çalışmalarda aktivite ölçümleri için Aktivite Tayin Yöntemi A ve Aktivite Tayin Yöntemi B olarak isimlendirilen iki farklı yöntem kullanılmıştır. Elde edilen ham homojenatların her iki yöntemle hesaplanan spesifik aktivitelerinin karşılaştırılması *Bacillus subtilis megatherium* için Tablo 4.7'de *Bacillus polymxa* için Tablo 4.8'de verilmiştir. Sonuçlara göre, spesifik aktiviteler yaklaşık birbiriyle aynı çıkmaktadır. Bu sebepten her iki yöntemde kullanım açısından uygundur.

Tablo 4.7. Aktivite Tayin Yöntemi Karşılaştırma Değerleri (*Bacillus subtilis megatherium*)

	Hacim (ml)	Protein 1/20 (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Aktivite Tayin Yöntemi A	690	0.83	218.8	11454	150947	13.2
Aktivite Tayin Yöntemi B	690	0.777	193.8	10723	133756	12.5

Tablo 4.8. Aktivite Tayin Yöntemi Karşılaştırma Değerleri (*Bacillus polymxa)*

	Hacim (ml)	Protein 1/20 (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Aktivite Tayin Yöntemi A	600	0.741	200	8892	120011	13.5
Aktivite Tayin Yöntemi B	600	0.662	180.3	7944	108174	13.6

4.6. *Bacillus subtilis megatherium* ve *Bacillus polymxa* Türlerinden Elde Edilen Proteaz Enziminin Bazı Özelliklerinin İncelenmesi

Bu çalışmada *Bacillus subtilis megatherium* türü için Çalışma 3'den elde edilen toplam çökelti numunesinde, *Bacillus polymxa* türü için ise Bölüm 4.4'de anlatılan çalışmadan elde edilen toplam çökelti numunesinde bulunan proteaz enziminin bazı özellikleri incelenmiştir.

4.6.1. Enzim Aktivitesi Üzerine pH Etkisi

Bir reaksiyonun optimum koşullarını belirlemede en önemli parametrelerden bir tanesi pH etkisidir. Enzimler belli bir pH aralığında aktivite gösterirler. Bu çalışmada pH etkisi iki şekilde incelenmiştir.

• Optimum pH

• pH Kararlılığı

4.6.1.1. Optimum pH

Yapılan çalışmada kullanılan substratın (Süt Kazeini Substrat çözeltisi B) pH değerleri 4 ile 10 değiştirilmiştir. Aktivite Tayin Yöntemi B ile aktivite ölçümleri yapılmıştır. *Bacillus subtilis megatherium* ve *Bacillus polymxa* türünden elde edilen proteaz enzim numuneleri, pH'ları ayarlanan substrat çözeltileri ile Aktivite Tayin Yöntemi B'de belirtilen miktarlarda reaksiyona sokulmuş ve yöntemde belirtildiği gibi reaksiyon tamamlanmıştır. Şahit numunelerde ise, Süt Kazeini Substrat çözeltisi B, enzim yerine substrat ile aynı pH'daki tampon (Tris-HCl Tamponu) ve TCA Çözeltisi B kullanılmıştır. Çalışılan pH değerlerinde enzimin bozunarak aminoasit oluşturup oluşturmadığı, oluşturması durumunda aktivite üzerine etkisi kontrol edilmiştir. Kontrol amacı ile optimum pH çalışmaları subtrat yerine distile su kullanılarak tekrarlanmış ve çalışılan pH değerlerinde bozunma olmadığı gözlenmiştir.

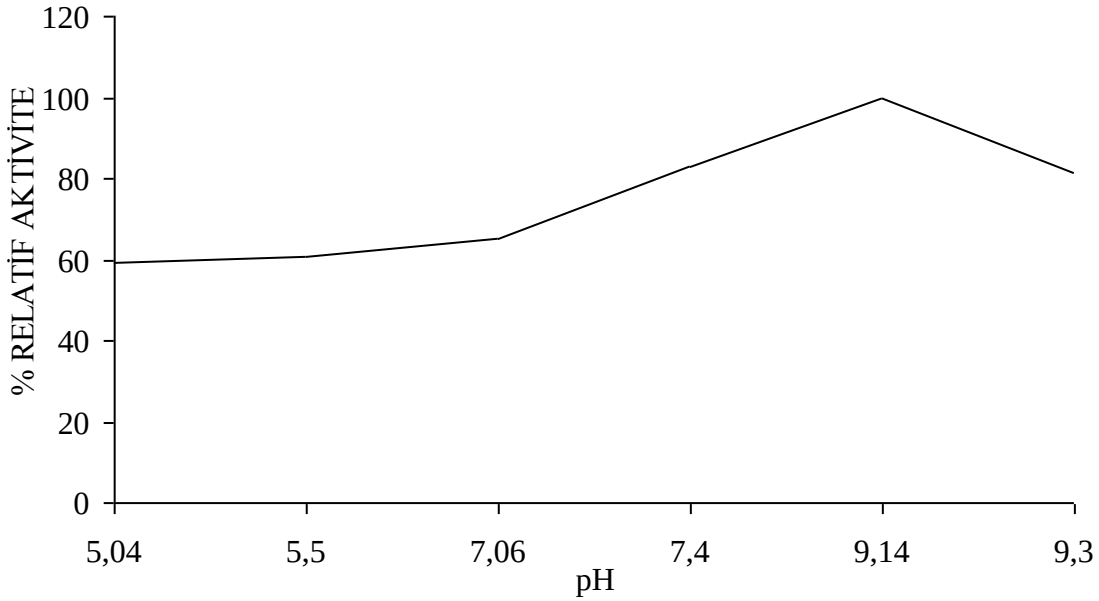
Bacillus subtilis megatherium türünden elde edilen proteaz enzimi için elde edilen değerler Tablo 4.9'da ve Şekil 4.5'de verilmiştir.

Bacillus polymxa türünden elde edilen numune için yapılan çalışmanın sonuçları ise Tablo 4.10'da ve Şekil 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.9. Optimum pH (*Bacillus subtilis megatherium* türü)

pH	Aktivite (U/ml)	Relatif Aktivite (%)
5.04	42.4	59.5
5.5	43.3	60.8
7.06	46.3	65
7.4	59.3	83.2
9.14	71.2	100
9.3	57.9	81.3

Elde edilen sonuçlara göre *Bacillus subtilis megatherium* türünden elde edilen enzim numunesinin optimum pH değeri 9.14 olarak belirlenmiştir.

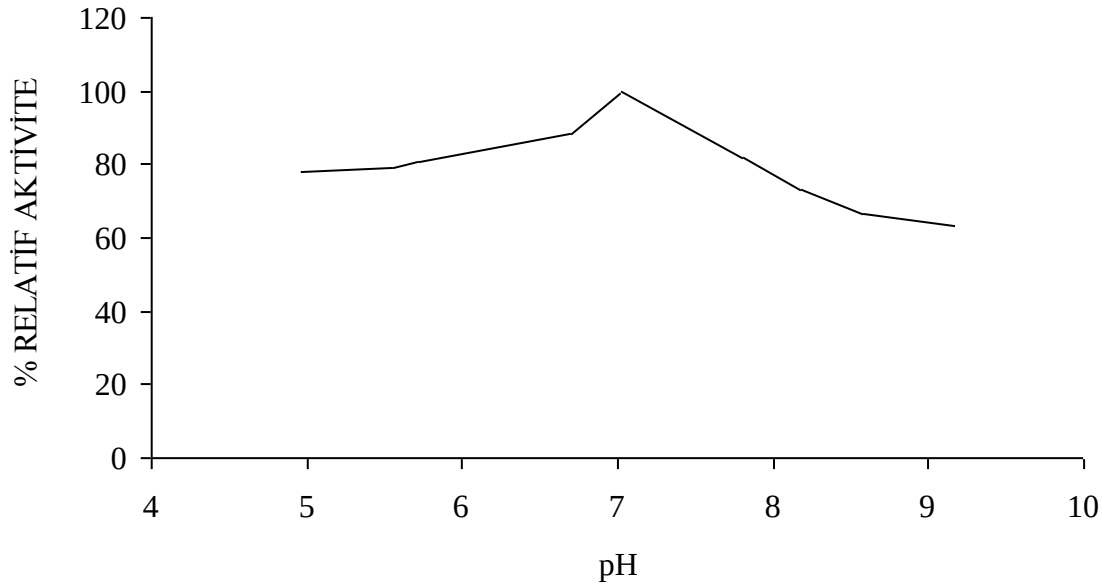


Şekil 4.5. Optimum pH (*Bacillus subtilis megatherium* türü)

Tablo 4.10. Optimum pH (*Bacillus polymxa* türü)

pH	Aktivite (U/ml)	Relatif Aktivite (%)
4.96	87.4	78.1
5.56	88.6	79.2
5.72	90.5	80.9
6.7	98.7	88.2
7.02	111.9	100
7.81	91.2	81.6
8.18	81.5	72.9
8.58	74.5	66.6
9.18	70.7	63.2

Bacillus polymxa türünden elde edilen numunenin en yüksek aktivite verdiği pH değeri ise 7.02'dir.



