

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***GYPSOPHILA PILULIFERA* BOISS. TÜRÜNDEN ELDE EDİLEN
EKSTRELERİN SAFLAŞTIRILMIŞ ALKALEN PROTEAZ VE
DNA HASARI ÜZERİNE ETKİLERİ İLE ANTİOKSİDAN
KAPASİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sercan ÖZBEK YAZICI

Danışman: Prof. Dr. İsmail ÖZMEN

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ISPARTA-2012
TEZ ONAYI**

TEZ ONAYI

Sercan ÖZBEK YAZICI tarafından hazırlanan “*Gypsophila pilulifera* Boiss.. Türünden Elde Edilen Ekstrelerin Safılaştırılmış Alkalen Proteaz ve DNA Hasarı Üzerine Etkileri İle Antioksidan Kapasitelerinin Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Süleyman Demirel Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. İsmail ÖZMEN
Süleyman Demirel Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri :
Prof. Dr. İsmail ÖZMEN
Süleyman Demirel Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Doç. Dr. Fatma KARİPCİN
Nevşehir Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Doç. Dr. Esengül KIR
Süleyman Demirel Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Yrd. Doç. Dr. Mustafa CALAPOĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Yrd. Doç. Dr. Selma TABUR
Süleyman Demirel Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr. Mehmet Cengiz KAYACAN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER.....	I
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	V
TEŞEKKÜR	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1.GİRİŞ.....	1
1.1.Enzimler.....	3
1.1.1.Enzimlerin genel özellikleri.....	3
1.1.2.Enzimlerin sınıflandırılması.....	4
1.2.Proteazlar	6
1.2.1.Proteazların sınıflandırılması.....	7
1.2.1.1.Protein substralarında aktivite gösterdikleri bölgelere göre proteazlar.....	8
1.2.1.2.Katalitik mekanizmalarına göre proteazlar	9
1.2.1.3.Optimal aktivite gösterdikleri pH'lara göre proteazlar	12
1.2.2.Proteaz kaynakları.....	13
1.2.3.Proteazların kullanım alanları.....	14
1.2.4.Proteaz üretimi.....	17
1.2.4.1. <i>Bacillus</i> hakkında genel bilgiler.....	17
1.2.4.2.Mikroorganizmadan alkalen proteaz üretimi için uygun besiyeri bileşimi ve şartları.....	18
1.2.5.Alkalen proteazın saflaştırması.....	21
1.2.5.1.Tuzla çöktürme.....	23
1.2.5.2.Diyaliz ve Ultrafiltrasyon.....	24
1.2.5.3.Kromatografik teknikler.....	24
1.2.5.4.Protein miktarının belirlenmesi.....	25
1.2.5.5.Proteaz aktivitesinin belirlenmesi	26
1.3.Bitkinin Tanıtılması.....	27
1.4.Saponinler.....	28
1.4.1.Saponinlerin yapısı ve elde edildiği kaynaklar.....	28
1.4.2.Doğal surfaktan olarak saponinler.....	31
1.4.3.Saponinlerin biyolojik aktiviteleri.....	32
1.4.4.Saponinlerin kullanım alanları.....	33
1.4.5.Saponinlerin bitkisel materyalden izolasyonu ve analizi.....	34
1.5.Serbest Radikaller.....	36
1.5.1.Reaktif oksijen türleri.....	38
1.6.Antioksidanlar.....	39
1.6.1.Sentetik antioksidanlar.....	40
1.6.2.Doğal antioksidanlar.....	40
1.6.3.Antioksidan etki mekanizmaları.....	42
1.7.Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	42
1.8.Plazmid DNA.....	43
2.KAYNAK ÖZETLERİ	45
2.1.Alkalen Proteaz Enziminin Mikroorganizmalardan Üretimi ve Saflaştırılması.....	45
2.2.Proteaz Enzim Aktivitesine Çeşitli Surfaktan ve Deterjanların Etkisi	50
2.3.Saponinlerin Antioksidan Özellikleri ve Diğer Biyolojik Etkileri.....	54

3.MATERYAL VE YÖNTEM	59
3.1.Materyal	59
3.2.Yöntem..	59
3.2.1.Besiyerinin Hazırlanması ve Alkalen Proteaz Üretimi.....	59
3.2.2.Alkalen proteazın saflaştırması.	60
3.2.2.1.Amonyum sülfat çöktürmesi.....	60
3.2.2.2.Jel filtrasyon kromatografisi	61
3.2.3.Alkalen proteazın aktivitesinin belirlenmesi.	62
3.2.3.1.Kullanılan çözeltiler ve çözeltilerin hazırlanması.....	62
3.2.3.2.Tirozin standart grafiğinin hazırlanması	63
3.2.3.3.Enzim çözeltisinin aktivitesinin ölçülmesi.....	63
3.2.4.Protein miktarının belirlenmesi.	64
3.2.4.1.Kullanılan çözeltiler ve çözeltilerin hazırlanması.....	64
3.2.4.2.Protein standart grafiğinin hazırlanması	65
3.2.4.3.Protein miktarının ölçülmesi.....	65
3.2.5.SDS-PAGE ile moleküler ağırlığının belirlenmesi	65
3.2.5.1.SDS-PAGE jel yapımında kullanılan çözeltiler ve jelin hazırlanması.....	66
3.2.5.2.Örneklerin elektroforez için hazırlanması ve uygulama işlemi	68
3.2.6. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633'den izole edilen alkalen proteaz aktivitesi üzerine ham saponin ekstresinin etkilerinin belirlenmesi.....	69
3.3.Bitkisel Materyalin Eldesi ve Çözücü İle Ekstraksiyon.....	70
3.4.Saponin İzolasyonu.....	70
3.4.1.İnce tabaka kromatografisi (İTK).....	70
3.4.2.Kolon kromatografisi.....	71
3.5.Antioksidan Aktivite Belirleme Metodları.....	72
3.5.1.Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi.....	72
3.5.2.DPPH radikal giderme aktivitesinin belirlenmesi.....	73
3.5.3.CUPRAC metodu ile indirgeme kapasitesinin belirlenmesi.....	73
3.5.4.Fe ⁺³ -Fe ⁺² indirgeme kapasitesinin belirlenmesi (FRAP).....	74
3.5.5.β- Karoten-Lineolik Asit Metodu.....	75
3.6.Ham Saponin Ekstresinin Plazmid DNA'ya Etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile elirlenmesi.....	76
4.BULGULAR	78
4.1. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633'den Alkalen Proteaz Üretim Bulguları.....	78
4.2. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633'den İzole Edilen Alkalen Proteazın Saflaştırılması.....	79
4.2.1.Alkalen proteazın amonyum sülfat ile çöktürme bulguları.....	79
4.2.2.Alkalen proteazın jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırma bulguları.....	79
4.2.3.SDS-PAGE çalışma bulguları.....	81
4.3.Saflaştırılan Alkalen Proteazın Aktivitesi Üzerine Ham Saponin Ekstresinin Etkisinin Belirlenmesi İle İlgili Çalışma Bulguları.....	82
4.4.Ekstraksiyon Verimi Bulguları.....	82
4.5.Saponin İzolasyon Bulguları.....	82
4.5.1.İnce tabaka kromatografisi (İTK) bulguları.....	82
4.5.2.Kolon kromatografisi bulguları.....	83
4.6. <i>G. pilulifera</i> Türünün Metanol Ekstresinin Antioksidan Aktivite Bulguları.....	84
4.6.1.Toplam fenolik madde miktarı bulguları.....	84
4.6.2.DPPH radikal giderme aktivitesi bulguları.....	85
4.6.3.CUPRAC metodu ile indirgeme kapasitesi bulguları.....	86
4.6.4.İndirgeme gücü kapasitesi (FRAP) bulguları.....	87

4.6.5.β- Karoten- Lineolik Asit Emülsiyon Metodu ile Antioksidan Aktivite	
Bulguları.....	88
4.7.Ham Saponin Ekstresinin Plazmid DNA Üzerine Etkisi.....	88
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	90
5.1. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 Suşundan Alkalen Proteaz Enziminin Üretim.....	90
5.2. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 Suşundan İzole Edilen Alkalen Proteaz	
Enziminin Saflaştırılması.....	91
5.3.SDS-PAGE ile Enzimin Molekül Ağırlığı.....	93
5.4. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 Suşundan İzole Edilen Alkalen Proteaz	
Enzim Aktivitesine Ham Saponin Ekstresinin Etkisi.....	94
5.5.Bitki Ekstraksiyonu ve Kromatografik Tekniklerle Saponin İzolasyonu.....	97
5.6.Ekstrenin Antioksidan Aktivitesi.....	98
5.7.Elde Edilen Ham Saponin Ekstresinin Plazmid DNA Üzerine Etkisi.....	100
6.KAYNAKLAR.....	103

ÖZET

Doktora tezi

***GYPSOPHILA PILULIFERA* BOISS. TÜRÜNDEN ELDE EDİLEN EKSTRELERİN SAFLAŞTIRILMIŞ ALKALEN PROTEAZ VE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİLERİ İLE ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sercan ÖZBEK YAZICI

Süleyman Demirel Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İsmail ÖZMEN

Çalışmanın amacı, *Bacillus subtilis* ATCC 6633'den alkalen proteaz enziminin saflaştırılması ve *Gypsophila pilulifera* Boiss.&Heldr. türünden elde edilen ham saponin ekstresinin saflaştırılan enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesidir.

Çalışmada *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşundan enzim üretimi için nutrient broth besiyeri kullanılmıştır. *Bacillus* suşunun besiyerinde 48 saat inkübasyonu sonrası kültür ortamı santrifüjlenerek hücreler uzaklaştırılmıştır. Kültür üst sıvısındaki proteinler %70 (NH₄)₂SO₄ çöktürmesi ve daha sonra jel filtrasyon kromatografisi ile %7,29 verimde ve 27,2 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim SDS-PAGE analizinde tek band olarak gözlenmiş ve molekül ağırlığının 30,1 kDa olduğu tespit edilmiştir. Doğal surfaktan olan saponinin proteaz enzimi üzerine etkisini incelemek için *G. pilulifera*'den elde edilen ham saponin ekstresi kullanılmıştır. Sonuç olarak ekstre varlığında enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir.

Çalışmada ayrıca, *G. pilulifera*'den elde edilen ham saponin ekstresinin toplam fenolik içeriği ve antioksidan özellikleri araştırılmıştır. Ekstrenin toplam fenolik miktarı Folin-Ciocalteu metoduna ile tespit edilmiş olup 6,5 µg (GAE)/mg (ekstre) olarak bulunmuştur. Antioksidan aktivite değerleri ise; DPPH (1,1-diphenyl-2-picril-hidrazil) radikal giderme aktivitesi, FRAP (demir indirgeme kapasitesi), CUPRAC (bakır indirgeme kapasitesi) ve β-karoten-linoleik asit metodları kullanılarak değerlendirilmiştir. DPPH metodu ile saptanan IC₅₀ değeri 4,56 mg/ml'dir. FRAP metodu kullanarak antioksidan gücü 23,5 µg (troloks)/g (ekstre) iken CUPRAC metodu ile 0,083 mmol(troloks) /kg (ekstre) troloks eş değeri antioksidan kapasitesi olarak bulunmuş ve ekstrenin linoleik oksidasyonunu engellemede yetersiz olduğu saptanmıştır. Sonuçlara göre, tüm metodlarda ekstrenin düşük antioksidan kapasiteye sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca plazmid DNA (pBR322), farklı konsantrasyonlarda ham saponin ekstresi ile inkübe edilmiş ve ekstrenin plazmid DNA yapısı üzerine etkisi jel elektroforez metodu ile araştırılmıştır. Ekstrenin konsantrasyonuna bağlı olarak plazmid DNA süpersarmal yapısının bozulmasına ve diğer formların artışına neden olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Alkalen proteaz, Enzim saflaştırma, *Gypsophila pilulifera* Boiss.& Heldr., Saponin, Surfaktanlar, Antioksidan aktivite, Plazmid DNA

2012, 131 sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY AND EFFECTS ON PURIFIED ALKALINE PROTEASE AND DNA DAMAGE OF EXTRACTS OF *Gypsophila pilulifera* BOISS.

Sercan ÖZBEK YAZICI

Süleyman Demirel University Graduate School of Applied and Natural Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. İsmail ÖZMEN

The aim of the study is purified alkaline protease produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 strain and is investigated the effect of the crude saponin extract obtained from *Gypsophila pilulifera* Boiss.&Heldr. on the purified enzyme.

Alkaline protease production from *Bacillus subtilis* ATCC 6633 strain was carried out in nutrient broth medium and for 48 hour by growth of the *Bacillus* strain. After cultivation, the culture medium was centrifuged to remove cells. The dissolved proteins in the supernatant were precipitated by the addition of ammonium sulphate to 70% saturation. The enzyme was purified 27,2 fold by gel filtration chromatography followed by (NH₄)₂SO₄ precipitation with 7,29% yield. The purified enzyme was showed single band protein on SDS-PAGE and molecular mass was estimated to be 30,1 kDa. To examine the effect of surfactant on the alkaline protease activity, the crude saponin extract from *Gypsophila pilulifera* were used. It was observed that the activity of enzyme increased in the presence of the extract.

In this study, it was also examined to the antioxidant properties and total phenolic content of extract. Total phenolic content was determined by Folin-Ciocalteu method and found as 6,5 µg gallic acid equivalence (GAE)/mg (extract). Antioxidant properties were evaluated by DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) free radical scavenging activity, FRAP (ferric-ion reducing antioxidant parameter), CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) and β-caroten-linoleic acid method. The IC₅₀ value of extract by DPPH assay was 4,56 mg/ml. Reducing power of the extract was found to be 23,5 µg (trolox)/g (extract) by using FRAP method whereas the TEAC value (trolox equivalent antioxidant capacity) determined by the CUPRAC method was 0,083 mmol (trolox) /kg (extract). However, it was found the extract was not effectively able to inhibit the linoleic acid oxidation. The present results are showed that the extract possesses slight antioxidant activity for studied all *in vitro* models. Also, the plasmid DNA (pBR322) was incubated with different concentrations of the crude saponin extract and effect of the extract on plasmid DNA was determined by agarose gel electrophoresis. It was observed that the extract was caused conversion of supercoiled DNA structure to other forms as concentration-dependent.

Key words: Alkaline protease, Enzyme purification, *Gypsophila pilulifera* Boiss.&Heldr., Saponin, Surfactants, Antioxidant activity, Plasmid DNA

2012, 131 sayfa

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince danışmanlığımı yapan, tez çalışmam süresince beni yönlendiren, destekleyen ve yetişmemde büyük katkısı olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İsmail ÖZMEN'e,

Tez çalışmam boyunca bilgi ve yardımını aldığım Umut ÇELİKOĞLU'na,

Zor zamanlarda dostluğunu ve emeğini esirgemeyen canım arkadaşım Buket AŞKIN'a,

Sadece akademik hayatım değil tüm zamanlarda desteğini, emeğini ve sevgisini esirgemeyen canım annem ve kardeşime,

Çalışmalarım süresince sevgi ve destekleri ile beraber anlayışlarını esirgemeyen sevgili eşim Hamit YAZICI ve canım oğlum Tuna'ya teşekkürü bir borç bilirim.

2418-D-10 No'lu Proje ile çalışmamı maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.Peptid bağını hidrolizleyen proteazların reaksiyonu.....	7
Şekil 1.2.Endopeptidazların etki mekanizması	8
Şekil 1.3.Steroid al saponin yapısı	30
Şekil 1.4.Triterpenidal saponin yapısı.....	30
Şekil 1.5. <i>E. coli</i> 'ye ait bazı plazmidler	44
Şekil 1.6.Plazmid DNA formları ve agaroz jeldeki görüntüleri.....	44
Şekil 4.1.Tirozin standart grafiğı	78
Şekil 4.2.BSA standart grafiğı	78
Şekil 4.3. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633'den izole edilen alkalen proteazın, jel filtrasyon kromatografi kolonundan elde edilen elüatların enzim aktivite sonuçları	80
Şekil 4.4. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633'den izole edilen alkalen proteazın, jel filtrasyon kromatografi kolonundan elde edilen elüatların protein miktar sonuçları	80
Şekil 4.5. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633'den izole edilen alkalen proteazın, jel filtrasyon kromatografi kolonundan elde edilen elüatların spesifik aktivite sonuçları	81
Şekil 4.6.Standart protein ve enzimin SDS-PAGE görüntüsü	81
Şekil 4.7.İTK sonucu elde edilen ayırım görüntüsü.....	83
Şekil 4.8.Kolon kromatografisinden elde edilen eluatların İTK görüntüleri	84
Şekil 4.9.Gallik asit standart grafiğı.....	84
Şekil 4.10.BHA'nın DPPH radikali süpürme aktivitesi.....	85
Şekil 4.11. <i>G. pilulifera</i> metanol ekstresinin DPPH radikal giderme aktivitesi	85
Şekil 4.12.Troloks molar absorblama katsayı grafiğı	86
Şekil 4.13. <i>G. pilulifera</i> molar absorblama katsayı grafiğı	86
Şekil 4.14.Troloksun demiri indirgeme kapasitesi.....	87
Şekil 4.15. <i>G. pilulifera</i> metanol ekstresinin demiri indirgeme kapasitesi	87
Şekil 4.16.Linoleik asit peroksidasyonunu engellemede ekstre, BHA ve α -tokoferol'ün zaman karşı absorbsiyon değişim grafiğı	88
Şekil 4.17. <i>G. pilulifera</i> ham saponin eksresinin plazmid DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine etkisini gösteren agoro z jel lektroforez görüntüsü.	89

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.Endüstriyel alanlarda kullanılan bazı enzimler ve uygulama alanları	6
Çizelge 1.2.Proteazların sınıflandırılmaları	9
Çizelge 1.3.Alkalen proteaz elde edilen <i>Bacillus</i> türleri.....	18
Çizelge 1.4.Bazı mikroorganizmalar için optimize edilen alkalen proteaz üretim şartları.	19
Çizelge 1.5.Mikroorganizmalardan elde edilen alkalen proteazları saflaştırılmada uygulanan teknikler	22
Çizelge 1.6.Besin olarak tüketilen saponin içeren bazı bitkiler ve saponin içerikleri	29
Çizelge 1.7.Saponinlerin izole edildiği bazı bitki türleri ve içerdikleri saponin tipleri.....	31
Çizelge 1. 8.Bazı bitkilerin ince tabaka kromatografisi ile saponin analizi.....	36
Çizelge 3.1.İnce tabaka kromatografisinde denenen hareketli faz çözücü karışımları.....	71
Çizelge 4.1. <i>B. subtilis</i> ATCC 6633'den izole edilen alkalen proteazın saflaştırma tablosu	79
Çizelge 4. 2.Alkalen proteaz aktivitesi üzerine ham saponin ekstresinin etkisi	82

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Mg: Miligram
mL: Mililitre
g: Gram
μ: Mikro
M: Molarite
°C: Celcius
kDa: Kilodalton
B.: *Bacillus*
BHA: Bütillenmiş hidroksianisol
BSA: Sığır serum albümini
DEAE: Dietilaminoetil
DNA: Deoksiribonükleik asit
DPPH•: 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali
EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit
EU: Enzim Ünitesi
GAE: Gallik asit eşdeğeri
NB: Nutrient Broth
HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
UV: Ultraviyole
NMR: Nükleer Magnetik Rezonans
İTK: İnce tabaka kromatografisi
MS: Kütle spektrumu
PAGE: Poliakrilamid jel elektroforezi
PMSF: Fenilmetilsülfonilflorid
Rf: Maddenin aldığı yolun çözücünün aldığı yola oranı
ROS: Reaktif oksijen türevleri
SDS: Sodyum dodesil sülfat
sp.: Cins
TCA: Trikloroasetik asit
TEMED: N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin
TLCK: Na-*p*-tosil-L-lisin kloro-metil keton
TPCK: Np-tosil-L-fenil alanin kloro-metil keton fenilglioksal
Troloks: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

1. GİRİŞ

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapısında moleküllerdir. Yapılarındaki aminoasitlerin dizilişi ve buna bağlı olarak kazandıkları üç boyutlu yapı enzimlerin kataliz görevini yapabilmelerini sağlayan en önemli faktördür (Onat vd., 2002).

Canlılarda, oldukça önemli biyokimyasal reaksiyonları katalize eden enzimler günümüzde çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere hayatımıza girmiştir. Enzimler; gıda ürünleri, temizlik malzemeleri ve tıp gibi birçok farklı alanda kullanılmaktadır. Ayrıca in-vitro şartlarda aktif olması, kimyasal katalizörlere göre yüksek katalitik aktivite göstermeleri, fazla miktarlarda üretilibilmeleri, alerjik ya da toksik etkiye sahip olmamaları enzimlerin bu kadar fazla alanda tercih edilme sebeplerindendir (Cheetham, 1995).

Alkalen proteazlar ise yüksek pH değerlerinde aktivite gösterebilen peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Bu özellikleri nedeniyle deterjan sanayi başta olmak üzere gıda, sağlık ve deri endüstrilerinde geniş çapta kullanılmaktadır (Gençkal ve Tari, 2006).

Endüstride kullanılan enzimler, günümüzde genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin tüm dünya genelinde yıllık kullanım oranlarına bakıldığında alkalen proteazın %25 ve diğer proteazların ise %21'lik oran ile endüstriyel alanda oldukça önemli olduğu görülmektedir (Rao et al., 1998). Alkalen proteaz özellikle *Bacillus* cinsine ait alkalifilik mikroorganizmalar tarafından bol miktarda üretilmektedir. Bu sebeple alkalifilik *Bacillus* suşları hem endüstriyel uygulamalar hem de akademik çalışmalarda kullanılmaktadır (Cheetham, 1995; Denizci et al., 2004).

Proteazlar, deterjan endüstrisinde kullanılan önemli enzimlerdendir. Bununla beraber deterjanı oluşturan önemli komponentlerden biri de surfaktanlardır. Genel olarak surfaktanlar suda çözünen yüzey aktif ajanlardır. Bu özellikleri sayesinde deterjanlarda kullanılmakta ve kirlerin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Modern deterjanlarda kullanılan surfaktanlar genelde kimyasal olarak sentez edilmektedir.

Günümüzde ise üstün fonksiyonel özellikleri, geridönüşümlü, çevreye uyumlu, ucuz olması ve insan sağlığını tehdit etmemesi nedeniyle doğal surfaktanlara artan bir ilgi vardır (Fiechter, 1992; Desai and Banat, 1997; Dembitsky, 2004; Ghagi et al., 2011).

Bitkiler önemli doğal surfaktan kaynaklarıdır. Saponinler ise bitkiler âleminde yaygın olarak bulunan doğal surfaktan özellik gösteren biyolojik aktif glikozitlerin bir grubudur (Urum and Pekdemir, 2004; Ghagi et al., 2011). Deterjan ve diğer endüstri alanlarında yüzey aktif ve köpük oluşturma özellikleri nedeniyle saponinleri içeren bitki ekstraktları kullanılmaktadır (San Martin and Briones, 1999).

Saponinin başlıca kaynaklarından biri *Gypsophila* türüdür (Korkmaz, 2007). *G. pilulifera* türünün triterpenoid saponin içerdiği bilinmektedir (Arslan et al., 2012). Pek çok *Gypsophila* türünün kökleri de dâhil olmak üzere sabun ve likör yapımında faydalanılmaktadır.

İnsan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere sahip kimyasallara alternatif arayışı sadece enzim ve doğal surfaktan kaynakları ile sınırlı değildir. Bitkilerden elde edilen fitokimyasallar hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde kullanılmaktadır. Bu amaçla saponin ihtiva eden bitkilerin, uzun zamandır halk arasında hastalıkların tedavi edilmesinde kullanıldığı bilinmektedir (Rao and Sung, 1995). Ayrıca saponin içeren bitkilerin ve saponinlerin farklı biyolojik etkileri olduğu özellikle antioksidan ve antikanserojen özellikleri çalışmalarla gösterilmiştir (Arslan et al., 2012).