Şekil 4.6. Optimum pH (*Bacillus polymxa* türü)

4.6.1.2. pH Kararlılığı

pH kararlılığını belirlemek üzere yapılan bu işlemde kullanılan Tris-HCl tamponunun pH değeri 4 ile 10 arasında değiştirilmiştir. Tüplerin her birine farklı pH değerlerindeki tampon çözeltisinden ve elde edilen proteaz enziminden 1:1(hacim/hacim) oranında eklenmiştir. Bu tüpler, 30°C sıcaklığa ısıtılmış etüvde 24 saat bekletilmiştir. Relatif aktivite hesabı (%) için refarans numune hazırlanmıştır. Bunun için enzim numuneleri 1:1 (hacim/hacim) oranında Tris-HCl Tamponu (0.5mol/l; pH: 7.2) ile seyreltilmiş ve 24 saat buzdolabında bekletilmiştir. Bütün numunelerin, bu süre sonunda Aktivite Tayin Yöntemi B ile aktivite ölçümleri yapılmıştır. Şahit numunelerde ise, Süt Kazeini Substrat çözeltisi B, enzim çözeltisi yerine distile su ve TCA Çözeltisi B kullanılmıştır.

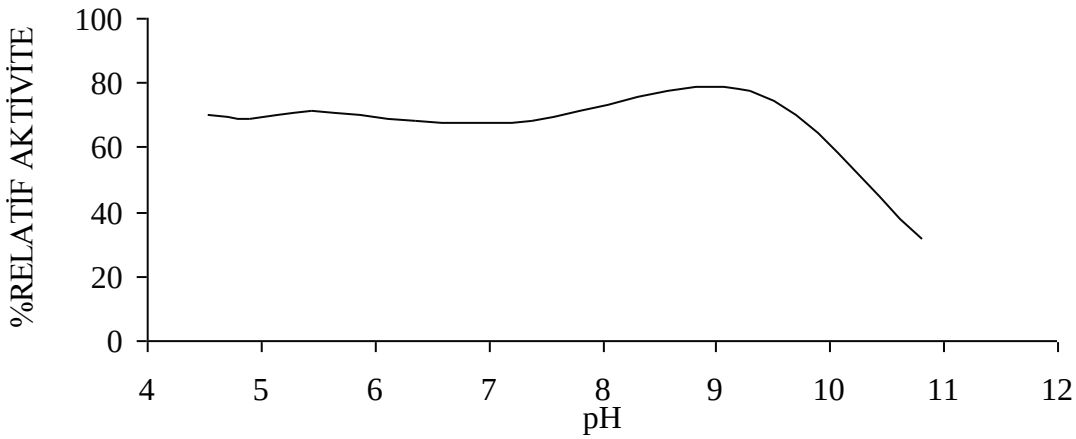
Enzim numunelerinin değişik pH değerleri arasında kendi kendine bozunarak aminoasit oluşturup oluşturmadığı ve bozunması durumunda aktivite değerlerine etkisi kontrol edilmiştir. Bu işlem için enzim numuneleri, pH değeri 4 ile 10 arasında değiştirilmiş Tris-HCl tamponu ile 1:1 (hacim/hacim) oranında seyreltilerek 30ºC sıcaklığa ısıtılmış etüvde 24 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda Aktivite Tayin Yöntemi B ile aktivite ölçümleri yapılmıştır. Substrat yerine distile su kullanılmıştır. Şahit numunelerde ise, Süt Kazeini Substrat çözeltisi B yerine distile su, enzim çözeltisi yerine distile su ve TCA Çözeltisi B kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda *Bacillus subtilis megatherium* türünden elde edilen proteaz enziminin pH 10'dan sonra, *Bacillus polymxa* türünden elde edilen proteaz enziminin pH 9'dan sonra bozunma gösterdiği belirlenmiştir.

Bacillus subtilis megatherium türünden elde edilen numune için sonuçlar Tablo 4.11'de ve Şekil 4.7'de verilmiştir.

Bacillus polymxa türünden elde edilen numune için yapılan çalışmanın sonuçları ise Tablo 4.12'de ve Şekil 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.11. pH Kararlılığı (*Bacillus subtilis megatherium* türü)

pH	Aktivite (U/ml)	Relatif Aktivite(%)
(referans)	44.9	100
4.53	31.5	70
4.9	31	69
5.45	32	71
6.35	30.7	68
7.38	30.6	68
9.3	34.9	78
10.8	14.3	32

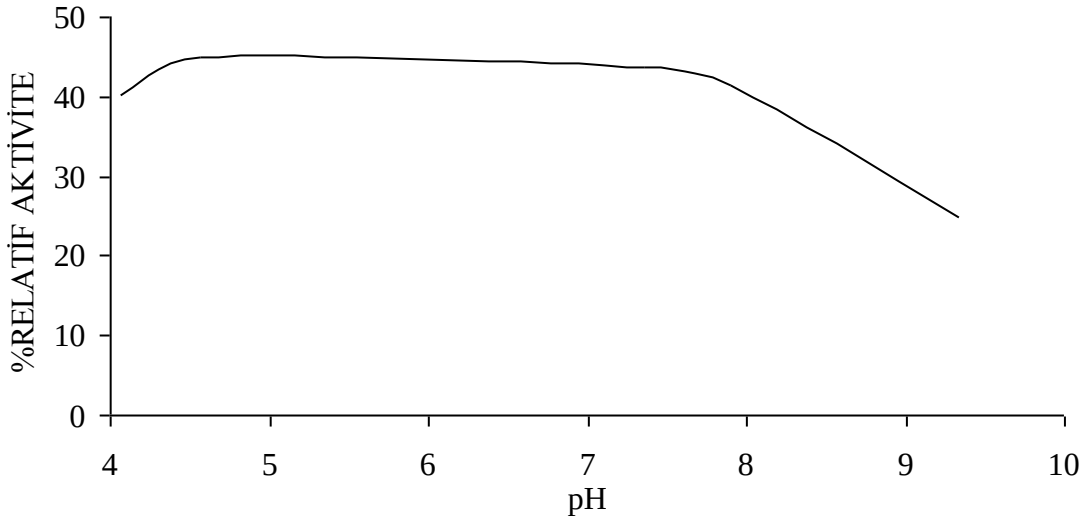


Şekil 4.7. pH Kararlılığı (*Bacillus subtilis megatherium* türü)

Tablo 4.11 ve Şekil 4.7 incelendiğinde *Bacillus subtilis megatherium* türünden elde edilen numunenin 4.53 ile 7.38 arasında pH değerinim kararlı olduğu, bu değerler dışında sapma gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 4.12. pH Kararlılığı (*Bacillus polymxa* türü)

pH	Aktivite (U/ml)	Relatif Aktivite (%)
(referans)	139	100
4.06	55.8	40
4.57	62.4	45
7.36	60.7	44
7.9	57.6	41
9.33	34.7	25



Şekil 4.8. pH Kararlılığı (*Bacillus polymxa* türü)

Bu değerler ve grafik incelendiği zaman numunenin, 4.57 ile 7.36 değerleri arasında sapla gösterdiği, bu değerler dışında ise kararlı kaldığı görülmektedir.