Çalışmada triterpenoid saponinin içerdiği bilinen *Gypsophila pilulifera* bitkisinden elde edilen ham saponin ekstresinin antioksidan aktivitesi ve plazmid DNA üzerine etkisi tıpta ve moleküler biyolojide kullanılabilirliğini tespit etmek amacıyla test edilmiştir. Bununla birlikte çalışmada *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşundan alkalen proteaz izole edilmiş ve doğal surfaktan olan saponinin enzim aktivitesi üzerine etkisi ham saponin ekstresinin varlığında araştırılmıştır. Böylece çalışmamızın alkalen proteazın ve ham saponin ekstresinin, daha az maliyet ve yüksek kaliteli deterjan üretiminde kullanımına yönelik çalışmalara katkıda bulunacağına ve uygulamaya yönelik yapılacak araştırmalar için yol gösterici olacağına inanmaktayız.

1.1. Enzimler

1.1.1. Enzimlerin genel özellikleri

Enzimler, genelde sarmal biçimde kıvrılmış yüksek molekül ağırlıklı proteinlerdir. Enzimler, canlı organizmadaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşmasına fırsat vermeden %100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Canlıları oluşturan moleküller, yani biyomoleküller kinetik yönden oldukça kararlı olup, kendiliğinden kolayca reaksiyon vermezler. Bir hücredeki tüm kimyasal olaylar enzimler aracılığı ile gerçekleşir.

Bazı enzimler, katalizleme reaksiyonunu yalnız protein yapılarıyla yerine getirebilirler. Bazıları da katalitik etki gösterebilmek için proteinden başka metal iyonuna, protein olmayan organik bir bileşiğe veya bunların her ikisine ihtiyaç duyarlar. Enzimlerin sahip oldukları bu iyon veya bileşiğe “Kofaktör” adı verilirken, kompleks organik bileşikler (NAD⁺, FAD, Koenzim A gibi) içeren enzimlere ise “Koenzim” olarak adlandırılır. Enzimlerin protein kısmına ise “Apoenzim”, Apoenzim-Koenzim bütününe ise “Haloenzim” adı verilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2007).

Enzimler proteinlerin tüm özelliklerini göstermektedir. Isı ile kolaylıkla denatüre olurlar ve ortamın asidik veya bazik olmasından etkilenirler. Genelde de 50-90 °C’de enzimler denatüre olurlar ve aktivitelerini kaybederler.

Enzimlerde katalitik aktivitenin gerçekleştiği kısım aktif bölge olarak tanımlanmaktadır. Aktif bölge, bağ yapım ya da yıkımında görev yapan rezidüleri kapsamaktadır ve bunlara katalitik grup denir. Enzimlerin katalitik etkileri, molekülü oluşturan aminoasitlerin sayısına ve dizilişine, elektrostatik çekim kuvveti ve disülfid bağları tarafından oluşturulan üç boyutlu sarmal yapısına ve aktif bölgedeki fonksiyonel gruplarının özelliklerine bağlıdır.

Enzimlerle tepkimeye katılan kimyasal moleküllere substrat adı verilir. Enzimatik bir reaksiyonun temel bileşenlerini enzim ve substratlar oluşturur. Enzimin etkisi

öncelikle substrata bağlanıp bir kompleks oluşturması ile başlar (Temizkan vd., 2008). Reaksiyon hızı maddelerin derişimlerine, ortamın sıcaklık, iyonik şiddet, pH'sına ve aktivatör veya inhibitörlerin varlığına bağlıdır. Katalizledikleri reaksiyon sırasında değışikliğe uğrayan enzimler reaksiyonun bitiminde tekrar eski hallerine dönmektedir. Tek bir enzim molekülü birçok substratın ürüne dönüşmesini sağlayabilir.

1.1.2. Enzimlerin sınıflandırılması

Birçok enzimin keşfedilmesi ile sistematik bir isimlendirmeye ihtiyaç duyulmuştur. Enzimler katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve mekanizmalarına göre bir sınıflandırılmıştır. Her enzime dört sayıdan oluşan sınıflandırma numarası verilmiştir. Bu numaralandırmada, birinci rakam enzimin bağlı olduğu grubu gösterirken, ikincisi alt grubu, üçüncüsü alt alt grubu belirtir. Dördüncüsü rakam ise, enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasındaki sırasını göstermektedir.

Enzimler Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından katalizledikleri reaksiyon tipleri temel alınarak altı ana sınıfa ayrılmışlardır (Keha ve Küfrevioğlu, 2007).

1. *Oksidoredüktazlar*: İki substrat arasında redoks reaksiyonunu katalizleyen enzimlerdir. Önceden dehidrogenazlar, oksidazlar, redüktazlar, oksijenazlar gibi geleneksel isimlerle anılan enzimleri kapsar.
2. *Transferazlar*: İki substrat arasındaki aldehit, keton, açıl, fosfat ve kükürt içeren grupların transferlerini katalizleyen enzimlerdir. Örneğin fosforil grubunun transferini sağlayan “kinaz” bu enzim grubundandır.
3. *Hidrolazlar*: Suyun katıldığı parçalanma ve kondenzasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Örnekler: lipazlar, fosfatazlar, amilazlar, glikozidazlar, nükleosidazlar, peptidazlar (proteazlar), amidazlar gibi anılan enzimler bu gruba dâhildir.
4. *Liyazlar*: Çift bağ oluşumunu (hidrolitik olmayan yoldan) ve çift bağa katılma reaksiyonlarını katalizlerler. Etkiledikleri substrattan ya kimyasal bir grubu ayırır ya

da ilave ederler. Önemli örnekler, dekarboksilazlar, aldolazlar, dehidratazlar (fumaraz, akonitaz), karboksilazlar, amonyak-liyazlardır

5. *İzomerazlar*: Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir. Mutaz, rasemaz ve epimeraz özel adlarıyla anılan enzimler bu gruptandır.

6. *Ligazlar*: ATP ve GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir; aminoasitleri aktive eden enzimler, piruvat–karboksilazlar, açılaz CoA-sentazlar.

Enzimler salgılanma şekillerine göre ise hücre içi enzimler (intraselüler) ve hücre dışı (ekstraselüler) enzimler olmak üzere 2 ana sınıfa ayrılırlar. Hücre içi enzimler sitoplâzmaya dağılmış olarak bulunan ribozomlarda sentezlenirler ve düşük moleküler ağırlığa sahip substratlar üzerinde etkilidirler. Hücre dışı enzimler ise besiyeri ve hücre duvarının dışı ile bağlantı halindedirler. Çoğu değişken hücre içi enzimlerin aksine hücre dışı enzimlerin stabilitesi yüksek olup çevre koşullarında aktivitelerini uzun süre koruyabilirler. Önemli ekstraselüler enzimlerin hemen hepsi, yüksek moleküler ağırlığa sahip substratları parçalayan hidrolazlardır.

Enzimlerin insanlık tarihinde kullanılması oldukça eski zamanlara kadar uzanmaktadır. Enzim aktiviteleri için eskiden ya enzim açısından zengin sebzeler ya da mikroorganizmalar kullanılmıştır. Günümüzde farklı alanlarda çeşitli enzimler kullanılmaktadırlar (Çizelge 1. 1)

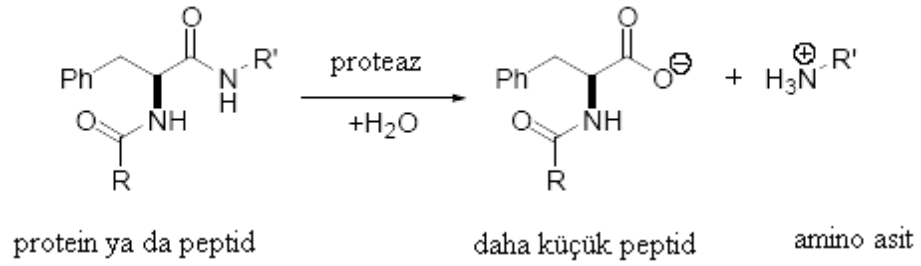
Enzim, kelime anlamı olarak eski Yunanca'da, ilk kez mayalardan elde edildiği için, “mayada bulunan” (in yeast) anlamına gelmektedir. Fakat günümüzde doğada bulunan enzim kaynakları, bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal enzimler olmak üzere 3 grupta toplanabilir (Polaina and MacCabe, 2007). Birçok enzim bitkilerden üretilmektedir. Örneğin, sistein proteinaz enzimi, papatya, incir, ananas gibi bitkilerden elde edilmektedir. Pepsin, tripsin, rennin, katalaz ise hayvansal kaynaklı enzimlerdir. Endüstriyel alanda kullanılan enzimler ise genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir.

Çizelge 1.1. Endüstriyel alanlarda kullanılan bazı enzimler ve uygulama alanları (Kirk, 2002)

Endüstri	Enzim sınıfı	Uygulama alanı
Deterjan	Proteaz	Protein içeren lekelerin giderilmesi
	Amilaz	Nişasta içeren lekelerin giderilmesi
	Lipaz	Yağ içeren lekelerin giderilmesi
	Selülaz	Temizleme
Gıda	Proteaz	Sütün çöktürülmesi, yenidoğan besinlerinde
	Lipaz	Peynir aroması
	Laktaz	Sütten laktozun giderilmesi
	Pektinaz	Meyve suyu üretiminde
Fırıncılık	Amilaz	Ekmeğin yumuşatılması ve kabartılması
	Lipaz	Hamurun işlenebilirliğini kolaylaştırır
	Fosfolipaz	Hamurun elastikiyetini artırır
Tekstil	Selülaz	Pamuk yumuşatma
	Amilaz	Haşıl giderme
	Pektat liyaz	Kir giderme
	Katalaz	Beyazlatma
	Lakkaz	Beyazlatma
	Peroksidaz	Fazla boyanın giderilmesi

1.2. Proteazlar

Proteazlar, proteinlerdeki peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen enzim grubudur. Proteazlar hem hücre içi hemde hücre dışında aktivite gösterirler. Ekstraselüler proteazların temel fonksiyonu besinlerdeki diğer polimerleri parçalayan ekstraselüler enzimlerle benzerdir. Bu enzimler büyük polipeptidleri veya proteinleri hücreler tarafından absorbe edilebilen daha küçük materyallere hidroliz eder. İntraselüler proteazlar ise protein salınması, zimogen aktivasyonu, otoliz, spor germination gibi biyolojik süreçlerde önemli rol oynar (Rao et al, 1998).

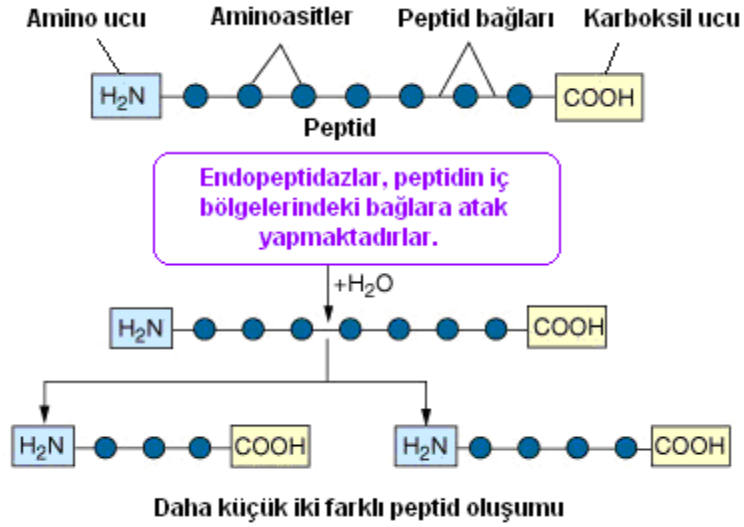


Şekil 1. 1. Peptid bağınyı hidrolizleyen proteazların reaksiyonu

1.2.1. Proteazların sınıflandırılması

Enzimler Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB, 1984) tarafından hidrolazlar grubuna (No:3) dâhil olan proteazlar peptid bağlarının hidrolizini gerçekleştiren 4. alt grup olarak sınıflanmıştır ve bu enzimler için peptidazlar (E.C 3.4) teriminin kullanılması önerilmiştir. Yaygın olarak kullanılan proteaz terimi peptidazla eşanlamlıdır. Ayrıca proteinaz terimi de endopeptidazlar için kullanılmaktadır (Salleh et al., 2006). Buna karşın proteazların sahip oldukları geniş etki ve yapı çeşitlilikleri nedeniyle enzimlerin sınıflandırıldığı genel sistem ile sınıflandırılmaları zordur.

Proteazlar yaygın olarak protein substratlarında aktivite gösterdikleri bölgelere göre endo ve ekzo enzimler olarak sınıflandırılırlar. Ayrıca katalitik mekanizmalarına göre serin proteazlar, aspartik proteazlar, sistein proteazlar ve metalloproteazlar olarak sınıflandırılmıştır. Bunların dışında optimal aktivite gösterdikleri pH'lar göz önüne alınarak asidik, nötral ve alkali proteazlar olarak da gruplandırılmıştır (Barett, 1994; Rao et al., 1998).



Şekil 1. 2. Endopeptidazların etki mekanizması

1.2.1.1. Protein substratlarında aktivite gösterdikleri bölgelere göre proteazlar

Bu sınıflama içinde çoğunlukla 2 ana gruba ayrılmaktadır. Ekzopeptidazlar substratın amino yada karboksil uçlarından peptid bağını hidrolizlerken, endopeptidazlar substratın iç kısmında bulunan peptid bağını hidrolizler. Ekzopeptidazlar, amino ucundan ya da karbonil ucundan katalizleyen türlerine göre Aminopeptidazlar (AP) ve Karboksipeptidazlar (CP) olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.2.). Aminopeptidazlar, amino ucundaki ilk iki kalıntıyı katalizleyen enzimler dipeptidil peptidaz, üç kalıntıyı katalizleyen enzimler tripeptidil peptidaz olarak alt gruplara ayrılmaktadır. Bakteri ve fungusun yer aldığı mikrobiyal türlerin geniş bir çeşidinde bulunurlar. Genellikle hücre içi enzimlerdir. Karboksipeptidazlar, kendi aralarında serin tip, metalloproteaz, sistein tip, dipeptidil dipeptidaz ve dipeptidaz olarak alt sınıflara ayrılmıştır. Omega peptidazlar ise terminal ucunda halkalı yapı ya da izopeptid bulunduran substratların hidrolizini katalizler (Çizelge 1.2) (Rao et al.,1998).

Endopeptidazlar, iç taraftaki peptid bağlarını hidrolizler ve katalitik etki mekanizmalarını göz önüne alınarak serin, sistein, aspartil ve metalloproteaz olmak üzere dört gruba ayrılırlar. Bir kısım endopeptidaz ise aktivite gösterebilmek için ATP'ye ihtiyaç duyarlar (ATP-proteazlar) ve henüz katalitik aktivite mekanizması tanımlanamadığı için farklı bir grup olarak listelenmektedir (Rao et al., 1998).

Çizelge 1. 2. Proteazların sınıflandırılmaları

PEPTİDAZLAR	EC no
EKZOPEPTİDAZLAR	
Aminopeptidazlar	3.4.11
Dipeptidil peptidazlar	3.4.14
Tripeptidil peptidazlar	3.4.14
Karboksipeptidazlar	3.4.16-18
Serin tip proteaz	3.4.16
Metaloproteaz	3.4.17
Sistein tip proteaz	3.4.18
Peptidil dipeptidaz	3.4.15
Dipeptidaz	3.4.13
Omega peptidazlar	3.4.19
ENDOPEPTİDAZLAR	3.4.21 – 3.4.34
Serin proteaz	3.4.21
Sistein Proteaz	3.4.22
Aspartik proteaz	3.4.23
Metaloproteaz	3.4.24
Katalitik mekanizması bilinmeyen Endopeptidazlar	3.4.99

1.2.1.2. Katalitik mekanizmalarına göre proteazlar

Serin Proteazlar

Serin proteazlar, karakteristik olarak molekülün aktif bölgesinde bir serin grubuna sahiptir ve tepkimenin katalizlenmesinde bu grup kullanılır. Serin proteazlar, virüs, bakteri ve ökaryotlarda bulunurlar ve yaşamsal faaliyetler için büyük önem taşırlar.

Serin proteazlar; endopeptidazlar, ekzopeptidazlar, oligopeptidaz ve omegapeptidaz gruplarında bulunur. Birçok substrata karşı spesifik olarak aktif olan serin proteaz enzimlerinin molekül ağırlıkları genelde 18-35 kDa arasındadır ve genellikle nötral ve alkali pH'larda (optimum pH 7-11) aktiftirler. Birçoğunun izoelektrik noktası pH

4-6 arasındadır. Özellikle bazı tiyol bileşikleri tarafından inhibe edilirler. Serin proteazların katalitik bölgesinde üç aminoasit rezidüsü bulunur; serin (nükleofil), aspartat (elektrofil) ve histidin (baz). Farklı enzimlerde bulunan bu rezidülerin geometrik oryantasyonu benzer olsa da proteinlerin katlanmaları birbiriyle aynı olmadığı için tamamen farklı yerlerde konumlanmaktadırlar (Rao et al., 1998, Salleh et al., 2006).

(i) *Serin alkalen proteazlar*: Yüksek alkalen pH'larda aktif olan serin alkalen proteazlar serin proteazların en geniş alt grubunu oluşturmaktadır. Bazı bakteri, maya ve mantarlar tarafından üretilmektedir. Karboksil yan zincirinde bulunan lösin, fenilalin ve trozine sahip peptid bağını hidrolizler. Serin proteazların aktif bölgelerinde birbirine yakın konumda yerleşmiş olarak bulunan Serin (195), Histidin (57) ve Aspartat (102) rezidüleri birbirlerine hidrojen bağı ile bağlanmışlardır.

Alkalen proteazlar, optimal pH 10 civarında aktiftirler ve izoelektrik noktaları pH 9'dur. Moleküler ağırlıkları ise 15-30 kDa arasındadır ve geniş bir substrat özgünlüğüne sahiptirler. Maksimum aktivite için Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} gibi divalent katyonlara ihtiyaç duyarlar ve bu katyonlar aynı zamanda *Bacillus* alkalen proteazlarının termal stabilizasyonunu da sağlamaktadır. Ayrıca serin proteazların en tipik inhibitörü PMSF'dir (fenilmetilsülfonilflorür). (Kumar and Takagi, 1999; Gupta et al., 2002b).

Serin alkalen proteaz endüstriyel enzimlerin en önemlilerindendir. Bu enzim özellikle deterjan endüstrisinde ayrıca gıda, deri ve fotoğraf endüstrisinde kullanılmaktadır (Gupta et al., 2002b)

(ii) *Subtilisinler*: *Bacillus* orjinli *Bacillus* Subtilisinler, serin proteazların ikinci büyük ailesini oluşturmaktadır. Subtilazların katalitik bölgesi Serin (221), Histidin (64), Aspartat (32) oluşturmaktadır. Subtilisin Carlsberg ve Subtilisin Novo veya bakteriyal proteaz Nagase (BPN9) alkalen proteazların iki farklı tipidir. Subtilisin Carlsberg yaygın olarak deterjanlarda kullanılmaktadır. Subtilisin BPN9 ticari olarak daha az önemlidir. Her iki subtilisinde yakın moleküler ağırlıklarına sahip olmakla beraber aminoasit sayıları farklıdır. Subtilisinlerin aktif bölge konformasyonları

tripsin ve kimotripsin ile benzerdir fakat moleküler düzenlemeleri farklıdır (Rao et al, 1998).

Serin proteazlar substrat spesifikliğine göre 3 ana sınıfa ayrılabilirler; tripsin benzeri proteaz, kimotripsin benzeri proteazlar, elastaz benzeri proteazlar. Tripsin benzeri proteaz, lisin ve arginin gibi pozitif yüklü aminosit içeren substratlarda etkili iken elastaz benzeri proteaz küçük alifatik yanzincirli substratları seçer. Kimotripsin benzeri proteaz ise büyük aromatik ve alifatik subtratlarda etkindir (Gupta et al., 2002b).

Bütün serin proteazlar sahip oldukları katalitik merkezlerin yapısına göre substrat spesifitelerini belirlemelerine rağmen serin kalıntısı tarafından belirlenen benzer katalitik mekanizmaya sahiptirler (Whitford, 2005).

Sistein (tiyol) proteazlar

Sistein proteazlar, bitkilerde (papain, aktinidin vs), memelilerde (lizozomal katepsinler, sitosolik kalpainler) ve bazı parazitik proteazlar da (tripanosoma, schistosoma) bulunurlar ve birçoğu papain ailesinin içinde numaralandırılmıştır. Bu tip proteazların yaklaşık 20 alt sınıfı tanımlanmış bulunmaktadır.

Sistein proteazların katalitik aktivitesi sistein ve histidin içeren katalitik bölgeye bağlıdır. Sistein proteazlar, aktif bölgelerinde bir sülfidril grup (sistein-25) ve histidin imidazol grup (Histidin-159) içermektedir. Ayrıca tiyol proteaz olarak da bilinen sistein proteazların aktivitesi enzimde bulunan bir tiyol grubuna bağlıdır. Birçoğunun molekül ağırlığı 20-50 kDa arasındadır ve çoğunlukla nötral pH'da aktif olmalarına rağmen bazıları asidik pH'da aktiftirler (Rao et al., 1998; Salleh et al., 2006).

Aspartik proteazlar

Aspartik proteazlar, yaygın olarak asidik proteaz olarak bilinmektedirler ve katalitik aktiviteleri için aspartik asit rezidülerine ihtiyaç duyan bir endopeptidazdır. Başlıca pepsin (A1), retropepsin (A2) ve pararetrovirüslerden elde edilen enzimler (A3) olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Birçok aspartik proteazlar düşük pH'larda maksimum aktivite göstermektedir (pH 3-4) ve nötral ya da alkali pH'larda

çoğalamazlar. Molekül ağırlıkları, 30-45 kDa ve izoelektrik noktaları pH 3-4,5 arasındadır (Rao et al., 1998). Fungal proteazların çoğu pH=7'nin üzerinde kararsızdır ve bu pH değerlerinde üretimleri gerçekleşmemektedir. Pepstatin tarafından inhibe olurlar (Bugg, 1996).

Metalloproteazlar

Metallo proteazlar, aktiviteleri için iki değerlikli bir metal iyonuna gereksinim duymalarıyla karakterize edilirler ve yaklaşık 30 sınıfı tanımlanmıştır. Bunların 17 tanesi endopeptidaz, 12 tanesi ekzopeptidaz ve biri hem endo hem de ekzopeptidaz sınıfına dâhildir. *Bacillus thermoproteolyticus*'dan elde edilen Thermolysin bu grup enzimden en iyi bilinenlerdendir. İşlev özgünlüklerine göre Nötral, Alkalen, *Myxobacter* I ve *Myxobacter* II olmak üzere dört gruba ayrılırlar. Alkalen metalloproteazlar çok geniş bir spesifiklik gösterirken, nötral metalloproteazlar hidrofobik aminoasitler için spesifiktir. *Myxobacter*, ayrılan bağın her iki tarafındaki küçük aminoasit rezidülerine spesifik iken, *myxobacter* II peptid bağının amino grup tarafındaki lizin rezidüleri için spesifiktir (Rao et al., 1998).

Normal olarak metalloproteazlar için optimum aktivite pH 7-8 arasındadır. Bu proteaz grubu diğer proteaz tipleri ile kıyaslandığında stabilitesi daha azdır ve pH 9'un yukarısında, pH 6'nın aşağısında otolize uğramaktadırlar (Salleh et al., 2006).

1.2.1.3. Optimal aktivite gösterdikleri pH'lara göre proteazlar

Asidik Proteazlar; asidik pH'larda aktivite gösterirler. Bu gruba çoğunlukla aspartik proteazları, bazı sistein proteazları ve metalloproteazlar dâhildir.

Nötral Proteazlar; nötral ve zayıf asidik veya alkalen pH'larda aktivite gösterirler. Sistein proteazlar, metallo proteazlar ve bazı serin proteazlar bu grubu oluşturmaktadır.

Alkalen proteazlar; nötral ve alkali pH aralığında aktif olan proteazlardır. Serin proteazları veya metalloproteazları içermektedir (Rao et al., 1998).

1.2.2. Proteaz kaynakları

Proteazlar, dünyada yaşayan tüm canlıların temel yapı taşlarıdır (Gupta et al., 2002a). Proteazlar, bitki ve hayvansal kaynaklardan elde edilmektedir. Günümüzde gelişen teknoloji ve enzime olan ihtiyacın artması ile birlikte daha ekonomik olması nedeniyle mikrobiyal proteaz kaynaklarına olan ilgi artmıştır (Hood, 2002).

En iyi bilinen bitki kaynaklı proteazlar, papain ve bromelaindir. Papain Afrika ve Hindistan'da yetişen *Carica papaya* meyvesinden elde edilmektedir. Katalitik bölgesi sistein, histidin, asparajin oluşturmaktadır. pH 5-9 arasında aktif olan enzimin molekül ağırlığı 23 kDa'dır ve 80-90 °C sıcaklıkta kararlılığını koruyabilmektedir. Endüstride farklı alanlarda kullanılmakla beraber en çok et endüstrisinde etin yumuşatılmasında kullanılmaktadır. Bromelain ise ananas ağacından elde edilen bir proteazdır. Enzim, bir sistein proteaz olarak karakterize edilir ve pH 5-9 arasında aktiftir. İnaktivasyon sıcaklığı 70°C olup papainin inaktivasyon sıcaklığından daha düşüktür (Polgar, 1990; Rao et al., 1998).

Hayvansal kaynaklı proteazlardan en iyi bilinenleri pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve rennindir (Boyer, 1971). Gıda sanayisinde, protein hidrolizatları üretiminde, et ve balık atıklarının giderilmesinde, deri endüstrisinde ve tıpta hayvansal kaynaklı proteazlar kullanılmaktadır.

Pankreastan elde edilen tripsin, gıda proteinlerinin sindirimi için kullanılan hayvansal bir proteazdır ve serin proteaz sınıfına dâhildir. Özellikle bazı özel tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır. Aynı şekilde kimotripsin, hayvansal pankreatik ekstraktlarda bulunan serin proteaz sınıfında bir sindirim enzimidir. Diagnostik ve analitik uygulamalarda ve süt protein hidrolizatlarının deallerjenasyonunda kullanılmaktadır. Pepsin, hemen hemen tüm omurgalıların midelerinde salgılanan aspartik proteazdır. Renin ise anne sütünü sindirmek için her memelinin midesinde üretilen doğal, kompleks bir enzimdir. Renin, pepsine benzer bir proteazdır ve bütün süt veren memelilerin midelerinde inaktif pro-renin olarak bulunur. Süt endüstrisinde süt kazeininin çöktürülmesinde ve lor üretiminde kullanılmaktadır (Rao et al., 1998).

Üçüncü grup proteaz kaynağı bakteri, fungus, maya ve virüsü içeren mikrobiyal proteazlardır. Mikroorganizmalar, geniş biyokimyasal çeşitlilik ve genetik manipülasyonlara duyarlılıkları nedeni ile önemli enzim kaynaklarıdır. Mikroorganizmalardan elde edilen proteazlar asidik, nötral ve alkali koşullar altında aktivite göstermelerine ya da enzimin aktif bölgesindeki grup karakteristiğine göre sınıflandırılabilirler (Gupta et al., 2002a).

Enzimler, mikroorganizmalardan nispeten kısa zamanda ve bol miktarda üretilmekte ve aktivitede önemli kayıp olmaksızın daha uzun raf ömrüne sahiptirler. Genelde mikrobiyal proteazlar doğada ekstraselüler olarak bulunur ve direkt olarak fermentasyon ortamına salınırlar. Bu yüzden bitki ve hayvanlardan elde edilen proteazlarla kıyaslandığı zaman enzimi elde etmek için kullanılan daha sonraki süreçler daha kolaydır.

Proteaz üreten mikroorganizmaların sayısı oldukça fazladır fakat bazıları patojen ve toksik özellik göstermeyerek güvenli olarak nitelendirilmekte ve ticari olarak kullanılmaktadır. Bakteri, mantar, maya ve aktinomisetleri içeren mikroorganizmaların birçoğunun serin proteaz grubundan alkalin proteaz ürettiği bilinmektedir (Kumar and Takagi 1999). Bakterilerden *Bacillus* genusu alkalin proteazın en önemli kaynağıdır. Farklı çevrelerden elde edilen birçok *Bacillus* türü alkalin proteaz üretimi için araştırılmakta ve kullanılmaktadır. Fakat en fazla *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. Amyloliqifaciens* ve *B. mojavensis* suşlarında alkalin proteaz potansiyeli bulunmuştur (Rao et al., 1998; Kumar and Takagi 1999; Gupta et al., 2002b).

1.2.3. Proteazların kullanım alanları

Deterjan endüstrisi

Deterjanlar, her biri temizlemede ayrı bir görev yapan, birçok maddenin kompleks bir karışımıdır. Günümüzde ticari olarak kullanılan çamaşır deterjanlarının bileşiminde surfaktantlar, ağartma ve su yumuşatma ajanları ile birlikte enzimlerde bulunmaktadır (Maier, 2003). Proteazlar ise deterjanlarda diğer enzimler ile birlikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Proteaz enziminin deterjanlarda kullanımının

artmasında önemli bir faktörde, çevreci olarak bilinen ve fosfat içermeyen deterjanlarda kullanılarak istenen temizliği sağlamasıdır.

Deterjanlardaki proteazlar, protein moleküllerini parçalayarak lekeleri temizlenmesini sağlamaktadır. Enzimler bu etkilerini surfaktanların sadece fiziksel hareketinin aksine kirlerin daha fazla çözünmesini ve küçük fragmentlere parçalanmasını sağlayarak gösterirler (Aehle, 2007).

İdeal bir deterjan proteazı, çeşitli metal iyonları, denatürantlar, surfaktanlar, oksidantlar ve deterjanların varlığında stabil kalabilmeli ve geniş substrat özgünlüğüne sahip olmalıdır. Bu özelliklere sahip alkalin proteazlar endüstriyel uygulamalar açısından oldukça değerlidir (Joo et al., 2003; Banik and Prakash, 2004; Gupta and Khare, 2007; Zambare et al., 2007; Sareen and Mishra, 2008).

Günümüzde deterjan endüstrisinde kullanılan enzimlerin %89'unu subtilisinler ve/veya *Bacillus* soyundan saflaştırılan proteazlar oluşturmaktadır. Deterjan endüstrisinde kullanılan proteazlarda en büyük uygulama alanı olarak evde kullanılan çamaşır deterjanlarıdır. Özellikle yüksek sıcaklık ve pH'larda büyüyen *Bacillus* soylarından üretilen proteaz enzimleri deterjanlarda kullanılmaktadır, yüksek sıcaklıklarda daha etkin yıkama sağlamaktadır (Moreira et al., 2002).

Bacillus sp. tarafından üretilen proteazların yaygın bir pH (7–11) ve ısı (30–60°C) aralığında aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Horikoshi, 1999; Joo et al., 2002; Gupta et al., 2002a).

Deri endüstrisi

Bakterilerden elde edilen proteazlar, derinin kollajen olmayan yapılarının hidrolizinde, deriden kılların ayrılmasında ve derinin yumuşatılmasında kullanılmaktadır. Kimyasalların kullanıldığı klasik yöntemlere göre daha az maliyetli ve çevreye zarar vermediği için enzimler tercih edilmektedir. Deri işlenmesinin çeşitli basamaklarında kullanılan alkalin proteazlar daha kaliteli deri üretimine olanak sağlamaktadır (Anwar and Saleemuddin, 1998).

Gıda Endüstrisi

Gıda endüstrisinde, proteazların kullanımı oldukça eski zamanlara dayanmaktadır. Günümüzde hayvan, bitki ve mikroorganizmalardan elde edilen proteazlar gıdalarda kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde en fazla kullanılan proteaz enzimi ise papaindir. En önemli uygulama alanı ise etin yumuşatılmasıdır.

Alkalen proteazlar, yüksek besin değerine sahip protein hidrolizatlarının hazırlanmasında da kullanılmaktadır. Protein hidrolizatları bebek mamalarında ve spesifik diyet ürünlerinde kullanılmaktadır. Genelde kazein, soya proteinleri, buğday protein hidrolizatlarının elde edilmesinde kullanılmaktadır. *B. subtilis*'den elde edilen proteazlar ise balık hidrolizatlarının elde edilmesini sağlamaktadır (Gupta et al., 2002b).

Proteazlar, beyaz ekmek ve poğaçaların yapımında da başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle *B. subtilis* proteazları kek, bisküvi ve kraker yapımında kullanılmaktadır (Fadıloğlu ve Erkmen, 2004).

Atık Arıtım Endüstrisi

Doğada saç, tırnak, tüy gibi atık olarak bulunan proteinler vardır. Bu atıklar, bazı mikroorganizlardan elde edilen proteazlar kullanılarak protein veya amino asitlere dönüştürülebilmekte ve hayvan beslenmesinde kullanılmaktadır (Anwar and Saleemuddin, 1998). Proteazların diğer ilginç bir kullanım alanı ise deniz *Crustacea* atıklarının deproteinizasyonudur. Böylece kimyasal uygulamalardan doğan zararların üstesinden gelmek için alternatif olarak mikroorganizmaların yani proteolitik enzimlerin kullanılmasına yönelik araştırmalar yapılmaktadır (Eren Kıran vd., 2006).

Kozmetik ve ilaç sanayisinde

Proteazlar, kozmetikte, saç bakım ürünlerinde, diş macunlarında, istenmeyen tüylerin yok edilmesini sağlayan ürünlerde ve kontak lens solüsyonlarında kullanılmaktadır (Langmaier et al., 2002).

Alkalen proteazlar, tıbbi ürünlerde de kullanılmaktadır. *Bacillus* sp. CK 11-4'den elde edilen alkalen proteazın fibrinolitik aktiviteye sahip trombolitik ajan olarak kullanımı bildirilmiştir (Kim et al., 1996). Subtilisin ya da kollejenaz yanık ve yara tedavisinde, antibiyotikler ile kombine edilerek kullanılmaktadır (Kumar and Takagi, 1999; Gupta et al., 2002b).

1.2.4. Proteaz üretimi

Mikroorganizmaların enzim üretimi için kaynak olarak kullanılması durumunda ilk önce amaca uygun mikroorganizma türünün ya da suşunun belirlenip seçilmesi gereklidir. Bu mikroorganizmanın uygun bir ortamda ve koşullarda geliştirilmesi ve kültürlerinin elde edilmesi için uygun besiyerinin belirlenmesi diğer aşamadır.

1.2.4.1. *Bacillus* hakkında genel bilgiler

Yüksek alkali çevrelerde büyüebilme yeteneğine sahip olan mikroorganizmalara alkalifilik mikroorganizmalar denir ve alkalen proteaz aktivitesi gösterirler. Bu mikroorganizmalar sodalı topraklar, göller ve çöller gibi doğal alkali çevrelerde yaşarlar.

Çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanım için araştırılan tüm alkalifilik mikroorganizmalar içinde *Bacillus* genusu üyelerinin alkalen proteaz kaynağı olarak üstün ve verimli olduğu bulunmuştur. Alkalen proteaz üreten farklı *Bacillus* türleri ve suşları Çizelge 1.3 verilmiştir (Kumar and Takagi, 1999).

Bacillaceae familyasından *Bacillus* cinsi, gram pozitif (bazı türleri değişken), aerobik veya fakültatif anaerobik, spor oluşturan, çubuk şeklinde bakterilerdir. Çoğunlukla mezofilik olmakla birlikte psikrotrof (soğuya dayanıklı) ve termofilik türleri de vardır.

Bütün türleri Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besiyerlerinde oldukça iyi ürer. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren; nitrojen kaynağı olarak da amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi gelişirler (Kalkan ve Halkman, 2006).

Çizelge 1.3. Alkalen proteaz elde edilen *Bacillus* türleri (Kumar ve Takagi, 1999)

<i>Bacillus</i> spp. ve suşları
<i>Bacillus alcalophilus</i> ATCC 21522 (<i>Bacillus</i> sp. No. 221)
<i>B. alcalophilus</i>
<i>B. alcalophilus</i> subsp. <i>halodurans</i> KP1239
<i>B. amyloliquefaciens</i>
<i>B. circulans</i>
<i>B. coagulans</i> PB-77
<i>B. firmus</i>
<i>B. intermedius</i>
<i>B. lentus</i>
<i>B. licheniformis</i>
<i>B. proteolyticus</i>
<i>B. pumilus</i>
<i>B. sphaericus</i>
<i>B. subtilis</i>
<i>B. subtilis</i> var. <i>amylosacchariticus</i>
<i>B. thuringiensis</i>
<i>Bacillus</i> sp. Ya-B
<i>Bacillus</i> sp. NKS-21
<i>Bacillus</i> sp. B21-2
<i>Bacillus</i> sp. Y
<i>Bacillus</i> sp. CW-1121
<i>Bacillus</i> sp. KSM-K16
<i>Bacillus</i> sp. MK5-6

1.2.4.2. Mikroorganizmadan alkalen proteaz üretimi için uygun besiyeri bileşimi ve şartları

Besiyerleri; mikroorganizmaları bulundukları ortam dışında ve laboratuvarlarda üretmek için formüle edilmiş, mikroorganizmaların gereksinimini olan besin ögelerini içeren, pH'sı uygun, besleyici, katı veya sıvı yapay ortamlardır. Besi yerlerine; ortam= vasat= kültür ortamı= kültür besi yeri gibi isimler de verilmektedir.

Mikroorganizmalar türüne bağlı olarak farklı bileşikleri tüketirler. Bu yüzden mikroroganizmaya göre kullanılan besiyeri değişmektedir. Enzimlerin üretiminde yararlanılan besin ortamları genellikle kompleks karbon ve azot maddelerinin karışımıdır. Ayrıca karbon ve azot kaynakları, inorganik tuzlar ve diğer büyüme faktörleri, bakterilerin enzim üretme kapasiteleri üzerinde önemli etkiye sahiptir (Khalil et al. 2003).

Bütün mikroorganizmalar en uygun büyüme için uygun pH içeren ortamlarda bulunmaları gerekir ve büyük bir kısmı nötr veya nötr pH'ya yakın ortamlarda bulunur (Kumar and Takagi, 1999).

Mikroorganizmalardan üretilen proteazlar doğada ve çoğu kültür şartları altında üretilir ve indüklenebilir. *Bacillus* türleri ekstraselüler proteaz üretirler. Mikroorganizmalarda üretilen ekstraselüler proteazlar, karbon/azot oranı, glukoz ve metal iyonları gibi besi yerinde bulunan komponentlerden oldukça etkilenmektedir (Beg et al., 2002). Ayrıca *Bacillus* türleri tüm aminoasitleri karbon, azot ve enerji kaynağı olarak kullanılabilirler.

Son zamanlarda mikroorganizmalardan yüksek oranda enzim verimi almak için, yeni mutantlar elde edilmesi yoluna gidilmekte ya da üretim ortamının değiştirilmesi yolu tercih edilmektedir (Khalil et al., 2003). Bu nedenle alkalen proteaz kaynağı olarak farklı mikroorganizmalar, üretim şartları ve besi ortamları denemektedir (Çizelge 1.4).

Çizelge 1.4. Bazı mikroorganizmalar için optimize edilen alkalen proteaz üretim şartları (Gupta et al., 2002a)

Microorganism	pH	Isı (°C)	Agitation (rpm)	Inkübasyon süresi	Seçilen/optimize nitrojen kaynakları	Seçilen/optimize karbon kaynakları
Bakteri						
<i>Bacillus</i> sp. IS-3	10,5	37	200	72	Soybean meal	Glukoz
<i>Bacillus</i> sp. JB99	10	37	180	24	KNO ₃	Sitrik asit
<i>Bacillus</i> sp. K2	7	37	500	60-72	Kasein hidrolizat, jelatin	Gliserol
					Peptone, maya ekstrakt	
<i>Bacillus</i> sp. P-2	9,5	30	--	24	Kazein	Glukoz
<i>B. mojavensis</i>	7	50	200	24	Biopepton, maya ekstrakt	Glikoz
<i>B. sphaericus</i>	n.s.	30	300	n.s.	Nutrientbroth,	Glikoz
<i>B. subtilis</i> 168	n.s.	36	250	6-8	maya ekstrakt	Glikoz,
					Polipecton,	Maya
					maya ekstrakt, Kazein	ekstrakt
<i>Flavobacterium balustinum</i> P104	7.4	10	150	72		n.s.
Fungi						
<i>Tritirachium album</i>	5.9	28	200	24-120	Pepton, maya ekstrakt, NaNO ₃ , (NH ₄) ₂ SO ₄	n.s.

n.s: Belirtilmemiş

Mikroorganizmaların çoğunda hem organik hemde inorganik azot kaynakları, aminosit, nükleikasit, protein ve hücre duvarı komponentlerini oluşturmak üzere metabolize edilmektedir. Alkalen proteazların %15,6'sını azot oluşturmaktadır ve

enzim üretimi azot ve karbon kaynaklarına bağlıdır (Kole et al., 1988). Kompleks azot kaynakları alkalen proteaz üretiminde kullanılmasına karşın spesifik bir azot miktarı organizmadan organizmaya değişmektedir. Azot kaynakları; organik azot, inorganik azot ve aminoasitlerden oluşmaktadır. Bu kaynaklar soytone (soya enzimatik hidrolizatı), casamino asit, et ekstraktı, maya ekstraktı, triptin, amonyum nitrat, amonyum karbonat, lisin, alanin, glutamik asit ve glisindir (Shafee et al, 2005).

Azot kaynaklarından maya ekstraktı, ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*), bira mayası gibi mayaların enzim veya asitle hidrolizinden elde edilir. Yapısında suda çözünen N'lu maddeler, karbohidratlar, B grubu vitaminleri, K, PO₄ vb. tuzlar, organik asitler bulunur. Et ekstraktı ise yağsız, tendonları ayrılmış sığır etinden elde edilir. Yapısında suda çözünen aminoasitler, küçük peptitler, mineraller, iz elementler, B kompleks vitaminleri, pürin bulunur. Pepton ise süt proteini (kazein), kan proteini (fibrin), sığır eti, karaciğer veya soya proteininin tripsin, pepsin veya papain gibi proteolitik enzimlerle hidrolize edilmesinden üretilmektedir. Bunun yanında, peptonların bileşiminde bulunan bazı aminoasitler ve vitaminler de bazı mikroorganizmalar için gelişme faktörü olarak oldukça önemli işlev görür.

Besiyerinde inorganik nitrojen kaynağının kullanıldığı zaman düşük seviyede alkalen proteaz üretimi olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (Sen and Satyanarayana 1993; Chaphalkar and Dey 1994).

Karbon kaynağı olarak glikoz, sakroz, nişasta, fruktoz, maltoz gibi farklı kaynaklar kullanılmaktadır. Besiyerinde kullanılan glikozun katabolit represyon neden olduğu ve böylece enzim üretimi azalttığı bulunmuştur (Kole et al., 1988). Ticari uygulamalarda yüksek karbonhidrat konsantrasyonu enzim üretimini baskılamaktadır. Bu nedenle ya karbonhidrat sürekli olarak ya da belirli miktarlarda eklenmelidir (Aunstrup, 1980).

Fermantasyon ortamına eklendiği zaman asetik asit, metil asetat, organik asit ve sitrik asit gibi çeşitli organik asitlerin alkalen pH'larda proteaz üretimini artırdığı gözlenmiştir. Bunun yanında kalsiyum, kobalt, bakır, demir, magnezyum gibi

divalent metal iyonlarıda alkalen proteaz enzimin üretiminde besiyerinde kullanılmaktadır.

Ayrıca birçok çalışmada fosfat kaynağı olarak potasyum fosfat kullanılmaktadır ve besiyerinde tompon özelliği göstermektedir. Fakat fosfatın aşırı kullanımı enzim represyonuna ve hücre büyümesinin inhibisyonuna neden olmaktadır (Kumar and Takagi, 1999).

Besiyerinde kullanılan tuz (NaCl) ise iyon konsantrasyonunu ayarlamak ve izotonik (eş basınçlı) ortam yaratmak için kullanılır. Ayrıca proteinler, peptonlar, peptit ve aminoasitler tampon özelliği gösterdiğinden besi yerinde bu organik bileşikler bulunduğu ayrıca tampon madde eklenmesine gerek olmadığı bildirilmektedir (Anonim, 2007).

Ticari uygulamalarda fermentasyon sonunda kullanılmayan komponentleri minimize etmek için besiyer kompozisyonlarının optimizasyonu sağlanmaya çalışılmaktadır. Araştırmalar, (i) enzim veriminde maliyet etkilerine bakılarak kullanılacak besiyerinde çeşitli karbon ve nitrojen kaynaklarının değerlendirilmesi, (ii) fermentasyon ortamında divalent metal iyonlarının gerekliliği ve (iii) pH, ısı, havalanma ve çalkalama gibi fermentasyon parametreleri ve çevresel optimizasyonu konularına yönelmiştir. Özellikle fermentasyon maliyeti enzim üretiminde oldukça önemlidir. Hinman (1994) göre enzim üretimin maliyetinin %40'nı yetiştirme substratı oluşturmaktadır.

Tüm mikroorganizmaları kapsayan alkalen proteaz üretimi için tanımlanmış en iyi fermentasyon ortamı yoktur çünkü her mikroorganizma ve suşları maksimum enzim üretimi için kendine özel şartlar gerektirir (Kumar and Takagi, 1999). Buda çalışmalarda gösterilen farklılıkları açıklamaktadır. Proteazları yüksek verimli olarak elde etmek için kültür şartlarını, ortamını test etmek ve planlamak gerekmektedir (Anwar and Saleemuddin, 1998).

1.2.5. Alkalen proteazın saflaştırması

Farklı kaynaklardan elde edilen alkalen proteazlar için çeşitli saflaştırma stratejileri uygulanmaktadır. Proteazın saflaştırılması için belirli bir dizi kural yoktur.