4.6.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi

Sıcaklık etkisi iki şekilde incelenmiştir.

- Optimum Sıcaklık
- Sıcaklık Kararlılığı

4.6.2.1. Optimum Sıcaklık

Optimum sıcaklık, enzimin farklı sıcaklıklarda aktivite tayini ile belirlenmiştir. Aktivite Tayin Yöntemi B kullanılmış ve su banyosu 30ºC yerine 10ºC ile 70ºC arasında değiştirilmiştir. Şahit numunelerde, Süt Kazeini Substrat çözeltisi B, enzim yerine çalışılan sıcaklıktaki Tris-HCl Tamponu ve TCA Karışım Çözeltisi B kullanılmıştır.

Elde edilen enzim numunelerinin çalışılan sıcaklıklarda bozunarak aminoasitlere parçalanıp parçalanmadığı, parçalanması durumunda ölçülen aktivite değerlerine etkisinin ne kadar olduğu kontrol edilmiştir. Kontrol amacı ile Aktivite Tayin Yöntemi B kullanılmış ve su banyosu 30°C yerine 10°C ile 70°C arasında değiştirilmiştir. Yöntemde kullanılan Süt Kazeini Substrat çözeltisi B'nin yerine distile su kullanılmıştır. Şahit numunelerde, substrat yerine distile su, enzim yerine çalışılan sıcaklıktaki Tris-HCl Tamponu ve TCA Karışım Çözeltisi B kullanılmıştır.

Elde edilen sonuçlarda enzim numunesinin 70°C sıcaklıkta bozunmaya uğradığı görülmüştür.

Bacillus subtilis megatherium türünden elde edilen numune için sonuçlar Tablo 4.13'de ve Şekil 4.9'da verilmiştir.

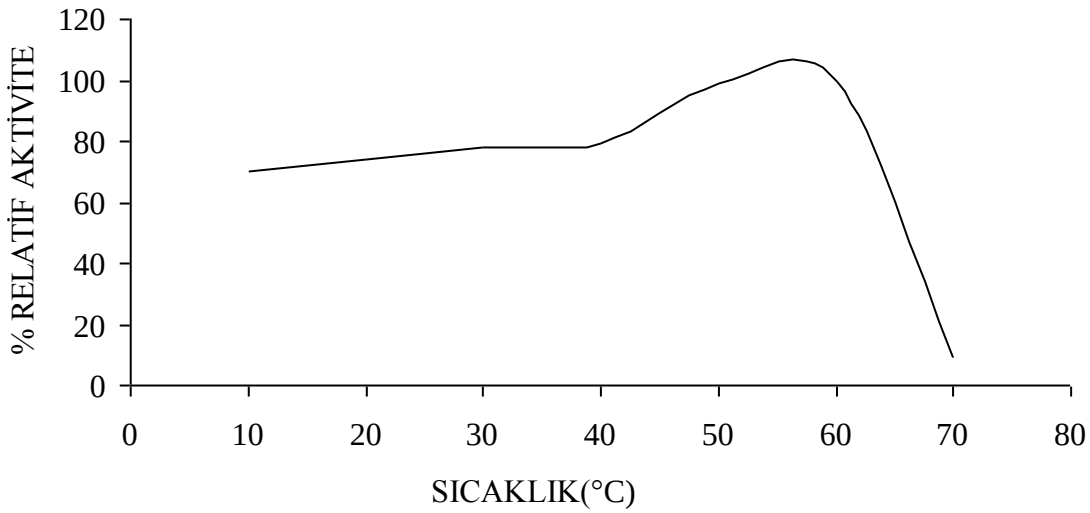
Bacillus subtilis megatherium türü için optimum sıcaklık 60°C civarındadır.

Bacillus polymxa türünden elde edilen numune için yapılan çalışmanın sonuçları ise Tablo 4.14'de ve Şekil 4.10'da verilmiştir.

Bacillus polymxa türünden elde edilen numune için optimum sıcaklık 60°C olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.13. Optimum Sıcaklık (*Bacillus subtilis megatherium* türü)

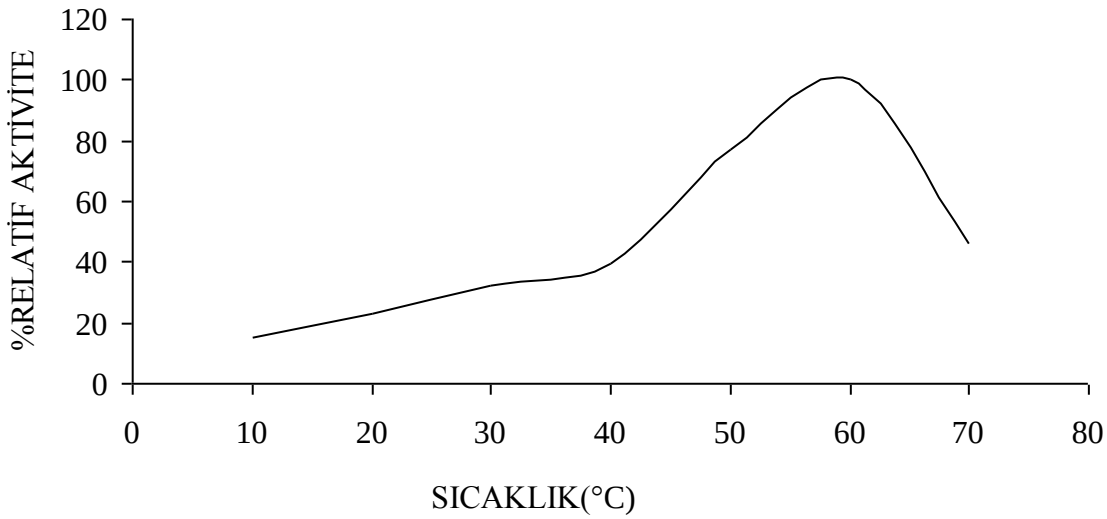
Sıcaklık (°C)	Aktivite (U/ml)	Relatif Aktivite (%)
10	36	70
20	38,1	74,2
30	40,1	78
40	40,8	79,3
50	50,9	99
60	51,4	100
70	4,6	8,9



Şekil 4.9. Optimum sıcaklık (*Bacillus subtilis megatherium* türü)

Tablo 4.14. Optimum Sıcaklık (*Bacillus polymxa* türü)

Sıcaklık (°C)	Aktivite (U/ml)	Relatif Aktivite (%)
10	48,4	14,9
20	74,7	23
30	104	32
40	128,5	39,6
50	250,4	77,2
60	324,6	100
70	149,1	46



Şekil 4.10. Optimum Sıcaklık (*Bacillus polymxa* türü)

4.6.2.2. Sıcaklık Kararlılığı

Sıcaklık kararlılığını belirlemek için, enzim numunelerinin her birinden 0.5'er ml tüplere konulmuş ve bu tüpler 0°C ile 70°C'ler arasına ayarlanan etüvlerde 15 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda 5 dakika oda sıcaklığında soğutulup Aktivite Tayin Yöntemi B kullanılarak aktivite tayinleri yapılmıştır. Şahit numunelerde, Süt Kazeini Substrat çözeltisi B, enzim yerine çalışılan sıcaklıktaki Tris-HCl Tamponu ve TCA Karışım Çözeltisi B kullanılmıştır.

Elde edilen enzim numunelerinin çalışılan sıcaklıklarda bozunarak aminoasitlere parçalanıp parçalanmadığı, parçalanması durumunda ölçülen aktivite değerlerine etkisinin ne kadar olduğu kontrol edilmiştir. Kontrol amacı ile Aktivite Tayin Yöntemi B kullanılmış ve enzim numunelerinin her birinden 0.5'er ml tüplere konulmuş ve bu tüpler 0°C ile 70°C'ler arasına ayarlanan etüvlerde 15 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda 5 dakika oda sıcaklığında soğutulup Aktivite Tayin Yöntemi B kullanılarak aktivite tayinleri yapılmıştır. Yöntemde kullanılan Süt Kazeini Substrat Çözeltisi B'nin yerine distile su kullanılmıştır. Şahit numunelerde, substrat yerine distile su, enzim numunesi yerine Tris-HCl Tamponu ve TCA Karışım Çözeltisi B kullanılmıştır.