Çizelge 1.5. Mikroorganizmalardan elde edilen alkalen proteazları saflaştırılmada uygulanan teknikler (Gupta et al, 2002b)

Mikroorganizma	Konsantrasyon	Kolon materyali
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Aseton	DEAE selüloz, Sefadeks G 100
<i>Arthrobacter nicotianae</i> 9458	Ultrafiltrasyon	DEAE-Sefakil, Sefakil 200, Fenil Sefaroz, FPLC Mono Q HR 5/5
<i>Bacillus sp.</i> PS719	(NH ₄) ₂ SO ₄	DEAE-selüloz, α-kazein agaroz
<i>Bacillus sp.</i> NCDC 180	Aseton,(NH ₄) ₂ SO ₄	DEAE-Sefaroz CL-6B,CM-Sefaroz CL-6B, Sefakril S-200
<i>Bacillus sp.</i> SSR1	(NH ₄) ₂ SO ₄	DEAE-Sefadeks A-50, Sefaroz 6B
<i>B. pumilis</i> MK6-5	(NH ₄) ₂ SO ₄	DEAE-Sefaroz CL-6B, CM-Sefaroz CL-6B, Fenil agaroz, Q- Sefaroz
<i>B. sphaericus</i> MTCC B-0014	(NH ₄) ₂ SO ₄ , Ultrafiltrasyon	Sefadeks G-75, CM-selüloz
<i>Oligotropha carboxydovorans</i> DSM 1227	Ultrafiltrasyon	Butil-Toyoppearl 650C, Butil Toyoppearl 650 M,
<i>Pimelobacter sp.</i> Z-483	(NH ₄) ₂ SO ₄	Fenil Toyoppearl 650 M, Toyoppearl HW-50F
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MN1	(NH ₄) ₂ SO ₄	Sefadeks G-100, DEAE-selüloz
<i>P. aeruginosa</i> PST-01	(NH ₄) ₂ SO ₄	Butil-Toyoppearl 650C, Butil Toyoppearl 650 M
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 25419	(NH ₄) ₂ SO ₄	Q- Sefaroz, Sefakril S-200
<i>Bacillus sp.</i> SSR1	(NH ₄) ₂ SO ₄	DEAE-Sefadeks A-50, Sefaroz 6B
<i>B. pumilis</i> MK6-5	(NH ₄) ₂ SO ₄	DEAE-Sefaroz CL-6B, CM- Sefaroz CL-6B,Sefakril I S-200
<i>B. sphaericus</i> MTCC B-0014	(NH ₄) ₂ SO ₄ , Ultrafiltrasyon	Fenil agaroz, Q-Sefaroz
<i>Aspergillus terreus</i> (IJIRA 6.2)	Aseton, (NH ₄) ₂ SO ₄	DEAE-Sefadeks A25, SDS-PAGE,
<i>Scedosporium apiospermum</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ , PEG 35,000	Sefadeks G-75
<i>Thermoactinomyces sp.</i> E79	(NH ₄) ₂ SO ₄	DEAE-Sefaroz CL-6B, Butil-toyoppearl 650 M
<i>Candida caseinolytica</i>	-----	Sefakril S-200, DEAE-Biojel
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Ultrafiltrasyon	Sefadeks G-75

Genel olarak santrifüj veya filtrasyon yoluyla fermantasyon sıvısından kültür ayrıldıktan sonra alınan süpernatanın ultrafiltrasyon, tuzla çöktürme veya etanol yada

aseton kullanarak çözücü ekstraksiyonu ile konsantrasyonu sağlanır (Kumar and Takagi 1999; Thangam and Rajkumar 2002). Ayrıca PEG-35.000, aktif kömür, ısıya duyarlı hidrojel, enzime ısı uygulanması ve liyofilizasyon gibi diğer metodlarda alkalen proteazın konsantrasyonu için kullanılır. Enzimin daha fazla saflığını sağlamak için afinite kromatografisi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi gibi bir veya daha fazla teknik birlikte uygulanabilir. Çeşitli kaynaklardan elde edilen alkalen proteazları saflaştırılmasında kullanılan teknikler Çizelge 1.5.'de verilmektedir.

Protein saflaştırmada kullanılan tüm basamaklar bir miktar saflaştırma potansiyeline sahiptir. Fakat her basamak total aktivite ve protein miktarında azalmaya neden olurken spesifik aktivite artması gerekmektedir. Toplam proteinde görülen istendik azalmanın sebebi, mümkün olduğu kadar spesifik olmayan (istenmeyen) proteinlerin ortamdaki uzaklaştırılmasıdır (Ward and Swiatek, 2009).

1.2.5.1. Tuzla çöktürme

Tuzla çöktürme (salting out) proteinlerin konsantre edilmesinde ve saflaştırılmasında geniş çapta kullanılan bir yöntemdir. Proteinler farklı tuz konsantrasyonlarında çöktürülerek birbirlerinden ve çözeltideki diğer moleküllerden ayrılabilir. Genellikle saflaştırma prosedürünün ilk safhalarında, tamamen kaba bir ayırma basamağı olarak yer almaktadır. Saflaştırma işlemlerinin yaklaşık %80'inde bir çöktürme basamağı kullanılmaktadır; bunun %60'ı amonyum sülfat, %35'i etanol, aseton veya bir asit (genellikle HCl) kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Ortama eklenen nötral tuz genelde denatürasyona yol açmadan proteinlerin agregasyonu (bir araya gelmelerine) ve çözeltiden ayrılarak çökmelerine yol açar. Çöktürme işleminde genellikle etkinliği ve çözünürlüğü yüksek, pH'yı fazla etkilemeyen, çözeltide fazla ısınmaya yol açmayan, ucuz ve etkin bir tuz olan amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) kullanılır. Bu nedenle yöntem amonyum sülfat çöktürmesi adıyla da bilinir (Saxena et al., 2003; Temizkan vd., 2008).

Proteazı saflaştırmak ve konsantre etmek için farklı doygunlukta amonyum sülfat ile yapılan çöktürmelerde genelde enzim saflaştırma katsayıları 1-7 arasında

değişmektedir (Balık ve Dönmez ,1992; Singh, 2001a; El-Safey and Abdul Raouf, 2004; Kazan et al., 2005; Kerimak Öner, 2008).

Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası fazla tuzun uzaklaştırılması için diyaliz, jel filtrasyonu veya ultrafiltrasyon işlemi gerekebilmektedir.

1.2.5.2. Diyaliz ve Ultrafiltrasyon

Su veya diğer küçük moleküllerin santrifüjleme veya yüksek basınç gibi bir etki ile yarı geçirgen bir membradan geçirmeye zorlandığı bu yöntem protein çözeltilerinin konsantre edilmesi sağlanır (Temizkan vd., 2008). Proteaz saflaştırma çalışmalarında diyaliz, ultrafiltrasyon ya da amonyum sülfat çöktürmesi ya tek başına ya da birlikte kullanılmaktadır.

1.2.5.3. Kromatografik teknikler

Kromatografi; madde karışımlarının, sabit ve taşıyıcı faz arasında, büyüklük, şekil, taşıdıkları yük, çözünürlük gibi özelliklerine göre dağılarak ayrılmasıdır. Kolon kromatografisi proteinlerin saflaştırılmasında sıkça kullanılır. Kolon, proteinleri seçici olarak adsorplayan bir maddeyle (sabit faz) doldurulmaktadır. Protein karışımı kolona verildiğinde, tampon çözelti (taşıyıcı faz) ile yıkanan kolonda adsorbe edilmeyenler önce, adsorbe edilenler daha sonra ayrılırlar.

Kolon kromatografisi, ayırma mekanizmalarına bağlı olarak jel filtrasyon, iyon değişim, afinite kromatografisi gibi türlere ayrılmaktadır.

Jel filtrasyon kromatografisi: Proteinlerin molekül büyüklüğüne göre ayrılmasını sağlar. Bu teknik binlerce protein, nükleik asit, polisakkarid ve diğer biyolojik moleküllerin saflaştırılmasında önem taşır. Jel filtrasyon yöntemi ile büyük miktarda protein karışımı saflaştırılabilir (Saxena et al., 2003; Temizkan vd., 2008).

Jel filtrasyon kromatografisinde Sefakril, Süperoz, Sefadeks ve Toyopearl gibi birçok agaroz temelli materyal saflaştırma için kullanılmaktadır. Bu tür kromatografisi genelde ya saflaştırmanın ilk basamaklarında ya da son aşamada kullanılmaktadır (El-Shanshoury et al., 1995; Lee et al., 1996; Chakrabarti et al., 2000).

İyon-değişim kromatografisi: Bileşikleri iyonik yüklerinin cinsi ve miktarına göre ayırıştırır. Kullanılacak kolon materyali, tipi ve elektrik yüklenme gücüne göre seçilir. Anyon değişim kolon materyali artı yüklü olur ve negatif yüklü tanecikleri tutup ayırştırmak için kullanılır; katyon değişim kolon materyali ise negatif yüklüdür ve pozitif yüklü molekülleri ayırştırmak için kullanılır.

Genel olarak alkali proteaz pozitif olarak yüklüdür (Kumar and Takagi, 1999) ve bu yüzden katyon değişim kromatografisi tercih edilmektedir. İyon değişim kromatografisinin kolon materyali dietilaminoetil (DEAE) ve karboksimetil (CM) gibi iyonlaşabilir fonksiyonel gruplar içerir. Adsorbe edilen protein molekülü pH'daki gradient değişimleri veya ayırma tamponu/solüsyonunun iyonik şiddeti yoluyla ayrılmaktadır.

Afinite (İlgi) kromatografisi: Bu yöntem kolon dolgu maddesine kovalent olarak bağlanmış ve saflaştırılacak proteine özel ilgi (afinite) göstererek seçinimli bir ayırım sağlayan, ligandların kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Çok kompleks bir karışım içinde bulunan bazı proteinler, afinite kromatografisi sayesinde tek basamakta oldukça saf halde elde edilirler (Temizkan vd., 2008).

Bununla birlikte, kullanılan materyallerin maliyetinin yüksek olması yüzünden, çöktürme basamağından sonra afinite kromatografi yerine genellikle iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografileri tercih edilmektedir (Gupta et al., 2002b).

1.2.5.4. Protein miktarının belirlenmesi

Protein miktar tayinleri, her saflaştırma basamağının verimi ve ilgilenilen proteinin spesifik aktivitesini belirlenmesinde esastır. Protein miktarını en iyi şekilde saptayabilmek için de proteinin ve örnekteki diğer bileşiklerin yapısına, deneyin hassasiyetine göre metod seçilmelidir. Farklı proteinler farklı absorpsiyon spektrumu gösterirler ve çalışılacak olan her protein için bir standart eğri çizilmelidir. Ticari olarak satılan saf proteinler standart olarak kullanılır.

1.2.5.5. Proteaz aktivitesinin belirlenmesi

Enzimlerin varlıklarını, etkinliklerini, kataliz mekanizmalarını, miktarlarını, saflıklarını belirlemenin en etkili yolu onların aktivitelerini ölçmektir. Enzim aktivitesi, enzimin katalizlediği reaksiyonda kullanılan substratın kullanım hızı tayin edilerek ölçülür. Her saflaştırma basamağından sonra istenilen proteinle ilgili analizler, onun saflık derecesi ve saflaştırma veriminin bilinmesi gerekir. Bunun için her aşamada proteinlerin aktivitesi ölçülmelidir.

Bir enzimatik reaksiyonun hızı, enzimin etkinliği veya enzimin aktivitesi ile ilişkilidir. Bir enzimin aktivitesi, o enzim tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyonun hızının, enzim etkisiyle optimal koşullarda belirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir. Etkinliği veya aktivitesi fazla olan bir enzim, belirli bir sürede daha fazla substrat molekülünü ürün haline dönüştürür.

Bir enzimin aktivitesini çeşitli şekilde ifade etmek mümkündür. Örneğin, 1 mg enzim proteini tarafından birim zamanda meydana getirilen absorbans değişikliği bir birim olarak ifade edilir. Fakat elde edilen sonuçları karşılaştırabilmek için daha standart bir birim ifadesi geliştirilmiştir. Bu bazen uluslararası ünite (IU) veya enzim ünitesi (EU) olarak ifade edilmektedir. Bir ünite enzim bir dakikada 1 μ mol ürünün oluşumu veya 1 μ mol substratın dönüşümünü katalizleyen enzim miktarıdır. Enzim aktivitesi, spesifik aktivite olarak da ifade edilir. Bir enzim için *spesifik aktivite*, 1 mg enzim proteini başına düşen enzim ünitesi sayısıdır (Telefoncu,1996).

Proteolitik aktivite ise ya kalitatif (niteliksel) yada kantitatif (niceliksel) metodlar kullanılarak ölçülebilmektedir. Bu her iki tip metodun temel prensibi proteinin hidrolizi ile açığa çıkan ürünlerin ya da protein rezidülerinin ölçülmesi ile ilişkilidir. Proteolitik aktivitenin test edilip tanımlanmasında kullanılan metodlar onların kolaylık, hızlilik, tespit etme ve duyarlılık oranlarına göre çeşitlilik göstermektedir.

Kalitatif testler proteaz üretimi sonucu olarak agar plak üzerinde proteolizisin temiz bir alanın oluşumuna dayanmaktadır. En yaygın kullanılan kalitatif testler protein agar plak testi, radial difüzyon ve incetabaka enzim testidir. Kantitatif testler ise proteaz aktivite miktarı enzimin proteolitik potansiyeli ile ölçmektedir. Yaygın

olarak kullanılan metotlarda spektrofotometri, radyometri ve ELISA (enzim ilintili immün test) gibi tekniklerde doğal ya da sentetik substratlar kullanılmaktadır.

Spektrofotometrik metodlar, yöntemlerde protein substratında (BSA-sığır serum albumin, kazein, hemoglobin) proteolitik aktiviteden sonra oluşan peptid miktarını tanımlayarak proteolitik aktiviteyi göstermektedir. Bu peptid rezidüleri, ya 280 nm'deki (direk ölçüm metodu) absorbanları yoluyla ya da klasik Folin reaktifi (kolorimetrik method) kullanılarak belirlenir (Gupta et al, 2002a).

1.3. Bitkinin Tanıtılması

Caryophyllalos takımından *Caryophyllaceae* (Karanfilgiller) familyasına bağlı *Gypsophila* türleri tek yıllık, iki yıllık veya çok yıllık olarak bulunmaktadır. “*Gypsophila*” adı jipsli (alçı taşı) ortamlara adapte olan bir bitki grubuna verilmiştir. Dünyada 100’e yakın türü bulunan *Gypsophila* cinsi esas itibariyle Akdeniz ve İran-Turan bölgelerinde yayılış göstermektedir (Williams,1989). Bu cinse ait türler Türkiye’de Anadolu ve çevresindeki kurak alanlarda yayılış göstermektedir (Davis et al., 1988).

Gypsophila ülkemizde 59 takson ile temsil edilmektedir (Korkmaz, 2007). Ayrıca bu cinslerin gen merkezleri de Türkiye’dir (Özçelik ve Muca, 2010). Ülkemizde bulunan *Gypsophila* L. türünden 30’u endemiktir (Özçelik ve Özgökçe, 1996).

Bu cinsin saponin bakımından zengin ve ekonomik önemi olan taksonları halk arasında “Çöven, Çövenotu, Çövenkökü, Helvaköğü, Sabunotu” adıyla bilinmektedir. Ayrıca çöven, saponin ekstraktı elde edilen bitkilere denilmekle beraber ekstraktın kendisine de denilebilmektedir. Ülkemizde her yıl yöresel kullanımı, ticareti ve dış satımı için doğal bitki türlerinden binlerce ton kök, yaprak ve çiçek toplanmaktadır. Bu bitkiler arasında *Gypsophila* ve ona yakın bir cins olan *Ankyropetalum* taksonlarının rizomlarının yıllık toplanma miktarı yaklaşık 500 ton’ dur (Özçelik ve Yıldırım, 2011).

Gypsophila türleri içerdiği saponin (bir çeşit glikozit) nedeniyle pek çok alanda kullanılmaktadır. Kökleri toplanan narin gövdeli bitkilerden elde edilen hülasa, gevreklik kazandırması amacıyla helvaya katılmaktadır. Doğu Anadolu Bölgesinde

yerli halk tarafından bu kökler yerli ve orjinal bir gıda çeşidi olan otlu peynirin yapımında yer almaktadır. Ayrıca çoğu *Gypsophila* türünün kültürü yapılmakta ve çiçekçilerde bolca satılan önemli süs bitkileri arasında görülmektedir (Korkmaz, 2007).

Çalışmada ekstrakaksiyonu yapılan *Gypsophila pilulifera* Boiss.&Heldr. türünün triterpenoid saponin içerdiği bilinmektedir (Arslan et al., 2012). Sezik vd. (1986), Türk Çöveni olarak kullanılan *Gypsophila* türlerinin içerdiği saponin yüzdelerini; *G. bicolor* (Van Çöveni)'da % 20-25, *G. arrostii* var. *nebulosa* (Konya, Beyşehir, Isparta Çöveni)'da %19- 22, *G. eriocalyx* (Çorum- Yozgat Çöveni)'de %10-14 ve *G. perfoliata* var. *anatolica* (Niğde Çöveni)'da % 15- 19 arasında olarak bildirmişlerdir.

Bu türe ait farklı bir çalışmada Babaoğlu et al. (2004) tarafından toksik seviyede bor içeren toprakların bitkisel yolla temizlenmesinde kullanılabilecek bitki türlerini araştırmıştır. *G. sphaerocephala* ve *G. perfoliata* türlerinin topraktan yüksek konsantrasyonlarda bor elementini bünyelerine aldığını bulmuşlardır ve potansiyel hiperakümülatör (aşırı biriktirici) olarak kullanılabileceklerini ileri sürülmüştür.

1.4. Saponinler

Saponinler, birçok bitki türünün normal gelişme ve büyüme evresinde sentezlenen, bitkinin hayatta kalmasını için savunma görevi yapan glikozitlerdir. Bu glikozitlere sulu solüsyonlarda güçlü köpürme özelliğinden dolayı saponin adı verilmiştir ve latince “sapo onis” (sabun) kelimelerinden türemiştir. Saponinlerin köpürme özelliği onları diğer glikozitlerden ayırmaktadır.

1.4.1. Saponinlerin yapısı ve elde edildiği kaynaklar

Saponinlerin başlıca kaynakları bitkiler olmakla beraber bazı bakteri ve basit deniz hayvanlarında da bulunurlar. Saponinler bitkiler âleminde çok geniş yayılım gösterirler. 100'den fazla bitki familyasında ve 500'den fazla cinsten bulunmaktadır (Hoagland et al., 1996). Bitkilerde bulunan saponin miktarı yetiştiği toprak ve yetiştiği coğrafya gibi farklılıklara göre çeşitlilik göstermektedir (Hostettman and Marston, 2005).

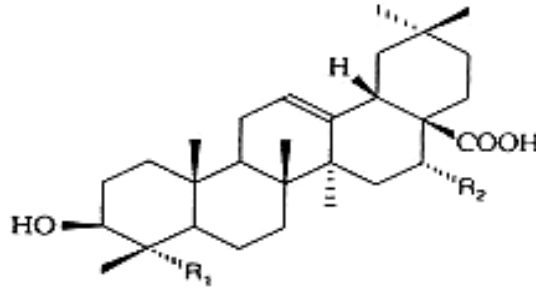
Birçok farklı bitki ailesinden saponinler izole edilmekle birlikte kuşkonmaz, patates, böğürtlen, şeker pancarı, çay ve özellikle baklagiller gibi yiyeceklerde bulunmaktadır (Çizelge 1.6.) (Price et al., 1987). Besin olarak tüketilmeyen fakat sağlık ve endüstriyel uygulamalarda kullanılan saponin kaynaklarına ise *Quillaja saponaria*, *Trigonella foenum-graceum*, alfalfa (*Medicago sativa*), atkestanesi (*Aesculus hippocastanum*), meyan kökü (*Glycyrrhiza* türleri), sabunu (*Saponaria officinalis*), Mojave yucca (*Yucca schidigera*), *Gypsophila* genusu (*Gypsophila paniculata* gibi) ve *Ginseng* (*Panax* genus) örnek olarak verilebilir (Balandrin, 1996).

Çizelge 1. 6. Besin olarak tüketilen saponin içeren bazı bitkiler ve saponin içerikleri (Fenwick et al., 1983)

Bitki adı	Saponin miktarı (g/kg)
Nohut (<i>Cicer arietinum</i> L.)	56
Soya Fasulyesi (<i>Glycine max</i> L. Merrill)	43
Yeşil Fasulye (<i>P. vulgaris</i>)	13
Fıstık (<i>Arachis hypogaena</i> L.)	6.3
Ispanak (<i>Spinacea oleracea</i> L.)	47
Mercimek	3.7-4.6
Susam Tohumu (<i>Sesamun indicum</i> L.)	3.0
Yeşil Bezelye (<i>Pisum sativum</i> ssp.)	11
Kuşkonmaz (<i>Asparagus officinalis</i> L.)	15
Sarımsak (<i>Allium sativum</i> L.)	2.9
Yulaf (<i>Avena sativa</i> L.)	1.0

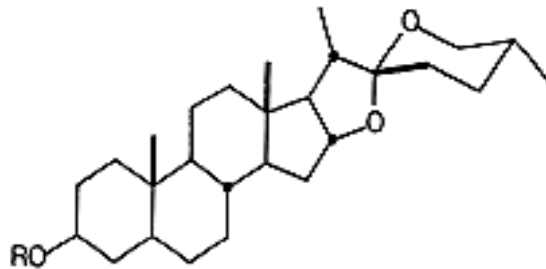
Saponinlerin yapısı glikan ve aglikan (sapogenin) olmak üzere iki kısımdan meydana gelir. Polisiklik yapıya sahip apolar aglikan iskeleti ve bu halkaya bağlanmış polar yapıya sahip şeker moleküllerinin birleşiminden oluşan bu moleküller, nötral veya asidik karakterlidir.

Saponinler, sahip oldukları aglikon iskeletinin yapısına göre steroidal ya da triterpenidal saponin olarak sınıflandırılır (Şekil 1.3 ve Şekil 1.4). Aglikon kısmındaki fonksiyonel gruplar ve glikan kısmını oluşturan şeker zincirinin kompozisyonları dallanma özellikleri farklı saponinlerin oluşumlarını sağlar (Oleszek, 2002). Saponinlerin aglikon kısmına bir şeker grubu bağlanmışsa *monodezmodize*, iki şeker grubu bağlanmışsa *bidezmozide*, üç şeker grubu bağlanmışsa *tridezmozide* olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca yaygın olarak D-Glikoz, D-Galaktoz, D-Gliküronik asit, D-Riboz, D-Ksiloz, L-Arabinoz, L-Fruktoz ve L-Ramnoz gibi karbonhidratların saponinlerin yapısında bulunabileceği bildirilmektedir (Güçlü-Üstündağ and Mazza 2007).



Şekil 1.3. Steroidal saponin yapısı

Bir bitkide birden fazla saponin çeşidi bulunabildiği gibi (Kocaoğlu Güçlü ve Uyanık, 2004) her iki saponin tipide bir tek bitkide nadir de olsa bulunabilmektedir (Osborn, 2003; Xu et al., 2007). Steroidal saponinler yoğun olarak *Agavaceae*, *Dioscoreaceae* ve *Liliaceae* gibi tekçenekli bitki ailelerinde bulunurken triterpenoid saponinler ise *Caryophyllaceae*, *Sapindaceae*, *Polygalaceae* ve *Sapotaceae* gibi çiftçenekli bitki familyalarında bulunurlar (Çizelge 1.7.) (Sparg et al., 2004).



Şekil 1.4. Triterpenidal saponin yapısı

Çizelge 1.7. Saponinlerin izole edildiği bazı bitki türleri ve içerdikleri saponin tipleri (Sparg et al., 2004).

Aile	Tür	Saponin tipi
Agavaceae.	<i>Yucca schidigera</i> Roetzl. Ex. Ortgies	Steroida
Amaranthaceae	<i>Achyranthes aspera</i> L.	Triterpenoid
Aquifoliaceae	<i>Ilex amara</i> (Vell.) Loes.	Triterpenoid
Araliaceae	<i>Schefflera leucantha</i> R.Vig.	Saponin karışımı
Caryophyllaceae	<i>Acanthophyllum squarrosum</i> Boiss	Triterpenoid
	<i>Arenaria filicaulis</i> Boiss. [= <i>Gypsophila filicaulis</i> (Boiss.) Borm]	Triterpenoid
	<i>Gypsophila pilulifera</i>	Triterpenoid
	<i>Gypsophila bermejoi</i> G.L'opez	Triterpenoid
	<i>Saponaria officinalis</i> L.	Triterpenoid

1.4.2. Doğal surfaktan olarak saponinler

Surfaktanlar yüzey aktif maddelerdir. Surfaktanların moleküler yapısı hidrofilik ve lipolik grupların varlığı ile karakterize edilmektedir. Bu yapısal özellik surfaktan moleküllerinin arayüz ya da yüzeylere tutunmasına olanak sağlar. Özellikle yıkama deterjanlarının yapımında kullanılan maddeler içerisinde surfaktanlar en önemli komponenttir.

Surfaktanlar hem bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilen oleokimyasal ve petrokimyasal hammaddelerden üretilmektedir ve oldukça geniş bir şekilde uygulamalarda yerini almıştır (Karsa and Houston, 2006; Cirelli et al., 2008). Bitkilerden elde edilen önemli doğal surfaktanlardan biride saponinlerdir. Saponinler birçok sentetik surfaktan ile benzer bir yapı sergilemektedir. Sentetik surfaktanlarda lipofilik kısımlar benzerlik gösterirken hidrofilik kısım çeşitlilik gösterirler ve hidrofilik gruplarının tipi ve yüküne göre anyonik, katyonik, noniyonik ya da

amfoterik surfaktanlar olarak sınıflandırılmaktadır. Saponinlerde ise lipofilik kısmı triterpen ya da steriodal yapılar oluştururken hidrofilik kısım farklı uzunluk ve dallanmalara sahip şeker gruplarından oluşmaktadır. Bu nedenle saponinler noniyonik surfaktanlardır ve bu özellikleri sayesinde çeşitli endüstrilerde kullanım alanlarına sahiptir (Güçlü-Üstündağ and Mazza, 2007; Oleszek and Hamed, 2010).