Elde edilen sonuçlarda enzim numunesinin 70°C sıcaklıkta bozunmaya uğradığı görülmüştür.

Bacillus subtilis megatherium türünden elde edilen numune için sonuçlar Tablo 4.15'de ve Şekil 4.11'de verilmiştir.

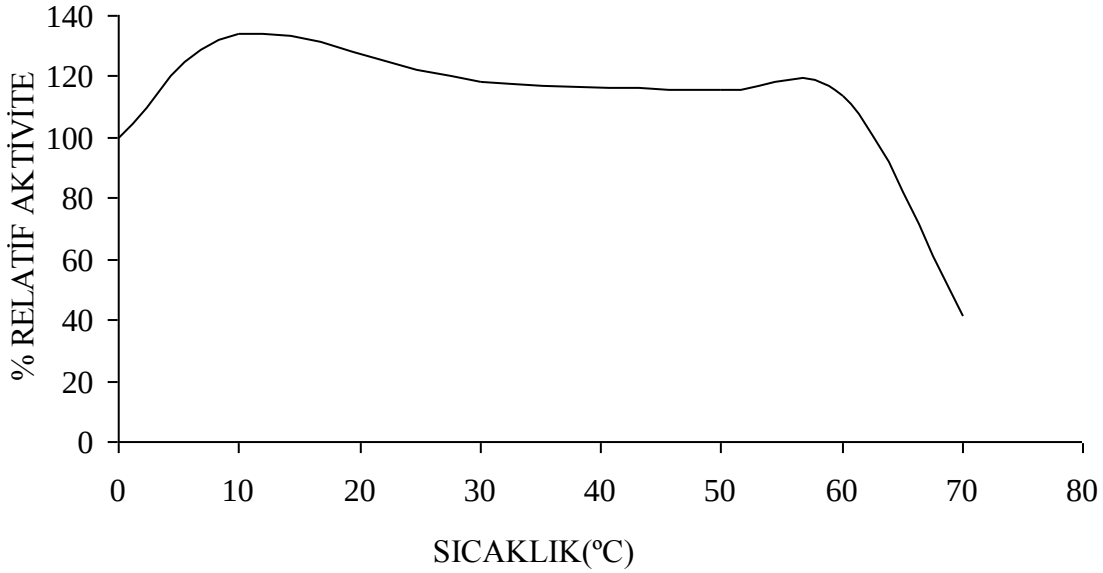
Bu sonuçlara göre *Bacillus subtilis megatherium* türü için sıcaklık, 30-60°C arasında kararlı kalmıştır.

Bacillus polymxa türünden elde edilen numune için yapılan çalışmanın sonuçları ise Tablo 4.16'da ve Şekil 4.12'de verilmiştir.

Bacillus polymxa türü için sıcaklığın kararlı olduğu aralık 30-60°C olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.15. Sıcaklık Kararlılığı (*Bacillus subtilis megatherium* türü)

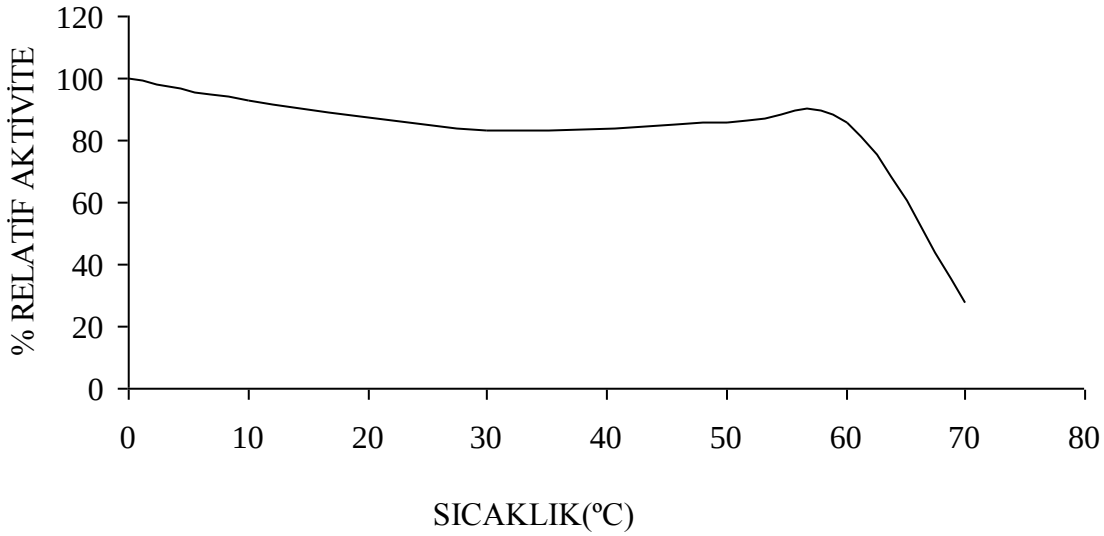
Sıcaklık(°C)	Aktivite(U/ml)	Relatif Aktivite(%)
0	34.7	100
10	46.5	133.8
30	41.1	118.3
50	40.1	115.4
60	39.5	113.8
70	14.4	41.5



Şekil 4.11. Sıcaklık Kararlılığı (*Bacillus subtilis megatherium* türü)

Tablo 4.16. Sıcaklık Kararlılığı (*Bacillus polymxa* türü)

Sıcaklık(ºC)	Aktivite(U/ml)	Relatif Aktivite(%)
0	109.5	100
10	101.6	92.8
30	91.1	83.2
50	94.2	86
60	93.8	85.6
70	30.5	27.8



Şekil 4.12. Sıcaklık Kararlılığı (*Bacillus polymxa* türü)

4.6.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi

Bu çalışmada amaç, metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine olan etkisini belirlemektir. Metal iyonları etkisi iki şekilde olmaktadır.

- Aktivatör

- İnhibitör

Bu etkiyi incelmek üzere, belirlenen metal iyonlarının 1mM'lık çözeltileri hazırlanmıştır. Aktivite Tayin Yöntemi B'de kullanılan %0.6'lık Süt Kazeini Substrat çözeltisinden, konsantrasyonları %0.3; %0.15; %0.075 olacak şekilde 3 ayrı substrat çözeltisi daha hazırlanmıştır. Aktivite Tayin Yöntemi B kullanılmış ancak reaksiyon süresi 1 dakika olarak yapılmışıtr. Öncelikle tüplere 100'er µl hazırladığımız 1 mM'lık çözeltilerden konulmuş ve 2.5 ml'ye substrat çözeltisi ile tamamlanmıştır. Üzerine enzim çözeltisi ilave edilerek reaksiyon gerçekleştirilmiş ve durdurma çözeltisi ile reaksiyon durdurulmuştur. Aynı işlem bir kezde çözelti ilavesi olmadan yapılmıştır ve metal iyonlarının etkisi bu değerlere göre hesaplanmıştır.

4.6.3.1. Aktivatör Etkisi

Aktivatör olarak belirlenen $MnCl_2$, $FeCl_2$ ve $CaCl_2$ tuzlarının *Bacillus subtilis megatherium* ve *Bacillus polymxa* türlerinden elde edilen numunelerin aktiviteleri üzerindeki etkileri incelenmiştir ve *Bacillus subtilis megatherium* türü için sonuçlar Tablo 4.17'de *Bacillus polymxa* türü için ise Tablo 4.18'de verilmiştir.

$MnCl_2$ *Bacillus subtilis megatherium* türünden elde edilen proteaz enzimi için iyi bir aktivatör olduğu görülmüştür. $FeCl_2$ ve $CaCl_2$ tuzlarının ise aktivatör etkisinin çok az olduğu hatta inhibitör etkisi gösterdiği belirlenmiştir. *Bacillus polymxa* türünden elde edilen proteaz enzimi için ise $MnCl_2$, $FeCl_2$ ve $CaCl_2$ tuzlarının iyi birer aktivatör olduğu görülmüştür.

Tablo 4.17. Aktivatör Etkisi (*Bacillus subtilis megatherium* türü)

Substrat konsantrasyonu (%)	Relatif Aktivite (%) (Katkısız)	Relatif Aktivite (%) ($MnCl_2$)	Relatif Aktivite (%) ($FeCl_2$)	Relatif Aktivite (%) ($CaCl_2$)
0.6	100	111	97	106
0.3	100	114	107	93
0.15	100	106	90	86
0.075	100	115	109	93

Tablo 4.18. Aktivatör Etkisi (*Bacillus polymxa* türü)

Substrat konsantrasyonu (%)	Relatif Aktivite (%) (Katkısız)	Relatif Aktivite (%) ($MnCl_2$)	Relatif Aktivite (%) ($FeCl_2$)	Relatif Aktivite (%) ($CaCl_2$)
0.6	100	127	128	109
0.3	100	130	118	116
0.15	100	114	113	96
0.075	100	132	112	106

4.6.3.2. İnhibitör Etkisi

İnhibitör olarak belirlenen $CuCl_2$ ve EDTA tuzlarının *Bacillus subtilis megatherium* ve *Bacillus polymxa* türlerinden elde edilen numunelerin aktiviteleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. *Bacillus subtilis megatherium* türü için sonuçlar Tablo 4.19'da *Bacillus polymxa* için ise Tablo 4.20'de verilmiştir.

EDTA'nın *Bacillus subtilis megatherium* türünden elde edilen proteaz enzimi için iyi bir inhibitör olduğu görülmüştür.

EDTA *Bacillus polymxa* türünden elde edilen proteaz enzimi için inhibitör etkisi yerine aktivatör etkisi göstermiştir.

Tablo 4.19. İnhibitör Etkisi (*Bacillus subtilis megatherium* türü)

Substrat konsantrasyonu (%)	Relatif Aktivite (%) (Katkısız)	Relatif Aktivite (%) ($CuCl_2$)	Relatif Aktivite (%) (EDTA)
0.6	100	79	77
0.3	100	98	78
0.15	100	110	90
0.075	100	102	90

Tablo 4.20. İnhibitör Etkisi (*Bacillus polymxa* türü)

Substrat konsantrasyonu (%)	Relatif Aktivite (%) (Katkısız)	Relatif Aktivite (%) ($CuCl_2$)	Relatif Aktivite (%) (EDTA)
0.6	100	95	111
0.3	100	94	113
0.15	100	94	102
0.075	100	101	99

4.6.4. Reaksiyon Süresinin ve Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Reaksiyon süresinin ve substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacı ile reaksiyon süresi 10 ile 70 dakika arasında; Substrat konsantrasyonu da %1.2 ile 0.075 arasında değiştirilmiştir. Aktivite Tayin Yöntemi B ile aktivite tayini yapılmıştır.

Bacillus subtilis megatherium türü için sonuçlar Tablo 4.21'de verilmiştir.

Bacillus polymxa türü için elde edilen sonuçlar ise Tablo 4.22'de verilmiştir.

Tablo 4.21. Reaksiyon Süresinin ve Substrat Konsantrasyonunun Etkisi (*Bacillus subtilis megatherium* türü)

	Reaksiyon Süresi (dakika)			
Substrat konsantrasyonu(%)	**10**	**30**	**50**	**70**
0.075	51.1	38.6	22.5	52
0.15	41.4	37	46.3	54.1
0.3	46	40.1	40.8	55
0.6	45.7	45.4	41	52
1.2	68.1	48.3	20.7	55.9

NOT: Tabloda verilen değerler U/ml cinsinden aktivite değerleridir.

Tablo 4.21'de verilen sonuçlara göre reaksiyon süresi ve substrat konsantrasyonu değiştirildikçe aktivite değerleri değişiklik göstermiş ancak 70 dakika reaksiyon süresi uygulandığında bütün konsantrasyonlarda yaklaşık aynı değere ulaşmıştır. Buna göre 70 dakikadan sonra substrat konsantrasyonunun değiştirilmesi aktiviteyi fazla değiştirmemektedir.

Tablo 4.22. Reaksiyon Süresinin ve Substrat Konsantrasyonunun Etkisi (*Bacillus polymxa* türü)

	Reaksiyon Süresi (dakika)			
Substrat konsantrasyonu(%)	**10**	**30**	**50**	**70**
0.075	53.5	55.9	45.1	71.7
0.15	77	90.1	98.2	97.4
0.3	101.5	126.8	144.7	150.2
0.6	104.9	158.1	239.1	219.2
1.2	98.9	181.3	140.8	282.4

NOT: Tabloda verilen değerler U/ml cinsinden aktivite değerleridir.

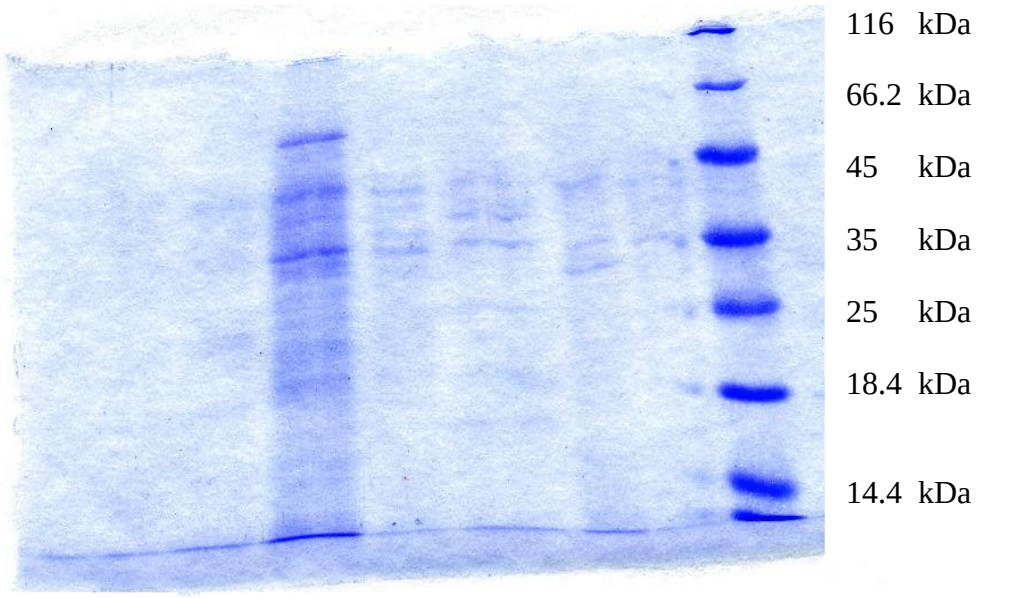
Bacillus polymxa türü için yapılan reaksiyon süresi ve substrat konsantrasyonunun enzim üzerine etkisi çalışmasında bu iki değer değiştirildikçe aktivite değerleri değişmiştir. 70 dakika reaksiyon süresine kadar bir sabitlenme söz konusu olmamıştır. Reaksiyon süresi daha çok uzatılarak bu çalışma devam ettirilebilir.