Son zamanlarda doğal ürünlere olan ilginin artması ile birlikte surfaktan üretimi için doğal ve yenilenebilir materyallerin kullanımı tercih edilmektedir. Böylece sentetik surfaktan kullanımına bağlı ekonomik ve çevre problemlerinin çözümünde etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu yüzden doğal, yeni ve daha gelişmiş özelliklere sahip surfaktanların üretimi önem kazanmıştır (Oleszek and Hamed, 2010).

1.4.3. Saponinlerin biyolojik aktiviteleri

Doğada geniş bir yayılıma sahip olmaları, fiziksel, kimyasal ve fizyolojik açıdan farklılıklar göstermeleri nedeniyle saponinlerle ilgili çok sayıda biyolojik aktivite araştırmaları yapılmıştır ve yapılarındaki çeşitliliğin biyolojik özelliklerine de yansıdığı görülmüştür.

Saponinler birçok bitkinin temel bileşenidir ve bu nedenle bitkilerin farklı farmakolojik özelliğinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Estrada et al., 1998). Özellikle geleneksel Çin tıbbında saponinlerin ve polifenollerin anahtar bileşenler (ingredientler) olduğu ve farklı biyolojik etkilerinden yararlanıldığı bilinmektedir (Liu and Henkel, 2002). Son zamanlarda dünya çapında tanınan Ginseng (*Panax ginseng* C.A.Meyer, Araliaceae) bitkisinin aktif major bileşiklerinden biri de saponinlerdir ve geleneksel doğu tıbbında uzun zamandır kullanılmaktadır (Fukuda et al., 2000).

Saponinler ile hücre membran sterollerleri arasındaki etkileşime bağlı olarak saponinlerin eritrositleri parçalama özelliğine sahip olduğu bilinmektedir. Saponinlerin hemolitik aktivitesinin düzeyi aglikon yapının tipine ve şeker yan zincirlerin varlığına bağlı olarak değişmektedir (Sparg et al., 2004).

Saponinlerin haşarat (insektisidal aktivite), parazit (antihelminth aktivite), yumuşakça (mollussisidal aktivite) ve balıklar için toksik etkilere neden olduğu gösterilmiştir.

Saponinler soğukkanlı canlılarda toksik olmakla beraber sıcakkanlı canlılarda gösterdiği toksitesi uygulama yolu, kaynağı ve konsantrasyona göre değişmektedir. Oral yolla emilimin az olması nedeniyle düşük toksik etkiye sahipken intravenöz yolla bu etki artmaktadır (Güçlü-Üstündağ and Mazza, 2007). Ayrıca *in vivo* yapılan çalışmalarda saponinin sindirim sisteminde emilmediği ileri sürülürken Hu et al. (2004) tarafından insan intestinal hücrelerinde düşükte olsa emilme özelliğine sahip olduğunu gösterilmiştir.

Saponinler immünstimülatör ve adjuvant aktiviteleri sayesinde immün sistemi etkilemektedirler (Cheeke, 2000). Adjuvant olarak en fazla *Quillaja* saponinleri kullanılmasına karşın *Gypsophila* türünde içeren bazı bitki türlerinden elde edilen saponinlerinde adjuvant aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir (Güçlü-Üstündağ and Mazza, 2007).

1.4.4. Saponinlerin kullanım alanları

Saponinler farklı fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri nedeniyle besin, kozmetik, ilaç endüstrisi gibi birçok çok alanda ticari olarak kullanılmaktadır. Farklı bitki türünden saponin elde edilmesine karşın *Quillaja saponaria* ve *Yucca schidigera* ekstraktları önemli ticari saponin kaynaklarıdır (San Martin and Briones, 1999; Balandrin, 1996).

Doğal noniyonik sürfaktan olarak saponinler duş jeli, şampuan, banyo köpüğü, saç kremi ve losyonu, sıvı sabun, bebek bakım ürünleri ve diş macunu gibi temizlik ürünlerinde kullanılmaktadır (Brand and Brand, 2004). Ayrıca saponinler yaşlanmayı geciktirdiği iddia edilen kozmetik ürünlerinde yer almaktadır. Bazı türlerden elde edilen saponinlerin aşılarda adjuvant olarak kullanılırken (Güçlü-Üstündağ and Mazza, 2007) ilaç endüstrisinde steroid saponin içeren bitki materyalleri steroid hormon ve ilaçların üretiminde yer almaktadır (Marker et al., 1947).

Yucca schidigera ve *Quillaja saponaria* yiyecek katkı maddesi olarak sınıflandırılmıştır. *Yucca* ekstraktı domuz ve kanatlı barınakları ile köpek, kedi ve tavşan yemlerinde amonyak ve kötü kokuyu kontrol etmek için kullanılmaktadır. Ayrıca *Quillaja* ekstraktı Avrupa birliği tarafından köpürme ajanı olarak

sınıflanmıştır ve yiyecek-içeceklerde bu amaçla kullanılmaktadır. Bunun yanında saponinlerin yiyeceklerde antibakteriyel olarak eklenmesi de önerilmektedir (Güçlü-Üstündağ and Mazza, 2007).

1.4.5. Saponinlerin bitkisel materyalden izolasyonu ve analizi

Bitkilerde bulunan saponinlerin genelde çok benzer polaritelere sahip formlarla bir arada bulunduğu için ayrımlarını yapmak oldukça zordur. Bu nedenle bitki materyalinden saponin içeren saf bileşikleri izole etmede bir dizi farklı ayırma teknikleri kullanılmaktadır (Oleszek and Bialy, 2006).

Saponinlerin teşhisinde erken dönemlerde kullanılan yöntemler gravimetri veya klasik özellikleri olan köpürme, hemolitik aktivite, balıklar üzerine toksik etki gibi fizyolojik veya biyolojik özelliklerine dayanmaktaydı. Günümüzde bu yöntemler kullanılmakla birlikte spektrofotometrik ve kromatografik (İTK, gaz kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), flash kromatografisi vs.) yöntemler daha fazla önem kazanmıştır (Oleszek, 2002; Hostettman and Marston, 2005).

Saponinlerin izolasyon stratejisi, genelde 3 aşamada gerçekleşmektedir.

1.Bitki materyalinin uygun çözücü ile ekstraksiyonu

2.Ekstrenin vakum altında yoğunlaştırılması; takibinde çöktürme, sıvı-sıvı ekstraksiyon

3. Çeşitli kromatografik yöntemler (İTK, Kolon kromatografisi, HPLC (Oleszek and Bialy, 2006; Aslan Erdem, 2009).

Saponinlerin çözünürlüğü çözücünün özellikleri (ısı, pH gibi) tarafından etkilenmektedir. Su, alkoller (metanol, etanol) ve bunların sulu karışımları saponinlerin en yaygın kullanılan ekstraksiyon çözücüleri iken ether, kloroform, benzen, etil asetat veya glisial asetik asitte kullanılmaktadır (Güçlü-Üstündağ and Mazza, 2007). Ayrıca polar çözücülerle ekstraksiyon öncesi veya sonrasında yağlı maddelerin arındırılması, genelde petrol eteri gibi apolar çözücülerle yapılmaktadır.

Alkollerle yapılan ekstraksiyon sonrası ekstre vakum altında yoğunlaştırılır ve çöktürme, sıvı-sıvı ekstraksiyon (n-bütanol ile) gibi yöntemler kullanılarak kaba ayırım yapılır. n-bütanol ile yapılan ekstraksiyon da sadece kısa oligosakkarit yan zincirli saponinler butanol fazına geçeceği için bazen sakıncalıdır (Yücekutlu and Bildacı, 2008). Daha ileri bir saflaştırma için ekstreden bileşiklerin izolasyonu silika jel ve ters faz silika jel kolon kromatografisi gibi kromatografik teknikler kullanılarak yapılmaktadır. Silika jel kolon kromatografisi uygulamalarında en çok kullanılan çözücü sistemi kloroform–metanol-su karışımıdır (Hostettman and Marston 2005). Bu karışım izokratik olarak uygulanabileceği gibi (CHCl_3 -MeOH- H_2O ; 13:7:2 gibi) (Gaidi et al., 2004); gradient olarak da uygulanması mümkündür (CHCl_3 -MeOH- H_2O ; 70:30:3→32:25:5) (Poslu, 2006; Avunduk et al., 2008). Saf bileşiğe ulaşabilmek için genellikle bahsedilen yöntemlerin adsorban veya mobil fazı değiştirilerek birçok kez tekrarlanmaları gerekebilir. Ayrıca ham ekstrede bulunan saponinin varlığının tespit edilmesi ve diğer kromatografik aşamaların değerlendirilmesinde özellikle İTK ve renklendirme reaktiflerinin kullanılması oldukça yaygındır (Çizelge 1.8.) (Francis et al., 2002; Yücekutlu and Bildacı, 2008; Aslan Erdem, 2009).

Saponin saflaştırıldıktan sonra MS (Kütle Spektrometresi), proton ve karbon NMR (Nükleer Magnetik Rezonans) ve FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrometresi) içeren analitik metotlar kullanılarak yapısı aydınlatılabilmektedir. Yapı aydınlatma çalışmalarında, saponin hidroliz ile şeker ve aglikon kısmı birbirinden ayrılarak sonra aglikon teshişi yapılmaktadır.

Fakat son zamanlarda NMR ve kütle spektrometrisinde gelişmeler ile saponinlerin herhangi bir bozunmaya uğramadan da yapılarının aydınlatılması mümkündür (Hostettman and Marston, 2005; Aslan Erdem, 2009).

Saponin izolasyonunda kullanılan tekniklerin çoğu kompleks bir karışımdan saponinin ayrımı için gerekmektedir. Fakat silika jel kolon kromatografisi, semipreparatif HPLC ve tekrarlanan preparatif TLC birçok durumda istenen ayırım için yeterli olabilmektedir (Lásztity et al., 1998).

Çizelge 1.8. Bazı bitkilerin ince tabaka kromatografisi ile saponin analizi (Stochmal et al., 2008)

Bitki	Sorbent	Çözücü sistemi
<i>Abizia</i> sap.	Silica gel 60 F	CHCl ₃ –MeOH–HOAc–H ₂ O (15:8:3:2)
Albiziasaponinler A–E	Silica gel 60 F RP-18 WF	CHCl ₃ –MeOH–H ₂ O (15:3:1) MeOH–H ₂ O (7:3)
<i>Alium</i> sap.	Silica gel	<i>n</i> -BuOH–HOAc–H ₂ O (60:15:25)
<i>Argania</i> sap.	Silica gel	<i>n</i> -BuOH–HOAc–H ₂ O (12:3:5)
<i>Arnica</i> sap.	Silica gel 60 RP-18	CH ₂ Cl ₂ –EtOAc(9:1) MeOH
<i>Astragalus</i> sap.	RP-18	MeOH–H ₂ O (8.5:1:5)
Capsicoside E–G	Silica gel	<i>n</i> -BuOH–HOAc–H ₂ O (12:3:5)
<i>Carpolobia</i> sap.	Silica gel 60 F	CHCl ₃ –MeOH–HOAc–H ₂ O (15:8:3:2) CH ₂ Cl ₂ –MeOH (19:1)
Draconins A–C	Silica gel 60 F	<i>n</i> -Hexane–EtOAc (20:1, 7:3) Toluene–PrOH (20:1) CHCl ₃ –MeOH (10:1)
Eranthisaponinler A ve B	Silica gel 60 F RP-18	CHCl ₃ –MeOH–H ₂ O (14:8:1) MeCN–H ₂ O (2:5, 4:1, 1:3)
<i>Glinus</i> Sap.	Silica gel 60 F RP-18 Silica gel Sil G-100	MeOH–H ₂ O (4:1) CHCl ₃ –MeOH–H ₂ O (70:50:4) MeOH–H ₂ O (4:1) CHCl ₃ –MeOH–H ₂ O (70:50:4)

1.5. Serbest Radikaller

Atomlar, çekirdek ile bu çekirdeğin çevresindeki elektronlardan oluşurlar. Atom çekirdeğinin çevresindeki her bir orbitalde spinleri birbirine zıt (↑↓) olan iki elektron

bulunur. Bu elektronlara eşlenmiş veya ortaklanmış elektronlar denir. Eşleşmiş elektrona sahip atom veya moleküller kararlı bir yapı gösterirler. Bu kararlı yapı eşleşmemiş elektron bulundurduklarında bozulur (Halliwell and Gutteridge, 1989). Dış yörüngelerinde bir veya fazla sayıda ortaklanmamış elektron taşıyan güçlü reaktif metabolitler ise serbest radikaller olarak adlandırılmaktadır. Serbest radikaller fizyolojik metabolizmada sentezlenebildikleri gibi eksojen olarak da alınabilirler (Akkuş, 1995). Diğer moleküllere elektron verebildiklerinden ya da onlardan elektron alabildiklerinden dolayı vücutta indirgeyici veya yükseltgeyici olarak davranırlar (Young and Woodside, 2001). Bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjilidir, bu nedenle eşleşmiş elektronları ayrılabilirler. Bu durum serbest radikalleri tehlikeli bazen de kullanışlı yapmaktadır (Fantal, 1996).

En önemli serbest radikaller, oksijen ve azottan oluşan radikallerdir. Çoğu hastalıklarda en önemli rolü oksijen serbest radikalleridir ve endojen ya da eksojen kaynaklı olarak oluşabilmektedirler (Akkuş, 1995; Alhan ve Şan, 2002).

1. Endojen kaynaklar

- Mitokondrial elektron transport zinciri
- Otooksidasyon reaksiyonları
- Enzim reaksiyonları
- Fagositik hücreler (monosit ve makrofajlar, nötrofil, eozinofil) ve endotelial hücreler gibi hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar

2. Eksojen Kaynaklar

- Diyet faktörleri
- İlaçlar
- Sigara dumanı
- İyonize radyasyon

- UV Işıık
- Kimyasal karsinojenler

1.5.1. Reaktif oksijen türleri

Dış orbital yörüngesinde paylaşılmamış bir elektron ile bir oksijen atomu taşıyan bileşiklere reaktif oksijen türevleri adı verilmektedir. Oksijenden oluşan başlıca reaktif oksijen türevleri; süperoksit radikali ($O_2^{\bullet}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$)'dir.

$O_2^{\bullet}$ (Süperoksit) Radikali: Moleküler oksijene (O_2) bir elektron transfer edilerek indirgenmesi sonucu kararsız bir yapı olan süperoksit radikali oluşur.

Süperoksit radikali kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikalın asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır.

H_2O_2 (Hidrojen Peroksit): Süperoksit radikaline bir elektron transfer edilir (süperoksit dismutasyonu) ya da iki elektronun eklenmesi sonucu indirgenmesiyle hidrojen peroksit oluşur.

Hidrojen peroksit biyolojik zarları kolayca geçebilir. Ortaklanmamış elektron içermediğinden radikal özelliğı taşımaz, reaktif bir tür değildir. Hidrojen peroksitin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, Cu, Fe gibi metal iyonları varlığında hidroksil radikalının öncülü olarak davranmasıdır. Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki ferril demir ve perferril demir oluşumuna neden olur. Bu formdaki reaktif demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Potansiyel oksitleyici özelliğı nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan ortamdan uzaklaştırılması gerekir (Kılınç ve Kılınç, 2002).

$HO^{\bullet}$ (Hidroksil) Radikali: Son derece reaktif bir oksidan radikaldır, yarılanma ömrü çok kısadır ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) en güçlüsüdür. Su dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle hızlı bir şekilde tepkimeye girer. Serbest oksijen

radikalleri etkilerini hidroksil radikali formuna dönüşerek şeker, aminoasit, lipid ve nükleotitler gibi molekülleri etkileyerek doku hasarları meydana getirir (Erenel vd., 1992).

1.6. Antioksidanlar

Organizmalarda serbest radikal oluşumunu kontrol altında tutmak ve bu moleküllerin zararlı etkilerine engel olmak üzere antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge içindedir. Fakat reaktif oksijen birikimi organizmada bulunan veya gıdalarla alınan antioksidanlarla dengelenmediği durumlarda “oksidatif stres” oluşmaktadır. Bunun sonucu olarak kanser, koroner kalp rahatsızlığı, hücresel yıpranma ve yaşlanma, mutajenizm, bağışıklık sistemi hastalıkları, DNA ve hücre membranları gibi biyolojik yapıların oksidatif zararını meydana getiren radikalik zincir reaksiyonları oluşmaktadır (Halliwell and Aruoma, 1991). Bu zincirleme reaksiyonlar dizisi, antioksidanlar tarafından durduruluncaya kadar devam eder (Gökpınar vd., 2006).

Antioksidan savunma sistemi enzimatik ve nonenzimatik yapılardan oluşmaktadır. Enzimler; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GP), glutatyon redüktaz (GSH) ve solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, süperoksidi detoksifiye eden enzimdir (Akkuş, 1995). Glutatyon, bilirubin, radikal tutucu özelliği ile ürik asit, albumin, bakır iyonlarını bağlayarak metal katalizli reaksiyonları sınırlayan seruloplazmin, hemoglobin, ferritin birer endojen kaynaklı enzimatik olmayan antioksidanlardır (Dündar ve Aslan, 1999).

Enzimatik olmayan yollarla radikallerin temizlenmesinde ve zincir reaksiyonlarının durdurulmasında etkili eksojen kaynaklı antioksidan maddeler ise çoğunlukla bitkiler tarafından sentezlenmektedir. Bunlar süperoksit radikali dışındaki diğer bir indirgeyici hücresel ajan olan askorbik asit (C vitamini), zincir kırıcı antioksidan etki gösteren α - tokoferol (E vitamini), radikal toplayıcı etkisi bulunan β -karoten (vitamin A) ve polifenoller gibi moleküllerdir (Edge et al., 1997).

Ayrıca, eksojen kaynaklı antioksidanlar vücut içi antioksidan sisteme destek olurlar ve doğal ve sentetik antioksidanlar olmak üzere iki grup altında toplanabilirler.

1.6.1. Sentetik antioksidanlar

Kimyasal prosesler sonucu üretilen sentetik antioksidanlardan en önemlileri; Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA), Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT) ve *tert*-Bütil Hidrokinon (TBHQ) ve Gallatlar'dır. Gıdaları bozulmaya karşı korumakta olup onların daha uzun süreli saklanması sağlar ancak bunların toksik etkilerinden şüphelenilmektedir. Bu nedenle son yıllarda yeni, daha güvenli ve ucuz antioksidan maddelerin bulunması için doğal ürünler üzerinde yaygın çalışmalar yapılmaktadır (Akkuş, 1995; Gülçin et al., 2004).

1.6.2. Doğal antioksidanlar

Doğal antioksidanlar hemen hemen tüm bitkilerde, meyvelerde, sebzelerde, mikroorganizmalarda, mantarlarda ve hatta hayvansal dokularda dahi bulunmakta olup çoğunlukla polifenolik yapıdaki maddelerdir. Antioksidanların en önemlileri fenolik bileşikler veya polifenoller ve bunların türevleridir. Fenolik bileşikler; kimyasal yapıları basit bileşiklerden yüksek polimerleşmiş maddelere kadar çeşitlenebilen bitkisel maddelerdir (Keskin ve Erkmen, 1987).

Fenolik Bileşikler: Kimyasal olarak fenolik bileşikler, “bir aromatik halka ve buna bağlı olarak fonksiyonel türevleri de içeren, bir ya da birden fazla hidroksi grup içeren maddeler” olarak tanımlanabilmektedir. Fenolik bileşikler bitki dünyasının büyük bir kısmında bulunan, fitokimyasalların en geniş sınıflarından birini oluşturan ve insan yaşamında gerekli olan bileşiklerdir. Fenoller, bitkilerde çeşitli meyve, sebze, kuruyemiş, tohum, çiçek, kök ve gövde kısımlarında doğal olarak sentezlenen maddelerdir. Bu bileşiklerin bazıları terpenoidler gibi olup bitkiye koku ve tat verirken bazıları kinonlar ve tanenler gibi bitki pigmentlerini oluştururlar (Wollgast and Anklam, 2000).

Bitkilerdeki fenolik bileşiklerin miktarı ve tipi; çeşit, olgunluk, yükseklik, toprak koşulları, sıcaklık gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle bazı türler

fenolik bileşiklerce zengin olurken bazıları ise olmayabilmektedir (Ryan and Robarts, 1998).

Fenolik bileşikler güçlü antioksidanlardır ve aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Antioksidan aktiviteleri redoks özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Bunlar serbest radikallerin, singlet ve triplet oksijenin nötralize edilmesinde veya peroksidazların dekompozisyonunda önemli rol oynarlar (Javanmardi et al., 2003).

Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler “fenolik asitler” ve “flavonoidler” olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Cemeroğlu et al., 2004).

Flavonoidler: Flavonoidlerin karbon iskeletini, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon (C) atomu içeren difenilpropan (C6-C3-C6) yapısı oluşturur. Flavonoidlerin tümü C6-C3-C6 yapısındadır, ancak moleküldeki hidroksil (OH) grubu sayısı ve dağılımı açısından farklıdırlar.

Doğada, birçoğu yaprak, çiçek ve kökte bulunan 4000’den fazla flavonoid çeşidi vardır. Meyve, sebze, şarap, kakao ve çayda bol miktarda bulunurlar. Lipid peroksidasyonunu inhibe eden flavonoidler etkili antioksidan, serbest radikal süpürücüdür (Cook and Samman,1996). Flavonoidlerin antioksidan olarak davranma yetenekleri, yapıları ile yakından ilişkilidir. Flavonoidlerin antioksidan potansiyelleri, hidroksil gruplarının sayısına ve dizilisine, şekilsel konjugasyonuna ve aynı zamanda elektron veren ve elektron alan grupların halkalı yapıda bulunmasına bağlıdır (Yücel, 2002).

Son zamanlarda hakkında en çok araştırma yapılan doğal antioksidan gruplarından biridir. Antosiyanin, kateşinler, izoflavonlar ve flavonoller gibi türleri vardır (Hertog et al., 1992).

Fenolik Asitler: Bitkilerde yüksek miktarda bulunan fenolik asitler hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asitleri içeren iki gruptan oluşur. Koyu renkli ve tadı buruk bileşiklerdir. Fenolik asitler, gıdaların renkleri, beslenme ve antioksidan özellikleri ile ilişkilidir (Robbins, 2003).

1.6.3. Antioksidan etki mekanizmaları

Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayan antioksidanlar ise hücre dışında daha fazla etkilidir. Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler:

I. Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

- a) Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki,
- b) Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etki,
- c) Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki.

II. Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

- a) Süpürücü (scavenging) etki: ROS'ları etkileyerek onları tutma veya çok daha az reaktif başka bir moleküle dönüştürmesidir (Ör: Enzimler).
- b) Baskılayıcı (quencher) etki: ROS'lar ile etkileşip onlara bir proton ekleyerek aktivite kaybına neden olmasıdır (Ör: Flavonidler, vitaminler).
- c) Onarıcı (repair) etki.
- d) Zincir kırıcı (chain breaking) etki: ROS'ları ve zincirleme reaksiyonları başlatacak diğer maddeleri kendilerine bağlayıp zincirlerini kırarak fonksiyonlarını önleyici etki göstermesidir (Ör: Hemoglobin, seruloplazmin, mineraller) (Harris, 1992; Krinsky, 1992).

1.7. Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Antioksidan kapasiteyi ölçmek için bu güne kadar çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Toplam antioksidan kapasitenin ölçülmesini sağlayan yöntemler, hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonlarına dayanan yöntemler ve elektron transferine (ET) dayanan yöntemler olmak üzere ikiye ayrılabilir. HAT temelli yöntemlerin birçoğu azobileşiklerin bozulması ile oluşan peroksil radikalleri için antioksidan ve substratın rekabetine dayanan yarışmacı reaksiyonları kullanmaktadır. Bu yöntemler oksijen

radikal absorbans kapasite (ORAC), toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre (TRAP) ve krosin beyazlatma yöntemlerini içermektedir.