4.6.5. Molekül Ağırlığı Tayini

Molekül ağırlığı tayini için SDS-PAGE Yöntemi kullanılmıştır. Öncelikle 10µl molekül ağırlığı belirlenecek olan numune ile10µl 2X Örnek Tamponu karıştırılıp tüplere konulup 100°C'de 5 dakika kaynatılmıştır. 10µl Marker da ayrı bir tüpte

kaynatma işlemine tabi tutulmuştur. Kaynatılan numuneler soğutulup buzdolabına kaldırılmış ve jel çözeltileri hazırlığına geçilmiştir. Önce ayırımın yapıldığı Ayırıcı Jel Çözeltisi %10'luk olacak şekilde hazırlanmıştır. Bunu için 1.67 ml Monomer çözeltisi; 1.25 ml 4X Ayırıcı Tamponu; 1.97 ml distile su; 50µl %10'luk SDS Çözeltisi; 30µl %10'luk APS Çözeltisi birbirine iyice karıştırılır ve en son polimerleşmeyi sağlayacak olan 10µl TEMED ilave edilmiştir. Bu karışım fazla bekletilmeden sıkıştırılmış iki cam plaka arasına donması tamamlanmadan hava kabarcığı yaratılmadan cam plakanın ¾'ü dolacak şekilde dikkatlice dökülmüştür. Jelin tamamen donması tamamlandıktan sonra Yığın Jel Çözeltisi %3'lük olacak şekilde hazırlanmıştır. Bunun için 0.2 ml Monomer çözeltisi; 0.5 ml 4X Yığın Tamponu; 1.26 ml distile su; 20µl %10'luk SDS Çözeltisi; 10µl %10'luk APS Çözeltisi birbirine iyice karıştırılır ve en son polimerleşmeyi sağlayacak olan 5 µl TEMED ilave edilmiştir. Bu çözelti fazla bekletilmeden , donmuş olan ayırıcı jelin üzerine dikkatli bir şekilde dökülmüş ve cam plakalar arasına tarak saplanmış ve bu şekilde jelin donması için bekletilmiştir. Saplanan tarak, jelin üzerinde küçük kuyucuklar açılmasına sebep olacak ve bu kuyucukların içine numune beslenerek elektroforez işleminin başlaması sağlanacaktır. Jelin tamamının donduğundan emin olduktan sonra saplanan tarak dikkatli bir şekilde çıkartılmış ve numuneler ve marker belli bir sıra ile bir enjektör yardımı ile kuyucuklara beslenmiştir. Bu işlem tamamlandıktan sonra numune yüklü plaka, içerisinde tank tamponu dolu olan elektroforez hücresine dikkatlice yerleştirilerek elektroforez işlemi başlatılmıştır. Yaklaşık 2 saat sonunda bu işlem tamamlanmış ve ayırıcı jel kısmı dikkatlice cam plakalar arasından çıkartılarak boyama işlemi için Coomassie Blue Stain çözeltisinin içinde 1 gece boyunca bekletilmiştir. Boyama işleminden sonra jel, Jel Destain çözeltisine alınarak 1 gecede burada bekletilmiştir ve bu çözeltiden çıkartıldıktan sonra 20 dakika kurutulmuştur. Şekil 4.13'de görüldüğü gibi numunelerin yoğun olarak bulunduğu bant aralığı marker ile karşılaştırılarak molekül ağırlığı belirlenmiştir.

Marker içinde bulunan maddeler şunlardır: β-galaktosidaz (116 kDa), Bovin serum albumin (66.2 kDa), Ovalbumin (45kDa), Laktat dehidrogenaz (35kDa), Endonükleaz Bsp 981 (25kDa), β-Laktoglobin (18.4 kDa) ve Lisozim (14.4 kDa).



Şekil 4.13. SDS-PAGE ile Molekül Ağırlığı Tayini (2:*Bacillus subtilis megatherium* 4: *Bacillus polymxa* 7:Marker)

Şekil 4.13'de görüldüğü gibi *Bacillus subtilis megatherium* türünden elde edilen proteaz enziminin molekül ağırlığı 45 kDa civarındadır. *Bacillus polymxa* türünden elde edilen proteaz enzimin molekül ağırlığı ise 35 kDa civarındadır.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Proteaz enziminin *Bacillus subtilis megatherium ve Bacillus polymxa* bakteri türlerinden kısmi saflaştırılması ve özelliklerinin incelenmesi amacıyla ilgili olarak laboratuar ölçeğinde gerçekleştirilen bu çalışmada varılan sonuçlar ve gözlemler ile aşağıdaki sonuçlara varılmıştır.

1.) *Bacillus subtilis megatherium* türü için yapılan Çalışma 1'de üreme ve sporlanma koşulları için yapılan 4 ayrı erlendeki numunelerin ortalama değerlerinden yapılan hesaplamadan çıkan sonuca göre en yüksek aktivite 96. ve 174. saatlerde hesaplanmıştır. 174 saatten sonra aktivite düşmeye başlamıştır. 96 ile 174 saat arası üreme ve sporlanması için yeterli ve uygun zaman dilimleridir.

2.) *Bacillus subtilis megatherium* türü için yapılan Çalışma 2'de üreme ve sporlanma için verilen değerler 2 erlenin ortalama değerleridir. Spesifik aktivite değerlerinin 168 saat sonuna kadar yaklaşık 12 U/mg civarında olduğu ve bu saatten sonra düşmeye başladığı görülmüştür. Çalkalanarak üreme yapıldığından dolayı Çalışma 1'e göre daha yüksek ve zamana göre daha kararlı olduğu görülen bir spesifik aktivite elde edilmiştir.

3.) *Bacillus subtilis megatherium* türü için üreme ve sporlanma sürelerinin belirlenmesi çalışmalarında 174 saatin yeterli bir süre olduğu belirlenmiştir.

4.) Çalışma 2'de yapılan saflaştırma işlemlerinde ham homojenatın spesifik aktivitesi 10.5 U/mg olup %80'lik doyurma sonrası çözeltinin spesifik aktivitesi 13.1 U/mg olarak hesaplanmıştır. Çökelti kısmının ise %80'lik doyurma sonrası spesifik aktivitesi 6.8 U/mg olduğu görülmüştür. Buna göre enzimin büyük kısmı çözelti kısmında kalmış ve doyurma ile çökelti kısmına geçirilememiştir. Çözelti kısmına göre doyurma sonrası 1.3 kat saflaştırma sağlanmıştır. Çökelti ve çözelti kısmına uygulanan diyaliz işlemi sonucunda ise spesifik aktivite kaybedilmiş ve saflaştırma sağlanamamıştır.

5.) *Bacillus subtilis megatherium* türü için yapılan Çalışma 3'de ham homojenatın spesifik aktivitesi 12.5 U/mg ve %80'lik doyurma sonrası spesifik aktivite ise 13.5

U/mg olarak hesaplanmıştır. Buna göre doyurma sonrası çözeltiye göre 1.08 kat saflaştırma sağlanmıştır. Enzimin büyük kısmı çözelti kısmında kalmış çökelti kısmına geçirilememiştir.

6.) *Bacillus polymxa* türü için yapılan saflaştırma çalışmasının sonuçlarına göre ham homojenatın spesifik aktivitesi 15.9 U/mg, %80'lik doyurma sonrası spesifik aktivite ise 30.3 U/mg olarak hesaplanmıştır. Buna göre kademeli doyurma sonrası yaklaşık 2 kat saflaştırma sağlanmıştır. Enzimin büyük kısmı çökelti kısmına geçirilmiştir.

7.) İyon değiştirme kromatografisi uygulanan *Bacillus polymxa* türünden elde edilen doyurma sonrası çökelti kısmı numunesinin spesifik aktivitesi 161.4 U/mg olarak hesaplanmıştır. Bu değer, kolonda elde edilen fraksiyonların en yüksek aktivite gösterdiği numunelerin ortalama değeridir. Ham homojenatın spesifik aktivitesi 15.9 U/mg, %80'lik doyurma sonrası spesifik aktivite ise 30.3 U/mg dır. Kolon uygulaması sonunda ham homojenata göre yaklaşık 10 kat, %80'lik doyurma sonrasına göre ise yaklaşık 5.5 kat saflaştırma gerçekleştirilmiştir. *Bacillus polymxa* türü yüksek aktivitede proteaz enzimi üretimi için uygun bir bakteri türüdür. Bu tür için saflaştırma kademeleri üzerinde çalışmalara devam edilebilir.

8.) *Bacillus polymxa* türüne uygulanan iyon değiştirme kromatografisi sonucu çizilen grafik incelendiğinde, protein eğrisinin 10 ile 19. fraksiyonlar arasında spesifik aktivite eğrisinin içinde kaldığı görülmektedir. Buna göre,bu fraksiyonlar arasında numuneler proteaz enzimi aktivitesi göstermiştir. Protein eğrisinin spesifik aktivite eğrisi altında pik vermemesinin sebebi ise kolona beslenen numunenin yeteri kadar saf olmamasıdır.

9.) İki farklı aktivite tayin yöntemi (Aktivite Tayin Yöntemi A ve Aktivite Tayin Yöntemi B) kullanılmıştır. Ancak yapılan hesaplamalarda spesifik aktiviteler yaklaşık birbiriyle aynı çıkmaktadır. Bu sebepten her iki yöntemde kullanım açısından uygundur.

10.) Elde edilen sonuçlara göre *Bacillus subtilis megatherium* türünden elde edilen enzim numunesinin optimum pH değeri 9.14 olarak belirlenmiştir. Bu değer alkalin sınırlar içindedir. Serin proteazlar alkalin pH değerlerinde yüksek aktivite gösterdiğinden dolayı elde edilen proteaz enziminin serin proteazlar grubuna dahil olduğu söylenebilir [3].

11.)*Bacillus polymxa* türünden elde edilen numunenin en yüksek aktivite verdiği pH değeri ise 7.02' dir. Bu değer nötr pH civarındadır. Metallo porteazlar nötr pH değerlerinde yüksek aktivite gösterdiğinden dolayı, *Bacillus polymxa* türünden elde edilen proteazın metallo proteaz olduğu söylenebilir [3].

12.) *Bacillus subtilis megatherium* türünden elde edilen numunenin 4.53 ile 7.38 arasında pH değerinin kararlı olduğu, bu değerler dışında sapma gösterdiği belirlenmiştir.

13.) *Bacillus polymxa* türünden elde edilen numune için pH kararlılığı değerleri incelendiği zaman numunenin, 4.57 ile 7.36 değerleri arasında sapma gösterdiği, bu değerler dışında ise kararlı kaldığı görülmektedir.

14.) *Bacillus subtilis megatherium* ve *Bacillus polymxa* türü için yapılan çalışmalarda her ikisi için de aktivitenin maksimum değere ulaştığı sıcaklık 60°C olarak belirlenmiştir.

15.) Sıcaklık kararlılığı için yapılan denemeler sonucunda her iki türden elde edilen proteaz enziminin 30-60°C arasında kararlı kaldığı gözlenmiştir.

16.) Metal iyonlarının etkisi incelendiğinde $MnCl_2$ tuzunun, *Bacillus subtilis megatherium* türünden elde edilen proteaz enzimi için iyi bir aktivatör olduğu görülmüştür. $FeCl_2$ ve $CaCl_2$ tuzlarının ise aktivatör etkisinin çok az olduğu görülmektedir. EDTA'nın ise *Bacillus subtilis megatherium* türünden elde edilen proteaz enzimi için iyi bir inhibitör olduğu görülmüştür.

17.) *Bacillus polymxa* türünden elde edilen proteaz enziminin aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi incelendiğinde, $MnCl_2$, $FeCl_2$ ve $CaCl_2$ tuzlarının *Bacillus polymxa* türünden elde edilen proteaz enzimi için iyi birer aktivatör olduğu görülmüştür. EDTA'nın ise inhibitör etkisi yerine aktivatör etkisi göstermiştir.

18.) *Bacillus subtilis megatherium* türü için yapılan reaksiyon süresi ve substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi çalışmasında bu iki değer değiştirildikçe aktivite değerleri değişiklik göstermiş ancak 70 dakika reaksiyon süresi uygulandığında bütün konsantrasyonlarda aktivite değerleri yaklaşık aynı değere ulaşmıştır. Buna göre 70 dakikadan sonra substrat konsantrasyonunun değiştirilmesi aktiviteyi fazla değiştirmemektedir.

19.) *Bacillus polymxa* türü için yapılan reaksiyon süresi ve substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi çalışmasında bu iki değer değiştirildikçe aktivite değerleri değişmiştir. 70 dakika reaksiyon süresine kadar bir sabitlenme söz konusu olmamıştır. Reaksiyon süresi daha çok uzatılarak bu çalışma devam ettirilebilir.

20.) Yapılan molekül ağırlığı tayini deneylerinden çıkan sonuçlara göre *Bacillus subtilis megatherium* türünden elde edilen proteaz enziminin molekül ağırlığı 45 kDa civarında, *Bacillus polymxa* türünden elde edilen proteaz enzimin molekül ağırlığı ise 35 kDa civarındadır.

KAYNAKLAR

[1] Stryer, L., 1981. Biochemistry, Sanfrancisco, Freeman.

[2] Halgas, J., 1992. Biocatalysts in organic synthesis, New York-Tokyo.

[3] Bugg, T., 1996. An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry, Blackwell Science, Oxford, U.K.

[4] Wiseman, A., 1985. Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd Ed.

[5] Rainbow, C., 1963. Biochemistry of Industrial Micro-organisms, London.

[6] Fogarty, W. M., 1990. Microbial Enzymes and Biotechnology, Elsevier Applied Science, London.

[7] Zouari, N. and Jaoua, S., 1999. Production and Characterization of Metalloproteases synthesized concomitantly with δ-endotoxin by *Bacillus thuriningiensis* subsp. *kurstaki* strain grown on gruel-based media, Enzyme and Microbial technology **,25,** 364-371

[8] Price, N. C., Stevens, L., 1982. Fundamentals of Enzymology, Oxford.

[9] Gerhartz, W., 1990. Enzymes ın Industry, Weinheim, Germany.

[10] Yenigün, B., 2000. Domates Filizinden Asit Fosfatazın Kısmi Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü., İstanbul.

[11] Fersht, A., 1998. Structure and Mechanism in Protein Science, Freeman and Company, USA.

[12] Reed, G., 1993. Enzymes In Food Processing, Milwaukee, Wisconsin.

[13] Fersht, A., 1977.Enzyme Structure and Mechanism , Freeman and Company, USA.

[14] Matta, H. and Punj, V., 1998. Isolation and partial characterization of a thermostable extracellular protease of *Bacillus polymxa* B-17, International Journal of Food Microbiology, **42**, 139-145.

[15] Yang, J., Shih, I., 2000. Production and Purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes, Enzyme and Microbial Technology, **26,** 406-413.

[16] Loshon, C. and Setlow, P., 1981. *Bacillus megatherium* spore protease: purification , radioimmunoassay, and analysis of antigen level and localization during growth, sporulation, and spore germination, Journal of Bacteriology, **150**, 303-311.

[17] Kumar, C.G., Tiwari, M.P., Jany, K.D., 1998. Nobel alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus spp.:* Purification and some proporties, Process Biochemistry, **34,** 441-449.

[18] Shimogaki, H., Takeuchi, K., ve diğ., 1991. Purification and proporties of a novel surface-active agent- and alkaline-resistant protease from *Bacillus sp.Y*, Agric.Biol.Chem., **55,** 2251-2258.

[19] Sookkheo, B., Sinchaikul, S., ve diğ., 2000. Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33, Protein Expression and Purification, **20,** 142-151.

[20] Mehrotra, S., Pandey, P.K.,ve diğ., 1998. The production of alkaline protease by a Bacillus species isolate, Bioresource Technology, **67,** 201-203.

[21] Hageman, J.H., Shankweiler, G.W., ve diğ., 1984. Single, chemically defined sporulation medium for *Bacillus subtilis*:growth , sporulation, and extracellular protease production, Journal of Bacteriology, **160,** 438-441.

[22] Sierecka, J.K., 1997. Purification and partial characterization of a neutral protease from a virulent strain of *Bacillus cereus*, İnternational Journal of Biochemistry and Cell Biology, **30, 579-595.**

[23] Trevor, P., 1994. Enzim Bilgisi, Bilim ve Teknoloji Yayınları Çeviri Vakfı.

[24] Doonan, S., 1996. Protein Purification Protocols, Humana Press, New Jersey.