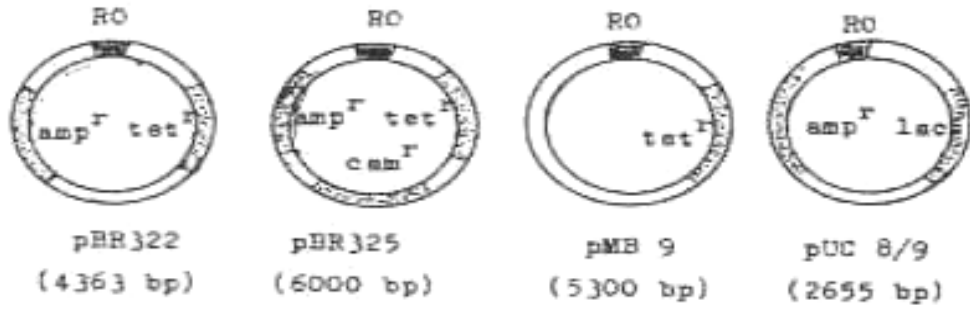
ET temelli yöntemler antioksidanın oksidanın indirgeme yeteneğini renk değişimi ile ölçmektedir. Renk değişiminin derecesi örneklerin antioksidan konsantrasyonu ile alakalıdır. ET temelli yöntemler toplam Folin-Ciocalteu ayırıcı ile Toplam Fenolik yöntemi (FCR), Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC), demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP), oksidan olarak bakır (II) kullanan toplam antioksidan potansiyel yöntemi (CUPRAC) ve DPPH (2,2-difenil- 1-pikrilhidrazil) yöntemini içermektedir (Albayrak vd., 2010).

1.8. Plazmid DNA

Plazmidler; çift iplikli DNA molekülünden yapılmış, sitoplazma içinde dairesel yapıda bir uçları ile bakteri sitoplazmasının bir noktasına bağlanmış şekilde, bakteri kromozomundan ayrı olarak replike olabilen bakteri kromozomundan daha küçük genetik elementlerdir (Şekil 1.5.) (Bilgehan, 2002). Genellikle az sayıda gen taşımakta ve hücreden bağımsız bir biçimde kendi kendilerine çoğalabilmektedirler. Replikasyon için bir orijine ve konakçı bakteri içinde devamlı kalabilmelerini kolaylaştıracak genlere ihtiyaç duymaktadırlar. Plazmidler, bulundukları bakterilere antibiyotik direncini, virülansını ve bakterinin metabolik kapasitesini değiştirebilecek fonksiyonlar kazandırabilmektedirler (Doğan, 2009).

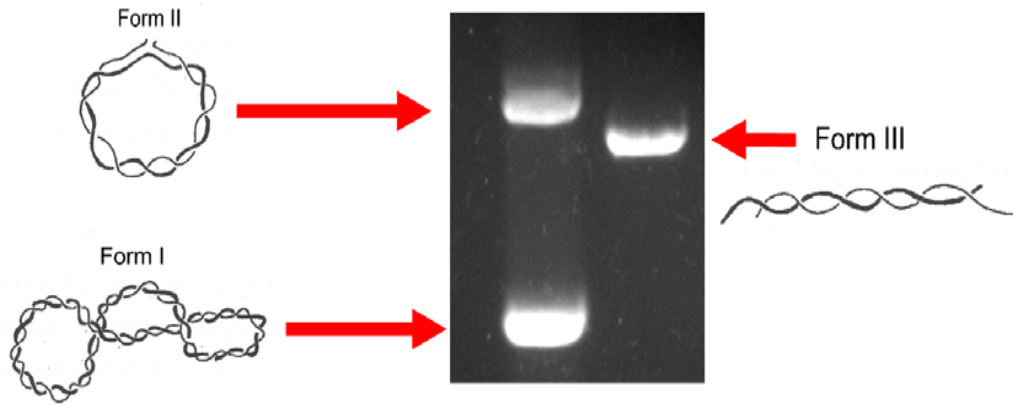
Rekombinant DNA teknolojisinde bakterilerde doğal olarak bulunan plazmidlerden ziyade, *in vitro* koşullarda ve amaca uygun olarak kendilerine istenilen özel özellikler katılarak hazırlanan suni plazmidler (pBR322, pUC8/9 ve diğerleri) tercih edilmektedir. Doğal plazmidlerin stabilitesine tam güvenilemediği gibi özellikleri yönünden de hem yetersiz ve hem de istenilenleri taşımadıkları için, klonlamada tercih edilmemektedirler.

Plazmid DNA, elektroforezde 3 farklı formda gözlenebilirler. Molekül ağırlıkları aynı olmasına karşın bu üç formun jeldeki göçleri farklıdır. Bu farklılık agaroz konsantrasyonuna bağlı olmakla beraber uygulanan akıma, tamponun iyonik kuvvetine ve Form I'in yoğunluğuna da bağlıdır.



Şekil 1. 5. *E. coli*'ye ait bazı plazmidler (Arda, 2000)

Bozulmamış olan süpersarmal formda (Form I), yük yoğunluğu fazla hacmi de düşük olduğu için jelde en hızlı hareket eder. Eğer DNA'nın bir zincirinde bir kesim meydana gelirse gevşek sarmal form (Form II) oluşur ve yoğunluğu daha az olduğu için daha yavaş hareket eder. Eğer iki zincirde kesilirse Form I ve Form II arasında hareket eden bir doğrusal form (Form III) oluşacaktır (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Plazmid DNA formları ve agaroz jeldeki görüntüleri (Doğan, 2009)

DNA çeşitli bileşikler tarafından hidrolitik veya oksidatif yolla yarılmaya uğratılabilir. Hidrolitik işlem fosfodiester bağlarının kırılması ve DNA'nın parçalanmasıyla sonuçlanır. Bu işlemde, ortamda H_2O_2 , O_2 , tiyol veya askorbik asit gibi herhangi bir indirgeyici madde kullanılmaz. Ancak, hidrolitik DNA bölme işlemi uzun reaksiyon zamanı gerektirir. Oksidatif işlem de ise, ortama indirgeyici reaktiflerin ilave edilmesiyle, DNA, nükleobazların oksidasyonu ile yarılr veya nükleotitlerin H1' veya H4' veya H5'-deoksiriboz hidrojen atomunun ayrılmasıyla şeker küçük moleküllere parçalanır (Arıcı ve Nazır, 2010).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Alkalen Proteaz Enziminin Mikroorganizmalardan Üretimi ve Saflaştırılması

Literatürde *Bacillus* cinsi mikroorganizmalardan alkalen proteaz saflaştırılması ve karakterizasyonuna ilişkin birçok çalışma bulunmaktadır. Çalışmalarla proteaz enziminin üretilmesinde mikroorganizmaların geliştiği ortamın bileşenleri, havalandırma, pH, ısı ve inkübasyon zamanı gibi bazı faktörler rol oynadığı bildirilmiş ve bazıları optimize edilmiştir (Çizelge 1.4). Ayrıca proteaz enziminin saflaştırmasında farklı tekniklerin kullanıldığı (Çizelge 1.5) ve değişik saflaştırma kat sayıları ve verimleri elde edildiği görülmektedir.

Anwar and Saleemuddin (1998), besiyerine eklenen surfaktanların (Tween 80, SDS, Triton X-100) proteaz üretimini indüklediğini, fungisid ve fenoliklerin ise inhibisyona neden olduğunu bildirmiştir.

Kaur et al. (2001), *Bacillus* sp. P-2'den alkalen proteaz üretimi için %0,25 pepton ve %0,25 maya ekstraktının %1 glukoz içeren nutrient broth besiyeri kullanarak maksimum aktivite elde edildiğini bildirmiştir.

El-Safey and Abdul-Raouf (2004), *Bacillus subtilis*'den proteaz üretimi için 10g jelatin eklenen nutrient broth besi yeri kullanmıştır. Ayrıca enzim üretimi için optimum inkübasyon süresinin 30 saat, ısısının 40 °C, pH'nın 7,0 olduğunu ve en iyi tamponun ise fosfat tamponu olduğu bildirmektedir.

Joo et al. (2004), *Bacillus* sp. 103'den alkalen proteaz üretimini %2,0, %1 soya küspesi, %1 kazein, %0,5 buğday unu, %0,5 K₂HPO₄, %0,5 sodyum sitrat, %0,01 MgSO₄ ve %0,4 sodyum karbonat içeren besiyerinde 37°C ve 250 rpm'de 48 saat süreyle bakterinin inkübasyonunu gerçekleştirerek maksimum aktivite elde edildiğini bildirmiştir.

Gerze et al. (2005) *Bacillus subtilis megatherium*'den proteaz üretimini, nutrient broth (%0,5 pepton, %0,3 et ekstrakt, %1 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) besiyerinde 37°C'de bakterinin inkübasyon ile gerçekleştirmiştir.

Orhan et al. (2005), *B. subtilis* ve *B. cereus* suşlarından proteaz üretimi için nutrient broth (%0,5 pepton,%0,3 et ekstrakt, %1 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) besiyerinde 37°C ve 200-250 rpm çalkalama hızında 20-22 saat bakterileri inkübe etmiştir.

Zambare et al. (2007), *Bacillus cereus* MCM B-326'den maksimum alkale proteaz üretimini, %1 nişasta, %1 buğday kepeği, %1 soya unu ve %0,3 CaCO_3 (pH 9,0) içeren besi yerinde bakterinin 36 saat inkübasyon ile elde ettiklerini bildirmiştir.

Nilegaonkar (2007), *Bacillus cereus* MCM B-326'den proteaz üretimi için en uygun şartların %1 nişasta, %1 soya küspesi ve %0,3 CaCO_3 (pH 9,0) içeren besiyerinde 30°C ve 150 rpm'de 36 saat inkübasyon olduğunu bildirmiştir.

Mukhtar and Ul-Haq (2008), *Bacillus subtilis* IH-72'den alkale proteaz üretimini %2 soya küspesi, %1 polipepton, %1,5 glukoz, %0,1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, %0,5 KH_2PO_4 , %0,5 Na_2CO_3 içeren besiyerinde ve 37°C'de 48 saat bakterinin inkübasyonu ile gerçekleştirmiştir.

Mohd and Jameel (2011), 5 farklı *Bacillus* türünden alkale proteaz üretimi için bakteriyi, %0,5 glukoz, %0,75 pepton, %0,5 NaCl, %0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, %0,01 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH 10) içeren besiyerinde 37°C ve 150 rpm'de 48 saat inkübe etmiştir.

Srividya and Mala (2011), *Bacillus* sp. Y'den alkale proteaz üretimi için optimum şartların, %1 pirinç unu , %0,5 NaCl, %10 yağsız süt ve %0,4 Na_2CO_3 (pH 7,5) içeren besiyeri, 37°C, 150 rpm çalkalama hızı ve 72 saat olduğunu bildirmiştir.

Uyar et al. (2011), *Bacillus* sp. CA15'den maksimum alkale proteaz üretimi için optimum şartların 35°C'de %1 yağsız süt, %1 nişasta ve %0,6 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH 8,0) içeren besiyeri olduğunu bildirmiştir.

Akcan (2012), *B. licheniformis* ATCC 12759'den proteaz üretimini %1 maya ekstrakt, %0,5 pepton, %0,5 NaCl, (pH 7,0) içeren besiyerinde ve 37°C'de 24 saat bakterinin inkübasyon ile gerçekleştirmiştir.

Yang et al. (2000), *B. subtilis* Y-108'den proteaz üretimi için optimize edilen şartların; %7 karides ve yengeç kabuğu unu, %0,1 K₂HPO₄, %0,05 MgSO₄, %1 arabinoz, % 1,5 NaNO₃ ve %1,5 CaCl₂ içeren besiyerinde (pH 6,0), 30°C ve 180 rpm çalkalama hızında 72 saat süresince bakterinin inkübasyon olduğunu bildirmiştir. Enzimin saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim (DEAE-Sefaroz CL-6B) ve jel geçirgenlik (Sefakril S-200) kromatografisi teknikleri kullanarak sırayla 4, 11, 20 ve 37 kat saflaştırma ile %18 verim elde edilmiştir. SDS-PAGE ile enzimin molekül ağırlığı 44 kDa olarak bulunmuştur.

Singh et al (2001a) *Bacillus sp.* SSR1'den proteaz üretimini, %1 laktoz, %0,3 et ekstrakt, %0,3 maya ekstrakt, %1 biyopepton, %0,5 NaCl ve %0,02 KH₂PO₄ (pH 10) içeren besiyerinde 40°C ve 150 rpm çalkalama hızında bakterinin inkübasyonu ile gerçekleştirmiştir. Enzim, saflaştırmak için %80 amonyum sülfat, iyon değişim (DEAE-Sefadeks A-50) ve jel filtrasyon (Sefaroz 6B) kromatografisi teknikleri kullanarak sırayla 4,6; 16,5; 19,3 kat saflaştırma ve 36,9 verim elde edilmiştir. SDS-PAGE analizi ile saflaştırılan enzim tek band olarak gözlenmiş ve moleküler ağırlığını 29 kDa olarak bulunmuştur.

Kumar (2002), *Bacillus pumilus* MK6-5'den alkalen proteaz üretimi, %1 peynir altı tozu, %0,25 mısır likörü, %1 glukoz, %0,5 tripton, %1 sodyum sitrat, %0,02 MgSO₄.7H₂O ve %0,65 Na₂CO₃ (pH 9,6) içeren besiyerinde 35°C ve 250 rpm çalkalama hızında 60 saat bakterinin inkübasyon ile elde edilmiştir. Enzim, %80 amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim (DEAE-Sefaroz CL-6B) ve jel filtrasyon (Sefakril S-200) kromatografi teknikleri ile sırayla 1,2; 23,7; 36,6 kat saflaştırılmış ve %26,2 verim elde edilmiştir. Saflaştırılan enzimin SDS-PAGE analizinde tek band olarak gözlenmiş ve moleküler ağırlığı 28 kDa bulunmuştur.

Huang et al. (2003) *Bacillus pumilus*'den maksimum alkalen proteaz üretimini %3 kepek, %2 fasulye tozu, %0,3 maya ekstrakt, %0,3 K₂HPO₄, %0,04 NaH₂PO₄, %0,4 CaCO₃ (pH 7,0) içeren besiyerinde gerçekleştirmiş ve bakterinin inkübasyonuna 35°C'de 36 saat süre ile devam etmiştir. Elde edilen enzimi saflaştırmak için hidrofobik anyon değişim, jel filtrasyon ve hidrofobik etkileşim kromatografisi teknikleri kullanılmış ve sırayla 4,09; 30,43; 38,65 kat saflaştırma ve %0,88 verim

elde edilmiştir. SDS-PAGE analizi ile saflaştırılan enzim tek band olarak gözlenmiş ve moleküler ağırlığı 32 kDa olarak bulunmuştur.

Beg and Gupta (2003), *B. mojavensis*'den alkalen proteaz üretimi için %0,2 glikoz, %0,1 KH₂PO₄, %0,3 K₂HPO₄, %0,2 Na₂SO₄, %0,01 MgSO₄.7H₂O, ve %1 casamino asit (pH 7) içeren besiyerini tercih etmiştir ve bakterini inkübasyonuna 50°C ve 250 rpm'de 24 saat devam etmiştir. Enzimin saflaştırılmasında amonyum %85 sülfat çöktürmesi ve anyon değişim kromatografisi (Q-sefaroze) kullanılarak sırayla 5,8 ve 17,1 kat saflaştırma ile %37,2 verim elde edilmiştir. Çalışmada saflaştırılan enzim SDS-PAGE analizi ile tek band olarak gözlenmiş ve moleküler ağırlığı 30 kDa olarak belirlenmiştir.

Adinarayana et al. (2003), *B. subtilis* PE-11'den maksimum alkalen proteaz üretimini, %0,5 glikoz, %0,75 pepton ve %5 tuz solüsyonu içeren besiyerinde 37°C ve 140rpm çalkalama hızında 48 saat bakterinin inkübasyonu ile gerçekleştirmiştir. Enzimin saflaştırılması için %60 amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon kromatografisi teknikleri kullanılmıştır ve sırayla 1,2 ve 21 kat saflaştırma ile %7,5 verim elde edilmiştir. Jel filtrasyonu sonrası SDS-PAGE ile tek band olarak gözlemlenilmiş ve 15 kDa moleküler ağırlığı bulunmuştur.

Joo and Chang, (2005), *B. clausii* I-52'den alkalen proteaz üretimini, %1,5 soya küspesi, %1 buğday unu, %2,5 sıvı maltoz, %0,4 K₂HPO₄, %0,1 Na₂HPO₄, %0,01 MgSO₄.7H₂O, %0,6 Na₂CO₃ içeren besiyerinde 37°C ve 250 rpm'de 48 saat bakterinin inkübasyonu ile gerçekleştirmiştir. Enzim saflaştırması için Diaion HPA75, Fenil-Sefaroz ve DEAE-Sefaroz kromatografi teknikleri kullanılmış ve sırayla, 1,2; 2,7; 9,6 kat saflaştırma ve son olarak %78,9 verim elde edilmiştir. SDS-PAGE analizi ile enzimin moleküler ağırlığı 28 kDa olarak bulunmuştur.

Gouda (2006), *Bacillus* sp. MIG'den alkalen proteazların üretimi için %1 buğday unu, %0,5 maya ekstrakt ve mineral tuzlarını da içeren besiyerini kullanarak maksimum aktivite elde etmiştir. Aseton çöktürmesi, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi teknikleri ile 2 farklı proteaz izole etmiştir. Çalışmada enzimlerden proteaz 1'i %12,5 verim ile 19,3 kat saflaştırırken proteaz 2'yi %13,6 verim ile 16,1

kat saflaştırılmıştır. Enzimlerin moleküler ağırlığını SDS-PAGE analizi ile 36 ve 23 kDa olarak bulunmuştur.

Bhaskar et al. (2007) *B. proteolyticus* CFR300'den proteaz üretimi için optimum şartların, nutrient broth besiyerinde (pH 9,0), 37°C, 100 rpm çalkalama hızı ve 96 saat inkübasyon süresi olduğunu bildirmiştir. Enzim saflaştırmak için %70 amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon kromatografisi ile gerçekleştirmiştir. SDS-PAGE analizi ile saflaştırılan enzimi tek band olarak gözlemlemiş ve moleküler ağırlığı 29 kDa olduğunu tespit etmiştir.

Deng et al. (2010), *Bacillus* sp. B001'den alkalen proteaz üretimi için %0,1 glukoz, %0,5 tripton, %0,5 maya ekstrakt, %0,1 KH₂PO₄, %0,02 MgSO₄, %1 Na₂CO₃ (pH 10) içeren besiyerinde, bakterinin 30°C ve 200 rpm'de 30 saat inkübasyonu ile gerçekleştirmiştir. Çalışmada enzim saflaştırmasında amonyum sülfat (%80), diyaliz, Resource Q yüksek performanslı kolon ve jel filtrasyon (S perdeks 200) teknikleri kullanarak sırayla 2,4; 4,1; 6,8 kat saflaştırma ile %5,6 verim elde etmiştir. SDS-PAGE analizi sonucu enzim molekül ağırlığını 28 kDa olarak belirlemiştir.

Rajkumar et al. (2011), *B. megaterium* RRM2'den alkalen proteaz üretimini %0,4 laktoz, %0,5 pepton, %1 jelatin, %0,3 NaCl ve deniz suyu (pH 9,0) içeren besiyerinde, 42 saat inkübasyon süresi ile 37°C ve 250 rpm'de gerçekleştirmiştir. Enzimin saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesi (%85), jel filtrasyon (Sefadeks G100) ve Q-Sefaroz iyon değişim kromatografisi kullanarak sırayla 7,5; 23,78; 30,61 kat saflaştırma ve %22,2 verim elde etmişlerdir. SDS-PAGE analizi ile enzim moleküler ağırlığı 27 kDa olarak bulunmuştur.

Yossan et al. (2006), tarafından *Bacillus megaterium*'den izole edilen alkalen proteaz enziminin saflaştırılması için hidrofobik etkileşim (Bütil-Toyopearl 650M, Fenil-Toyopearl 650M) ve daha sonra jel filtrasyon (S perdeks 75 10/300 GL) kromatograf  basamakları kullanılmıştır. Sonuç olarak 148 kat gibi yüksek bir enzim saflaştırma gerçekleştirilmesine karşın %2 verimlik bir verim elde edilmiştir. SDS-PAGE analizi sonucu saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı 27 kDa olarak bulunmuştur.

Jellouli et al. (2009) tarafından *Vibrio metschnikovii* J1'den izole edilen proteazı saflaştırmak için ultrafiltrasyon, jel filtrasyon (Sefadeks G75) ve iyon değişim (DEAE-selüloz) kromatografi basamaklarını kullanılmış ve sırayla 1,25; 1,64; 2,1 kat saflaştırma ile %33,3 verim elde etmiştir. SDS-PAGE analizi ile saflaştırılan enzim tek band olarak gözlenmiştir ve moleküler ağırlığı 30 kDa olarak bulunmuştur.

Ahmed et al. (2011), *Bacillus subtilis*'den alkalen proteazı saflaştırmak için (%70) amonyum sülfat çöktürmesi, dializ ve jel filtrasyon (Sefadeks G100) kromatografisi teknikleri ile gerçekleştirmiş ve sırayla 1,11; 1,18; 1,49 kat saflaştırma ile %3,11 verim elde etmiştir. SDS-PAGE analizi sonucu saflaştırılan enzim tek band olarak gözlenmiştir ve moleküler ağırlığı 27 kDa olarak bulunmuştur.

2.2. Proteaz Enzim Aktivitesine Çeşitli Sürfaktan ve Deterjanların Etkisi

Anwar and Saleemuddin, 1998 tarafından *Bacillus* sp. Y'den izole edilen alkalen proteazın, anyonik bir surfaktan olan SDS'nin varlığında oldukça stabil olduğu bulunmuş ve deterjanlarda kullanım potansiyeli vurgulanmıştır.

Gupta et al. (1999), *Bacillus* SB5'den elde edilen proteazın aktivitesinin saponin, Tween 20 ve Tween 80 gibi farklı surfaktanlar tarafından stimule edildiği göstermiştir. Bunlar arasında maksimum stimülasyon saponin ile 1 saat inkübasyon sonunda aktiviteyi yaklaşık iki katına çıkararak elde edilmiştir.

Oberoi et al. (2001) *Bacillus* sp. RGR-14'den izole edilen alkalen proteazın Tween 20, Tween 40, Triton X-100 ve saponin gibi surfaktanlar ile 1 saat inkübasyon sonucu aktivite kaybına uğradığını fakat Tween 85 varlığında aktivitenin %29 arttığını bildirmiştir.

Singh et al. (2001a), *Bacillus* sp. SSR1'den izole edilen alkalen proteazın iyonik ve non-iyonik deterjanlar (Sodium citramide, Sodium deoxycholate, Tween 20, Tween 80 ve Triton X-100) ve surfaktanlar varlığında aktivitesinin artmakta olduğunu bildirmektedir. Bu özellikleri nedeniyle elde edilen proteazın deterjan endüstrisinde kullanılabileceğini ileri sürmüştür.

Johnvesly and Naik (2001) tarafından *Bacillus* sp. JB-99'den izole edilen alkalen proteazın %5 Triton X-100 varlığında %78 ve %0,5 SDS varlığında enzim aktivitesinin %75'ini korunduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte %5 H₂O₂ varlığında enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir. Ayrıca Mn²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺ ve Co²⁺ enzim aktivitesinde artışa neden olurken Fe³⁺, Hg²⁺ ve Zn²⁺ gibi metal iyonlarının enzim aktivitesinde inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir.