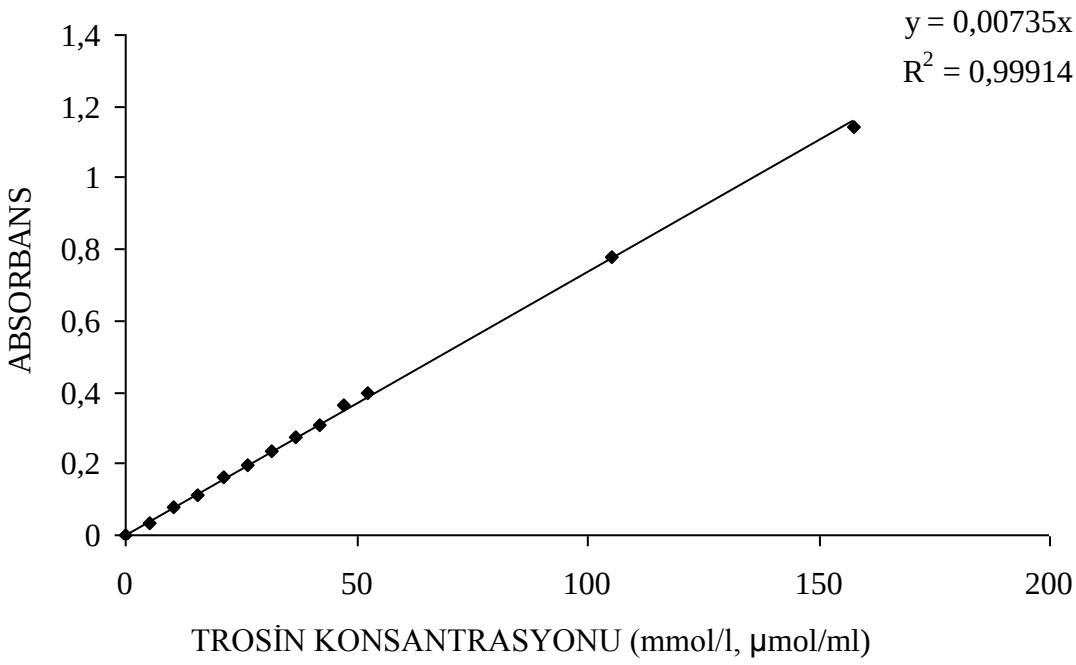
[25] Çetin, E. T., 1965. Pratik Mikrobiyoloji, İsmail Akgün Matbaası, İstanbul.

[26] Jıca., 1995. Enzyme Technology Coursebook, Japan International Cooperation Agency, Osaka, Japan.

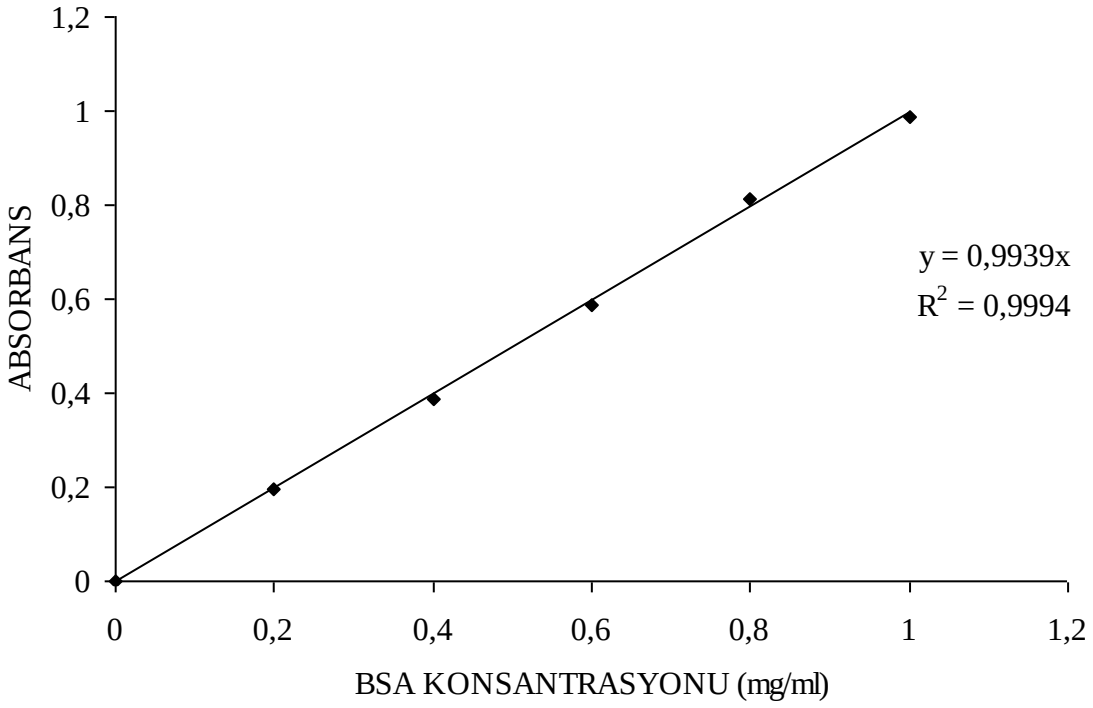
[27] Stoscheck, C. M., 1990. Quantitation of Protein Methods in Enzymology, **182,** 50-69.

EKLER

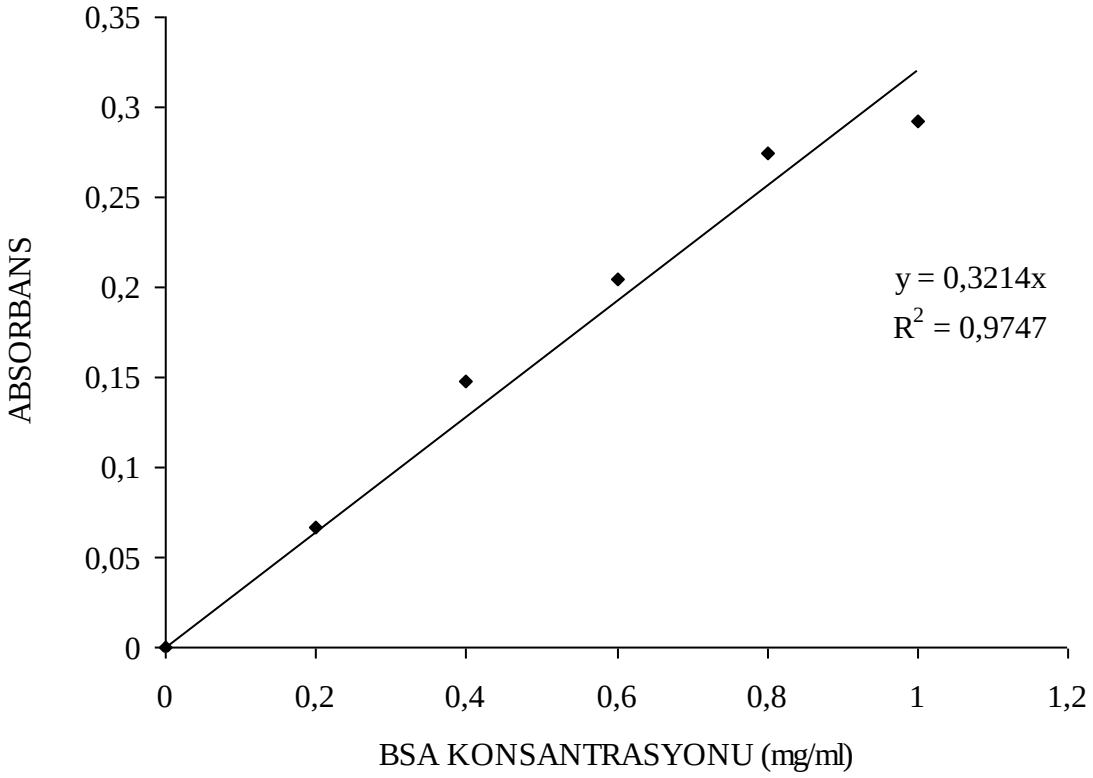
A. Şekiller



Şekil A.1. Trosin standart eğrisi



Şekil A.2. BSA standart eğrisi (280 nm)



Şekil A.3. BSA standart eğrisi (BCA Yöntemi)

ÖZGEÇMİŞ

Ayşe GERZE 1978 yılında İstanbul'da doğdu. İlk öğrenimini İstanbul Şeyhülislam Hayri Efendi İlkokulunda, Orta ve lise öğrenimini İstanbul Fatih Kız Lisesinde başarıyla tamamladı. 1996 yılında Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümüne girdi. 2000 yılında bu bölümden mezun oldu ve aynı yıl İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümünde Yüksek Lisans Eğitimine Başladı. Halen İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Kimya Mühendisliği Programında Yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.