Moreira et al. (2002), tarafından *Nocardiosis* sp. 'den izole edilen proteazın SDS, saponin, Tween 20 ile 30 dakika inkübasyon sonrasında enzim aktivitesinin artış bildirilmesine karşın inkübasyon süresi 1 saate çıkarıldığında enzimin aktivitesinin ancak %50 ile %75 arasında korunduğu gözlenmiştir.

Beg and Gupta (2003), *B. mojavensis*'den izole edilen alkalen proteazın enzim aktivitesinde, Cu²⁺ ve Mn²⁺ metal iyonlarının varlığında %36 artış bildirmiştir. Ayrıca enzimin, ağartıcı olarak kullanılan ajanlar (H₂O₂, Sodium perborat), surfaktanlar (Tweenler, Triton X-100, Sodyum choleate) ve bazı ticari yıkama deterjanların varlığında oldukça stabil olduğunu göstermiştir.

Beg and Gupta (2003) tarafından *Bacillus mojavensis*'den elde edilen alkalen proteaz aktivitesinin noniyonik surfaktanlar varlığında arttığını bildirilmiştir.

Joo et al. (2003) endüstriyel açıdan önemli olan *B. clausii* I-52'den elde edilen alkalen proteazın geniş bir pH ve ısı aralığında etkin olmasının yanında 72 saat inkübasyon sonrası SDS ve oksidantların varlığında yüksek stabilite gösterdiğini bildirmiştir. Bu nedenle endüstriyel uygulamalar için potansiyel bir kaynak olabileceğini ileri sürmüştür.

Kumar and Bhalla (2004), *Bacillus* sp. APR.4'den izole edilen alkalen proteazın Triton X-100 ve Tween 20 gibi surfaktanlar ile 1 saat inkübasyonu sonrası enzim aktivitesinde azalma gözlemlendiğini bildirmiştir

Joo et al. (2004), *Bacillus* sp. 103'den izole edilen alkalen proteazın Triton X-100 ve Tween 20 gibi noniyonik surfaktanlar ve anyonik surfaktan SDS ile 72 saat inkübasyon sonucu oldukça stabil kaldığını fakat okside edici ve ağartıcı ajanlar olan

hidrojen peroksit ve sodyum perborat varlığında %10 ile %5 arasında bir aktivite kaybına uğradığını bildirmiştir.

Joo and Chang (2005), *B. clausii* I-52'den izole edilen alkalen proteazın %5 Triton X-100 ve %5 Tween 20 varlığında enzim aktivitesinde sırayla %74 ve %67 oranında artış bildirmiştir.

Gupta et al. (2005), *B. pseudofirmus*'den izole edilen alkalen proteazın, %0,1 SDS ve %0,1 Triton X-100 varlığında enzim aktivitesinin korunduğunu, %0,1 Tween 80'nin varlığında enzim aktivitesinin etkilenmediğini bildirmiştir. Ayrıca Mn^{2+} , Zn^{2+} and Mg^{2+} iyonlarının enzimin aktivitesini etkilemediğini fakat Ca^{2+} (1 mM) ve Cu^{2+} (5 mM) iyonlarının enzimi aktive ettiğini göstermiştir.

Gouda (2006), *Bacillus* sp. MIG'den izole edilen proteazların noniyonik surfaktanlar (Triton X-100 ve Tween 20) ve ağartıcı ajanlar (H_2O_2) varlığında stabil olduğunu bildirmiştir. Çalışmada farklı endüstriyel alanlarda kullanım için *Bacillus* sp. MIG'nin potansiyel bir alkalen proteaz kaynağı olduğu ileri sürülmüştür.

Nascimento and Martins (2006), *Bacillus* sp.'den izole edilen proteazın farklı konsantrasyonlardaki SDS, Triton ve H_2O_2 varlığında 30 dakika inkübasyon sonunda oldukça aktivite kaybına uğradığını bildirmiştir.

El Hadj-Ali et al. (2007), *B. licheniformis* NH1'den izole edilen alkalen proteazın SDS, Tween 20, Triton X-100, sodium perborat ve H_2O_2 (40°C) ile 1 saat inkübasyon sonunda enzim aktivitesini değerlendirmiştir. Non-iyonik surfaktan olan Tween 20 ve Triton X-100 varlığında enzimin stabilitesini koruduğunu anyonik surfaktant SDS'nin varlığında enzimin aktivite kaybına uğradığını bildirilmiştir.

Chu (2007), *Bacillus* sp. APP1'den izole edilen alkalen proteazın %5 SDS ile 72 saat inkübasyonu sonucu %73 oranında aktivitesini koruduğunu bulurken aynı şartlarda %1 Tween 20 ve %5 H_2O_2 'nin enzim aktivitesini %10 arttırdığını bulmuştur.

Esposito et al. (2009a), *Colossoma macropomum*'den izole edilen alkalen proteazın noniyonik (Tween 20 ve Tween 80) ve iyonik surfaktanlar (saponin ve sodium choleate) ile bir saat inkübasyon sonunda enzim aktivitesinde bir miktar artış (%7-

18) gözlemlendiğini, SDS varlığında ise enzimin oldukça aktivite kaybına uğradığını bildirmiştir.

Espósito et al. (2009b), tarafından alkalen proteaz aktivitesine surfaktanların etkisini araştırıldığı çalışmada, enzimin Tween 20 ve 80 ile 1 saat inkübasyon sonucu aktivitesinin %20 oranında artırdığını, saponin varlığında ise enzim aktivitesinin sadece %64'nün korunduğu bulunmuştur.

Haddar et al. (2009), *Bacillus mojavensis* A21'den izole edilen alkalen proteazın 1 saat inkübasyon sonrası anyonik (%0,1 SDS) ve noniyonik (%1 ve 5 Tween 80 ve %1 Triton X-100) surfaktanlar varlığında stabilitesini koruduğunu bildirirken H_2O_2 ve sodyum perborat varlığında ise aktivite kaybına uğradığını bildirmiştir. Ayrıca çalışmada surfaktanların ve H_2O_2 konsantrasyonu arttıkça enzimin aktivite kaybında arttığı görülmektedir.

Cheng et al. (2010), *Bacillus alcalophilus* TCCC11004'den izole edilen alkalen proteazın %3 Triton X-100 ile 1 saat inkübasyon sonrası enzim aktivitesinin %100 korunduğunu ancak %0,5 SDS ve %1 H_2O_2 varlığında enzim aktivitesinde yaklaşık %30 kayıp meydana geldiğini bildirmiştir.

Deng et al. (2010), *Bacillus* sp. B001'den izole ettikleri alkalen proteazı %5 Tween-20, Tween -80 ve Triton X-100 ile 72 saat inkübasyonu sonucu enzim aktivitesinde %5 ile %8 arasında artış bildirirken %0,5 SDS ve %1 H_2O_2 ile 1 saat inkübasyon sonunda enzimin aktivitesini kaybetmediğini göstermiştir.

Uyar et al. (2011) tarafından *Bacillus* sp. CA15'den izole edilen alkalen proteazın 1 saat Triton X-100, Tween 20 ve SDS gibi surfaktanlar ile inkübasyonu sonucu enzim aktivitelerinin oldukça stabil olduğu gözlenmiştir.

Moradian et al. (2011) tarafından iki *Bacillus* suşu HR-08 ve KR-8102'den izole edilen alkalen proteaz aktivitesi üzerine surfaktan, deterjan ve ağartıcı ajanların etkilerini değerlendirmek için 30 dakika oda ısısında %0,5 SDS, %5 Triton X-100, %5 H_2O_2 ile inkübe etmiştir. SDS varlığında enzimler aktivite kaybına uğradığı ancak enzimin Triton X-100, 5% H_2O_2 ve ticari deterjanlar karşısında stabilitesini koruduğu bulunmuştur. Ayrıca enzim aktivitelerinin 5 mM Fe^{2+} varlığında arttığını

ancak 5 mM Mg^{2+} , Cu^{2+} ve Mn^{2+} gibi metal iyonlarının enzim aktivitesini hemen hemen hiç etkilemediği bildirilmiştir.

2.3. Saponinlerin Antioksidan Özellikleri ve Diğer Biyolojik Etkileri

Yoshiki and Okubo (1995), soya fasulyesinden elde edilen saponinlerinin süperoksitleri giderebildiğini böylece serbest radikallerin neden olduğu biyomoleküler hasarı önlediğini bildirmiştir.

Rodrigues et al. (2005)'ın *in vivo* olarak saponin antioksidan aktivitesini değerlendirdikleri çalışmalarında, saponin uygulanan ratlarda antioksidan enzimlerde değişim gözlenmezken lipid hidroperoksid düzeyinde azalma gözlenmiştir. Saponinin serum lipitleri üzerine olan pozitif etkisinin antioksidan aktivitesi ile ilişkili olduğunu ileri sürmüştür.

Son et al. (2007) tarafından yapılan çalışmada Yam'dan (*Dioscorea spp.*) ekstrakte edilen steroidal bir saponin olan diosgenin, yüksek kolesterol diyeti ile beslenen ratların diyetine eklenmiş ve diosgeninin hipolipidemik ve antioksidatif etkisi incelenmiştir. Çalışmada, diosgeninin total kolesterolde azmaya neden olduğu ve antioksidan enzimlerde artış bulunmuştur.

Xi et al. (2008) çalışmalarında geleneksel Çin tıbbında diyabetin tedavisinde kullanılan saponinden zengin 11 bitkinin antioksidan ve antiglikasyon özellik gösterdiğini bulmuş ve bu ekstraktların antioksidan ve antiglikasyon özelliklerinde içerdikleri saponin bileşiklerinin önemli bir payı olabileceğini ileri sürmüştür.

Chen et al. (2011) tarafından Çin'de diyabette yaygın olarak kullanılan 22 bitkinin antiglikasyon ve antioksidan özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında bitkilerin total saponin, polisakkarid ve polifenol içerikleri belirlenmiştir. Sonuç olarak bitkilerin içerdikleri saponinin antiglikasyon aktiviteden sorumlu olduğu aynı zamanda saponinin antioksidan aktiviteye büyük ölçüde katkı sağlayabileceği bildirilmiştir.

Lee et al. (2011), tarafından mung fasulyesi ve soya fasulyesinden elde edilen ekstraktların fenolik ve saponin içerikleri ve bunların antioksidan aktiviteleri çeşitli metotlarda değerlendirilmiştir. Soya fasulyesinin 1,13 mg/g, mung fasulyesi 2,03

mg/g (GAE) fenolik içerik bulunmuştur. Soya fasulyesi ekstraktının saponin içeriği mung fasulyesinden 4,5 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Ekstraktların antioksidan aktiviteleri belirlemek için DPPH ve ABTS radikal giderme, FRAP ve β -karoten emülsiyon metodu kullanılmıştır ve mung fasulyesi ekstraktı soya fasulyesi ekstraktına göre daha fazla antioksidan aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca çalışmada bitkilerden elde edilen saponinlerin antioksidan aktivitelerinin fenolik bileşik içeren ekstraktlarıyla kıyaslandığında oldukça düşük olduğu gösterilmiştir.

Amoros et al. (1987) tarafından *Angallis arvensis*'den izole edilen triterpen bir saponinin bazı virüslere karşı antiviral aktivitesi araştırılmıştır. İzole edilen saponinin, herpes simpleks virus tip 1 ve poliovirus tip 2'nin replikasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur. Çalışmada saponinin gösterdiği etkinin virüsidal etkiden daha çok virüs-konakçı hücre bağlanmalarının inhibisyonu ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür.

Serteser et al. (2009) tarafından yapılan çalışmada Afyonkarahisar'da yetişen *Gypsophila eriocalyx* Boiss., *Gypsophila parva* Barkoudah, *Gypsophila perfoliata* L., *Gypsophila pilosa* Hudson, *Gypsophila tubulosa* (Jaub. & Spach) Boiss. içeren 38 bitkinin %50 su-metanol ile elde edilen ekstraktlarının antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. DPPH ve H₂O₂ giderme aktivite ve Fe²⁺ şelatlama aktivite tayin metodları kullanılarak bitkilerin antioksidan kapasiteleri değerlendirilmiştir. Çalışmada ekstraktların konsantrasyonlarına bağlı olarak antioksidan aktivite gösterdiği ve *G. eriocalyx*, *G. pilosa* ve *G. parva* türlerinin en düşük DPPH radikali giderme aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca *Gypsophila* türlerinin çalışmadaki bitkilerle kıyaslandığında en düşük demir iyonlarını şelatlama aktivitesine ve H₂O₂ inhibisyon değerlerine sahip olduğu bildirilmiştir.

Simões et al. (1999) tarafından farklı bitkilerden izole edilen triterponoid saponinlerin antiviral aktivite gösterdiği bulunmuştur. Saponinlerin antiviral aktiviteyi ise DNA ve viral kapsid protein sentezini inhibe ederek gerçekleştirdiği bildirilmiştir.

Delmas et al. (2000) tarafından *Hedera helix* L.'den izole edilen saponinlerin antiparazitik etki gösterdiği ve bunun nedeninin membran bütünlüğünde meydana

gelen değişimler olduğu bildirmiştir. Aynı zamanda izole edilen saponinler DNA sentezinin inhibisyonu sonucu insan monositleri üzerinde antiproliferatif etki (hücre çoğalmasını önleyici etki) göstermiştir.

Traore et al. (2000) tarafından *Glinus oppositifolius*'den izole edilen triterponoid saponinlerin, *Plasmodium falciparum*'un (protozoon) çoğalmasını inhibe ettiğini gösterilmiştir.

Avato et al. (2006), *Medicago* sp.'den elde edilen saponinin özellikle gram pozitif bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmiştir.

Soetan et al. (2006) tarafından *Sorghum Bicolor* L. Moench'den ekstrakte edilen saponinlerin gram pozitif bakterilerin büyümesini inhibe ederek antimikrobiyal aktivite gösterdiğini fakat mantar ve gram negatif bakteriler üzerinde aynı etkiye sahip olmadığı bildirilmiştir.

Helal and Melzig (2011) tarafından yapılan çalışmada, incelenen saponinlerin çoğunluğunun monosit ve epitelyum hücrelerinde lizozim aktivitesini stimule ettiği gösterilmiştir. Çalışmada gözlenen lizozim stimülasyonunun, saponinlerin antimikrobiyal, antiviral ve antienflamatuvar etkilerinin mekanizmasını açıklamaya destek olabileceğini ileri sürmüştür.

Öztaşan et al. (2008), hipertansiyon oluşturulmuş sıçanların diyetine saponin içeren *Yucca schidigera* ekstraktının ilavesiyle arteriyel kan basıncını düzenleyebileceği ileri sürmüştür.

Rhiouani et al. (1999), *Herniaria glabra* saponinin hipotansif etki gösterdiğini bildirmiştir.

Sung et al. (1995), kolon epitel karsinoma hücrelerinin morfolojisine soya fasulyesi ve bir *Gypsophila* türünden elde edilen saponinlerin etkilerini değerlendirmiştir. Sonuç olarak her iki saponininde hücre membranı ile etkileştiği ve doza bağlı olarak hücre morfolojisinde değişimlere neden olduğu görölmüştür.

Rao and Sung (1995), insan karsinoma hücrelerinde soya fasulyesi saponinin doza bağlı olarak insan karsinoma hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği ve *Gypsophila*

saponinin ise artan dozla orantılı olarak hücre geçirgenliğini artırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca her iki saponinin de farklı mekanizmalarla hücre membranı ile etkileştiğini ileri sürmüştür.

Jun et al. (2002), soya fasulyesi saponinin antimutajenik aktivite ve kansorejen ile indüklenen DNA hasarına karşı güçlü bir inhibitör etkiye sahip olduğunu bildirirken soya fasulyesi saponinin kanserin oluşumunun başlangıç aşamasında engelleyebileceğini ileri sürmüştür.

Heisler et al., (2005), *Gypsophila paniculata* L.'den izole edilen saponin ve kimerik toksinler (chimeric toxins) ile kombine uygulandığında normal hücreler zarar görmeden tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etkiler gösterdiğini bildirmiştir.

Yan et al. (2009) tarafından yapılan çalışmada, *Rhizoma Paridis*'den izole edilen steroidal saponinlerin akciğer adenokarsinomasında hem *in vitro* hem *in vivo* koşullarda antikanser aktivite göstermiştir.

Man et al. (2010), doğal saponinlerin 150 türünün antikanser özelliğe sahip olduğunu bildirmiştir.

Arslan et al. (2012) tarafından *Gypsophila pilulifera* Boiss.& Heldr. türünün toprak altı kısmından izole edilen triterpenoid saponinin, akciğer karsinoma hücresi için oldukça sitotoksik olduğu gösterilmiş ve antikanser tedavisinde faydalı olabileceği ileri sürülmüştür.

Oakenfull and Sidhu (1990), saponinlerin ince barsaktan kolesterol emilimini inhibe ederek veya safra asitlerinin tekrar emilmesini sağlayarak kolesterol düşürücü etki gösterdikleri ileri sürülmüştür.

Malinow et al. (1981) tarafından *Gypsophila* saponinlerinin barsaktaki demir emilimini bozarak karaciğerdeki demir miktarını azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca *Lecurine* saponinlerinin ratlarda demir ve magnezyum atılımını artırdığı, domuzlarda ise plazma kalsiyum ve çinko düzeyini düşürdüğü bulunmuştur.

Saponinlerin canlı organizmadaki çeşitli enzimlerin aktiviteleri üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Kang and Cho (1985), *Panax ginseng*'den izole edilen

saponinin, bazı restriksiyon endonükleazların enzim aktivitesine etkisini plazmid DNA'da (pBR322) meydana gelen kırılmaları (cleavage) gözlemleyerek değerlendirmiştir. Çalışmada restriksiyon endonükleaz enzimleri ile birlikte uygulanan saponinin daha kısa sürede plazmid DNA kırıklarının oluşmasında önemli rol oynayabileceği ileri sürülmüştür.

Lee et al. (1986), *Gingsen* saponinin Na^+ , K^+ ATPaz enzim aktivitesini inhibe ettiğini bulunmuştur. Ayrıca *Gypsophila* saponini, SDS ve Triton X-100'ün aynı enzimlerin aktivitesinde artışa neden olduğu gösterilmiştir.

Sroka et al. (1997) tarafından *Medicago sativa* L.'den izole edilen saponinin (pankreastan elde edilen enzimlerden) lipolitik aktiviteyi stimüle ettiği fakat amilolitik veya proteolitik aktivite üzerinde etkili olmadığı bulunmuştur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Araç ve Gereçler

Çalışmamızda Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan cihazlar/malzemelerden yararlanılmıştır.

Sokslet düzeneği (İzolab), Geri soğutucu (İzolab), Evaporatör, Isıtıcı, Silika kaplı alüminyum plaklar, pH metre, Buz Dolabı/Derin Dondurucu, Vorteks (Velp Scientifica), Hassas terazi (Precisa. 205 ASC. 0,0001 g'a duyarlı), Yatay elektroforez Tankı (Thermo Labsystem), Dikey Elektroforez Tankı (SCIE-PLAS TV 100Y), Güç kaynağı (Major science, UV Simulatör (Bio-Imaging Systems), Su banyosu (Nüve. BM 402), Shaker (Nüve. SC 350), İnkübatör (Shel Lab), Değişik hacimlerde otomatik pipet (Ependorf, Scorex), Farklı boyutlarda deney tüpü, balon joje ve beher glas (Isolab), Ependorf tüpü (0,5-1,5 ve 2 mL'lik, Roth).

Kimyasallar

Metanol (Merck), Petrol eteri (Merck), Kloroform (Merck), Silica Jel 60 PF (Merck), DPPH (Aldrich DO9-2), Folin&Ciocalteu's Phenol (Sigma-Aldrich), Neocuproin, Troloks, Linoleik asit (Alfa Aesar L07949), Gallic Asit (Sigma), Hisroksianisol (Sigma), FeCl₃6H₂O (Sigma) Tween 40 (Meck p1379), Triklorasetik asit (Merck), APS (Sigma A-7460), SDS (Sigma L-4590), Bromofenol mavisi (Sigma), 2-merkaptotanol (Sigma M7154), G-100 Sefadeks (Sigma), TEMED (Merck), Pepton (Fluka), Yeast (Sigma), Nutrient Broth (Merck).

3.2. Yöntem

3.2.1. Besiyerinin Hazırlanması ve Alkalen Proteaz Üretimi

Çalışmamızda bakterilerin gelişimi sağlayan genel sıvı besi yeri olan nutrient broth (NB, besleyici buyyon) kullanılmıştır (Anonim, 2007).

Tartılan ortam bileşenleri manyetik karıştırıcı üzerinde toplam hacimden biraz az saf su ile çözülerek hazırlanmış ve pH'sı 7,4 ayarlanmıştır. Toplam hacim 1 L'ye saf su ile tamamlanarak balonjojelere paylaştırılmıştır (250 ml'lik besiyeri (NB) 500 ml'lik bolonjojeler içerisine konulmuştur). Balon jojelerin ağzı pamukla sıkıca kapatılıp alüminyum folyo sarılarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır.

NB Bileşimi;

Et ekstraktı	1 g
Maya ekstraktı	2 g
Pepton	5 g
Tuz (NaCl)	5 g
Saf su	1000 ml

Çalışmada alkalen proteaz elde etmek için *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu kullanılmıştır. Enzim üretimi için 250 ml'lik besiyerlerine (NB) *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşunun ekimi yapılmıştır. Daha sonra *Bacillus* suşunun büyütülmesi 37°C'de ve 150 rpm çalkalama hızında 48 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Kültür ortamı ve şartları, *Bacillus* suşlarından enzim üretimde daha önce yapılan çalışmalardan yararlanılarak belirlenmiştir (Balık ve Dönmez, 1992; Varela et al., 1996; Adinarayane et al., 2003; Shafee et al., 2005; Dias et al., 2008; Shaheen et al., 2008; Bhatiya and Jadeja, 2010; Hindhumathi et al., 2011).

3.2.2. Alkalen proteazın saflaştırması

3.2.2.1. Amonyum sülfat çöktürmesi

Kültür üst sıvısında bulunan alkalen proteaz enziminin çöktürülmesi amacı ile kültür üst sıvısına (besiyer süpernatant) %70 amonyum sülfat doygunluğunda çöktürme uygulanmıştır (Singh et al., 2001b).

İşlemin uygulaması: Kültür ortamı öncelikle istenmeyen hücre atıklarının arındırmak için 10 dakika 4000 rpm de santrifüj edilmiş ve 220 ml besiyer üst sıvısı

(süpernatant) alınmıştır. İstenen doygunluğa karşılık gelen (%70) amonyum sülfat miktarının (97,24 gr) 220 ml süpernatantta çözünmesine izin verecek şekilde buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak ve yavaş yavaş ilave edilerek tamamen çözünene kadar işleme devam edilmiştir. Daha sonra süspansiyon çözeltisi içindeki protein agregatları 4000 rpm’de 20 dakika süre ile santrifüjlenerek çöktürülerek üst sıvı ile çökelti ayrılmıştır. Çöken protein (pellet) 50 mM (pH:7,5; 37⁰C) potasyum fosfat tampon çözeltisinin minimum miktarında çözölmüştür. Besiyer süpernatantın ve amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen çökeleğin alkalen proteaz enzim aktivitesi ve protein miktarı verilen yöntemlere göre belirlenmiş ve saflaştırma katsayısı ile saflaştırma verimi hesaplanmıştır.

Kullanılacak amonyum sülfat miktarını hesaplama kullanılan formöl:

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V= Süpernatant hacmi

S₁=1’in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂=1’in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

3.2.2.2. Jel filtrasyon kromatografi

Bu uygulamada kolon dolgu maddesi olarak Sefadeks G-100 (medium) kullanılmıştır. Sefadeks G-100, 4-150 kDa aralığındaki proteinleri ayırmak için kullanılan bir dolgu malzemesidir.

İşlemin yapılışı: Kolon hazırlanmadan önceden jel materyalinin şişirilmesi ve paketlenmesi gerekir. Bu amaçla, 5 g Sefadeks G-100, 150 ml saf su içine alınarak su banyosunda 90°C’de bekletilerek polimer materyal şişirilmiştir. Şişirilmiş materyalin içindeki hava, su trompu kullanılarak vakumla uzaklaştırılmıştır. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış polimer materyali 50 mM’lık ve pH’sı 7,5 olan potasyum fosfat tamponuyla dolu kolona, içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde aktararak aynı tamponla dengeleme işlemi yapılmıştır. Kolonun dengelendiğini tespit için, üstten ilave edilen tamponla alttan alınan tamponun pH ve 280 nm’de

absorbans değerleri aralıklarla ölçölerek bu değerler aynı oluncaya kadar dengeleme işlemeine devam edilmiştir. Kolonun akış hızı 30 ml/saat olarak ayarlanmıştır. Elüsyon işlemi için dengelenen kolonun, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine indirilmiştir. Daha sonra saflaştırılacak enzim çözeltisi (amonyum sülfat ile elde edilen çökelek), tampon çözelti ile çözülmüş ve kolona tatbik edilmiştir. Bu enzim çözeltisinin jel tarafından emdirildikten sonra üzerine birkaç ml elüsyon tamponu ilave edilerek tekrar jele emdirilmiştir. Daha sonra kolonun üst kısmı elüsyon tamponuyla doldurularak, elüatlar 5'er ml olacak şekilde tüplere toplanmıştır.

Tüplerdeki enzim aktivitesi sıfır oluncaya kadar elüatların toplanmasına devam edilmiştir. Kolona tatbik edilen numunenin ve toplanan tüplerin (elüatların) kantitatif protein tayini (Lowry metodu) ve aktivite tayinleri ve spesifik aktiviteleri belirlenmiştir. Böylece saflaştırma katsayıları ve verimleri hesaplanmıştır.

3.2.3. Alkalen proteazın aktivitesinin belirlenmesi

Saflaştırmanın her basamağında yapılan proteaz aktivite ölçümü, kazein varlığında kazeinin sindirimi yoluyla belirlenmiştir.

3.2.3.1. Kullanılan çözeltiler ve çözeltilerin hazırlanması

A. 50 mM Potasyum Fosfat Tamponu (pH:7,5; T:37 °C) = 0,871 g K₂HPO₄ hassas olarak tartıldıktan sonra bir miktar saf suda çözölerek pH değeri 37 °C sıcaklıkta 1M HCl ile 7,5'e ayarlanır. Son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

B. % 0,65 (w/v)'lik Kazein Çözeltisi = 0,65 g kazein hassas olarak tartıldıktan sonra 80-90°C sıcaklıktaki 50 mM potasyum fosfat tamponu içerisinde 10 dakika karıştırılarak çözölmesi sağlanır.

C. 110 mM TCA Çözeltisi = 4,4935 g TCA hassas olarak tartıldıktan sonra bir miktar saf suda çözölür ve hacim yine saf su ile 250 ml'ye tamamlanır.

D. Folin & Ciocalteu's Phenol Reaktif Çözeltisi = 10 ml Folin & Ciocalteu's Phenol reaktifi 40 ml saf su ile karıştırılır. Karanlıkta saklanır.

E. 500 mM Na_2CO_3 Çözeltisi = 13,2486 g Na_2CO_3 hassas olarak tartıldıktan sonra bir miktar saf suda çözülür ve son hacim yine saf su ile 250 ml'ye tamamlanır.

F. 1,1 mM L-Tirozin Çözeltisi = 0,0199 g L-Tirozin hassas olarak tartılır ve bir miktar saf suda çözülür sonra hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

G. Enzim Çözeltisi = Enzim en az miktardaki 50 mM (pH=7,5) potasyum fosfat tamponu içinde çözülerek hazırlanır.

3.2.3.2. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması

1,1 mM L-Tirozin çözeltisinden farklı miktarlarda (50-400 μl) alınarak tüpe toplam hacim 2000 μl olacak şekilde saf su eklenmiştir. Daha sonra 5000 μl (500 mM) Na_2CO_3 çözeltisi ve 1000 μl Folin & Ciocalteu's Phenol reaktif çözeltisinden tüpe konulmuştur. Hazırlanan tüpler 37 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 30 dk inkübasyona bırakılarak 660 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerlerinden standart grafiği çizilmiştir.

3.2.3.3. Enzim çözeltisinin aktivitesinin ölçülmesi

Proteaz aktivitesi Cupp-Enyard (2008) yöntemine göre ölçülmüştür. 1ml enzim çözeltisi ile 5 ml substrat çözeltisi (% 0,65 (w/v)'lik kazein çözeltisi) deney tüpüne konularak 37 $^{\circ}\text{C}$ 'lik su banyosunda 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüplerdeki kanşıma trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi ilave edilmiş ve 37 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta hafif çalkalama ile 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası tüplerdeki çözelti karışımı 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek daha sonra süzöntüden 2ml tüplere alınarak üzerine 500 mM Na_2CO_3 çözeltisinden eklenmiştir. 1-2 dakika beklendikten sonra tüplere 1ml Folin&Ciocalteu fenol reaktif çözeltisi konulmuş ve 37 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta hafif çalkalama ile 30 dakika inkübasyonda bırakılmıştır. Absorbansları 660 nm'de ölçülmüştür. Enzim aktivitesi önceden oluşturulmuş tirozin standart grafiğinin eğimi kullanılarak aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır. *Hesaplamalar:*

$$\text{Aktivite} = \frac{(\mu\text{g Tirozin})}{(\text{ml Çözelti}) \times (\text{inkübasyon süresi})} \times \frac{(\text{Deneyin toplam hacmi})}{(\text{Kolorometrik tayinde kullanılan hacim})} \times \frac{11}{2} = \frac{\text{EU}}{\text{ml}}$$

$$\text{Spesifik Aktivite} = \frac{\text{AKTIVITE} \left[\frac{(\mu\text{g Tirozin})}{(\text{ml Çözelti}) \times (\text{inkübasyon süresi})} \times \frac{\text{Deneyin toplam hacmi}}{\text{Kolorometrik tayinde kullanılan hacim}} \right]}{\frac{(\text{mg Protein})}{(\text{ml Çözelti})}}$$

$$= \frac{\text{EU}}{\text{mg}}$$

Bir ünite Proteaz Aktivitesi; 37°C sıcaklıkta pH 7,5’de gerçekleşen hidroliz reaksiyonunda % 0,65 kazeinden 1 dakikada 1µg veya 1 µmol (1µg/dk veya 1 µmol/dk) tirozin oluşturan enzim miktarıdır (EU/ml: µg tirozin x ml⁻¹ min⁻¹).

3.2.4. Protein miktarının belirlenmesi

Protein miktarının belirlenmesi için de Lowry Metodu kullanılmıştır (Lowry et al., 1951). Bu yöntem, Folin-Ciocalteu reaktifinin (Fosfomolibdotungstik asit çözeltisi) tirozin rezidüleri ile reaksiyona girerek mavi bir renk oluşturması esasına dayanır.

Reaksiyon alkali ortamda bakır iyonunun (Cu²⁺) proteinlerdeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturması ve Cu²⁺’e indirgenmesi ile başlamaktadır. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan Tirozin, Triptofan ve Sistein aminoasitleri Folin reaktifini indirgeyerek renk oluşumuna neden olurlar. Oluşan rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve 660 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Hesaplama: Protein (mg/ml) = (Absorbans (660)/Eğim) x (Seyreltme faktörü)/1000

3.2.4.1. Kullanılan çözeltiler ve çözeltilerin hazırlanması

Bu yöntemde kullanılacak tüm malzemeler temiz olmalı ve çıplak elle tutulmamalıdır.

A: % 2 (w/v) Na₂CO₃ (0,1 N NaOH’ da çözünmüş)

B: % 0,5 (w/v) CuSO₄.5H₂O (% 1 (w/v) K veya Na -tartarat’da çözünmüş

C: 50 ml A belirteci ile 1 ml B belirteci karışımından oluşur (*Taze hazırlanır*).

D: 1 hacim Folin belirteci: 2 hacim sudan oluşan karışımdır (*Taze hazırlanır ve ışıktan korunur*).

3.2.4.2. Protein standart grafiğinin hazırlanması

Protein standart grafiğinin oluşturulması için, 0,1 g BSA 10 mL distile suda çözülmüştür. Konsantrasyonu 0-350 µg/mL olacak şekilde uygun sulandırma yapılarak hazırlanan örneklerin absorbansları 660 nm’de ölçülmüştür.

Elde edilen verilerden BSA miktarına bağlı olarak 660nm’deki absorbans değerinde meydana gelen değişimi gösteren protein standart grafiği çizilmiştir. Çizilen bu grafiğin eğiminden yararlanılarak enzim örneklerinin protein miktarları hesaplanmıştır.

3.2.4.3. Protein miktarının ölçülmesi

Protein miktarı bilinmeyen enzim örneğinden tüpe 500µl konulmuştur (blank (kör) için ise enzim yerine tampon çözeltisi kullanılmıştır). Tüplere 5 mL C reaktifi eklenip oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra tüplere 500 µL Folin reaktifi vortekslenerek eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Absorbanslar 660 nm’de köre karşı okunmuştur.

3.2.5. SDS-PAGE ile moleküler ağırlığının belirlenmesi

SDS-PAGE dikey tipte bir elektroforez şeklidir. SDS-PAGE’de polipeptidlerin ilerleme hızları, sadece iç elektriksel yükleri tarafından değil, aynı zamanda molekül ağırlıkları tarafından da belirlenmektedir.

SDS-PAGE’de örnek proteinler SDS ve merkaptetanol ile birlikte kaynatılarak denatüre edilir. Merkaptetanol proteinin üç boyutlu yapısındaki disülfid bağlarını koparır, (-) yüklü SDS, proteinlerin kuaterner, tersiyer ve sekonder yapılarını bozar, katları açılan peptid zincir, SDS ile sarılarak misel görünümü kazanır. SDS

polipeptidlerin ana iskeletini çevreleyerek proteinleri denatüre eden anyonik bir deterjandır (Temizkan vd., 2008). Tüm proteinler SDS nedeniyle (-) yüklendiği için SDS-PAGE’de ayırma sadece proteinin molekül ağırlığına göre olur. Daha küçük olanlar, daha hızlı yürür.

Çalışmamızda *Bacillus subtilis* ATCC 6633 alkalen proteazının saflığı ve moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile belirlenmiştir (Laemmli, 1970).

3.2.5.1. SDS-PAGE jel yapımında kullanılan çözeltiler ve jelin hazırlanması

Tüm çözeltiler deiyonize su ile hazırlanır.

a) Monomer (akrilamid/bis) çözeltisi (%30 T, %2,7 C_{bis}): 29,2g akrilamid ve 0,8g bis akrilamid tartılıp su ile toplam 100 mL içerisinde çözülür.

b) 4x Ayırma jeli tamponu (1,5 M Tris, pH: 8,8): 18,15g Tris tartılır ve bir miktar suda çözüldükten sonra çözeltinin pH’sı 3N HCl ile 8,8’e ayarlanır. Toplam hacim 100 ml’ye tamamlanır.

c) 4 x Yükleme jeli tamponu (0,5 M Tris, pH: 6,8): 3g Tris bir miktar suda çözüldükten sonra çözeltinin pH’sı 5N HCl ile 6,8’e ayarlanır ve su ile hacim 50 mL’ye tamamlanır.

d) %10 SDS: 10g SDS 100 ml suda çözülür.

e) %10’luk Amonyum Per Sulfat (APS) (polimerizasyon başlatıcı): 0,5 g APS 5 ml suda çözülür (Bu çözelti kullanmadan hemen önce hazırlanır).

f) 2X Örnek uygulama tamponu (denatürasyon çözeltisi) (0,125 M Tris, %4 SDS, %20 gliserol, %10 2-Merkaptoetanol, %0,2 Bromfenol mavisi): Tris 2,5 ml, SDS 4 ml, Gliserol 2 ml, 2-Merkaptoetanol 1 ml, Bromfenol mavisi 0.02 g tartılarak su ile 10ml tamamlanır (pH 6,8).

g) 5x Tank tamponu (0,025 M Tris, 0,192 M glisin, %0,01 SDS, pH 8,3): 15g Tris, 72g glisin, 5g SDS suda çözünerek pH 8,3 ayarlanır ve toplam hacim 1 L’ye tamamlanır.

h) Boyama çözeltisi: 1g Coomassie-brilliant R-250 mavisi 500 mL metanolde çözülür, daha sonra üzerine 100 mL asetik asit (glasiyel) eklenir ve distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

I) Fiksatif çözeltisi: 500 mL Metanol, 100 ml asetik asit (glasiyel) ve 400 ml su ile hazırlanır.

g) Yıkama çözeltisi: 125 mL Metanol, 175 ml asetik asit (glasiyel) ve 2200 ml su ile hazırlanır.

Jelin Hazırlanması: SDS-PAGE için 2 tip jel hazırlanır.

1) %16 T'lik Ayırma Jeli:

- Monomer 15,975 mL
- Tampon (B) 7,5 ml
- %10 SDS 0,3 ml
- Su 5,925 ml
- TEMED (N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin) 15 µl,

miktarlarında hazırlanan ayırma jelinin havası alınmış ve APS eklenerek pipet yardımı ile plakalar arasına dökülmüştür.

2) %5 T'lik Yükleme Jeli

- Monomer 1,6 mL
- Tampon 2,5 ml
- %10 SDS 0,1 ml
- Su 5,63 ml
- TEMED 5 µl,

hazırlanan yükleme jelinin havası alınmış ve APS eklenerek pipet yardımı ile plakalar arasına dökülmüştür.

Jellerin hazırlanmasında dikkat edilmesi gereken en önemli nokta APS'nin eklenmesidir. Polimerleştirici ajan olduğundan, eklendikten sonra karıştırılmalı ve vakit kaybetmeden çözelti cam plakalar arasına dökülmelidir.

3.2.5.2. Örneklerin elektroforez için hazırlanması ve uygulama işlemi

Proteaz enziminin moleküler ağırlığının belirlenmesi amacıyla 6 farklı protein içeren (Sigma-Aldrich No:SDS6H2) çözelti, standard (marker) olarak kullanılmıştır. Enzim örnekleri için jel filtrasyon kromatografisi sonucu en fazla aktivite gösteren tüp kullanılmıştır. Örnekler, farklı miktarlarda alınan enzime 2X örnek tamponu (denatürasyon çözeltisi) eklenerek hacim 50 µl'ye tamamlanarak ependorf tüplerine hazırlanmıştır. Daha sonra tüm tüpler 5 dakika süreyle kaynar suda bekletilmiş ve daha sonra hemen buz dolu kaptaki soğutularak jelle uygulamaya hazır hale getirilmiştir. Standart olarak kullanılacak protein çözeltisi (marker) ise 1:1 oranında örnek tampon ile hazırlanmış olup, aynı işlemler uygulanmıştır.

İşlemin Uygulanması: Bunun için elektroforez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkanmıştır. Plakaları birleştiren mikalara vazelin ince tabaka halinde sürülerek iki cam plaka birbiri üstüne konulmuş ve kıskaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına yerleştirilmiştir. Cam plakaların altı, kaynama sıcaklığına getirilerek çözülüp daha sonra 40-50°C'ye getirilmiş agar dökülerek kapatılmıştır. Hazırlanan ayırma jeli hava olmamasına dikkat edilerek plakalar arasına dökülmüştür. Jel katılaşmaya kadar (yaklaşık 1 saat) beklenmiştir. Daha sonra yürütme jeli üst yüzeye kadar ilave edilerek üzerine tarak dikkatlice yerleştirilmiştir. Jel katılaşınca taraklar dikkatlice çıkarılarak jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkanmış ve oluşan boşluklar işaretlenmiştir. Plakalar elektroforez tankına yerleştirilmiştir ve elektroforez tankına yürütme tamponu konulmuştur (5X tank tamponu 5 kez sulandırılarak kullanılır). Hazırlanan enzim örnekleri ve standart protein elektroforeze çok ince bir enjektör yardımıyla uygulanmıştır. Tank kapağı kapatılarak alt tarafından (+) kablo (anot), üstten (-) kablo (katod) yerleştirilerek sistem güç kaynağı önce yürütme jelinde 100 voltta ayarlanmıştır. Proteinlerin jeldeki hareketini izlemeyi sağlayan boyaya ait bant, yükleme jelinden çıkıp ayırma jeline girdiğinde güç 150 volta arttırılmıştır. Mavi bant jelin altında 0,5 cm kalıncaya

kadar yürütüldükten sonra işlem durdurulmuştur. Daha sonra cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarılarak fiksasyon çözeltisinde 30-40 dakika bekletilmiştir. Fiksasyon çözeltisinden çıkarılan jele boya çözeltisi üstünü örtünceye kadar eklenerek bir gece çalkalayıcı (shaker) üzerinde bırakılmıştır. Daha sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılarak, yıkama çözeltisine alınmıştır. Belirli aralıklarla değiştirilmek sureti ile jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözeltide bekletilmiştir. Jel yıkama çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekilmiştir.

Elektroforez işlemi sonucunda oluşan bantların R_f değerlerinden yararlanılarak enzim ve standart protein çözeltisinin göreceli hareketlilik değerleri hesaplanmıştır. R_f değerlerinden yararlanarak molekül ağırlıkları belirlenmiştir.

$$R_f = \text{Proteinin aldığı yol (cm)} / \text{izleme boyasının aldığı yol (cm)}$$

3.2.6. *Bacillus subtilis* ATCC 6633'den izole edilen alkalin proteaz aktivitesi üzerine ham saponin ekstresinin etkilerinin belirlenmesi

Daha önce 3.3.4'de bahsedilen proteaz aktivite ölçüm metodu kullanılmıştır. Sadece enzimle aynı miktarlarda (μ l) ham saponinin ekstresi (%1 ve %5) ilave edilerek enzim aktivitesi ölçülmüştür.

İşlemin Uygulanması: İzole edilen enzimin aktivitesi üzerine ham saponin ekstresinin etkisini incelemek için 200 μ l enzim çözeltisi, 200 μ l suda çözünmüş farklı konsantrasyonlarda ham saponin ekstresi ile 500 μ l substrat çözeltisi (% 0,65 (w/v)'lik kazein çözeltisi) deney tüpüne konulmuş ve 37°C'lik su banyosunda 10 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüplerdeki karışıma 500 μ l trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi ilave edilmiştir ve 37°C sıcaklıkta hafif çalkalama ile 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası tüplerdeki çözelti karışımı 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süzüntüden 1ml alınmış ve 350 μ l Folin reaktif çözeltisi ilave edilerek 37°C sıcaklıkta hafif çalkalama ile 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Absorbansları 660nm'de ölçülmüş ve aktiviteleri hesaplanmıştır. Kontrol olarak, ham saponin ekstresi bulundurmayan enzim çözeltisinin aktivitesi ölçülmüş ve % 100 kabul edilmiştir.

3.3. Bitkisel Materyalin Eldesi ve Çözücü İle Ekstraksiyon

Çalışmada kullanılan *Gypsophila pilulifera* Boiss.&Heldr. bitkisi C3-Antalya eski Lara yolu, N 409921, E 3625736 (Rakım 917 m)'dan 02.06. 2009 tarihinde toplanmıştır. Teşhisi Süleyman Demirel Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Hasan ÖZÇELİK tarafından yapılmıştır.

Triterponoid saponini içerdiği bilinen bitkinin toprak altı kısmı açık havada kurutulduktan sonra öğütülüp toz haline getirilmiştir. 64g bitki kartuşlar içinde hazırlanarak sokslet cihazında ilk olarak 8 saat süreyle petrol eteri ile ekstrakte edilmiştir. Bu sayede büyük çoğunluğu yağlar olan, reçinemi apolar maddeler ve petrol eteri de çözünen diğer maddeler uzaklaştırılmıştır. Apolar çözücü ekstraksiyonundan sonra kartuş açık havada kurutulmuş ve tekrar materyalin bulunduğu kartuş sokslet cihazına konarak 8'er saat boyunca 3 kez metanol ile ekstrakte edilmiştir. Elde edilen çözeltinin çözücüsü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldıktan sonra -20 °C'deki aseton üzerine damla damla ilave edilerek ham saponin içeren ekstre elde edilmiştir.

Ekstraksiyonlar sonucunda elde edilen ekstre verimi, kuru madde üzerinden hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Verim} = [\text{g ekstre/g numune}] \times 100$$

3.4. Saponin İzolasyonu

3.4.1. İnce tabaka kromatografisi (İTK)

İTK, ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstrelerin ve kolon kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonların değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. İTK bir fizikokimyasal ayırma yöntemidir. Hızlı sonuç vermesi ve ekonomik uygulama avantajları nedeni ile önemli bir yere sahiptir.

İşlemin Uygulanması: Çalışmada İTK'da kullanılan mobil faz için farklı çözücü karışımları denenmiştir (Çizelge 3.1). Ekstrenin metanol çözeltisi adsorbanla kaplı plağın yan kenarından 1 cm ve alt kenarından 1,5 cm uzakta olacak şekilde plak üzerine uygulanmıştır. Daha sonra plak, çözücülerin bulunduğu şale içine

yerleştirilmiş ve tabaka üzerinde mobil fazın yükselmesi (maddeler karışımının birbirinden ayrılması işlemi yani developman) sona erdikten sonra plak tanktan çıkarılmıştır. Ayırımı sağlanan madde veya maddelerin tanınması bir başka deyişle lekelerin (spotların) ortaya çıkarılması için plaklar kuruduktan sonra renklendirme reaktifi püskürtülerek 110°C’de etüvde 5 dakika bekletilmiştir. Çalışmamızda kullanılan renklendirme reaktifi Komarowsky reaktifidir.

Komarowsky reaktifi: %50 etanolik sülfirik asitin 1ml’si ile %2 metanolik p-hidroksibenzaldehid karıştırılarak hazırlanır (Stochmal et al., 2008).

Maddenin tanınması için elde edilen spotların R_f değerleri hesaplanmıştır. Bunun için spotlarının orta noktası ile başlangıç noktası arasındaki uzaklık hassas olarak bir milimetrik cetvel ile ölçülür. Bu uzaklık başlangıç noktası ile yürütüldüğü mesafe arasındaki uzaklık olan developman mesafesine oranlanır.

R_f değeri, aynı madde ve aynı hareketli faz sistemi için sabittir. R_f değerleri karşılaştırılarak, karışım içinde kaç tür madde olduğu ve hangi maddelerin olduğu hakkında bilgi edinilebilir.

Çizelge 3. 1. İnce tabaka kromatografisinde denenen hareketli faz çözücü karışımları

Çözücü karışımları	Ml
Metanol-Kloroform- Su	65:35:10
Metanol-Kloroform-Su	7:5:2
Metanol/Kloroform/Su	6:5:1
Metanol-Kloroform-Asetik asit-Su	8:16:3:2
Hekzan-Etanol	2:1
Metanol/Butanol/Su	10:4:4
Butanol-1-propanol-Asetik asit-Su	40:20:7,5:30

3.4.2. Kolon kromatografisi

Kromatografi metotları cam boru içine gözenekli bir katının doldurulması (kolon dolgu maddesi) ile gerçekleştirilir. Böyle bir dolguya kolon denir. Daha sonra dolgu maddesine bir sıvı emdirilir ve bu sıvı faz gibi kullanılır.

Çalışmamızda bitki ekstresinde bulunan saponinin saflaştırılması amacı ile kolon kromatografisi uygulanmıştır. Çalışmamızda 150 cm uzunluğunda 3 cm çapında cam boru ve adsorban olarak 250 g normal faz silikajel (Silikajel 60 PF, Merck) kullanılmıştır. Bu işlem için değişik hareketli faz sistemleri literatürden faydalanarak ince tabaka kromatografisi ile denenmiştir (Stochmal et al., 2008; Poslu, 2006; Hostettman and Marston, 2005). İTK’de en iyi ayrımın yapıldığı çözücü karışımı olan metanol-kloroform-su (6:5:1) ile süspansiyon haline getirilen silika jel kolona homojen bir şekilde yerleştirilmiştir. Elde edilen ham saponin kolonun üst kısmında yüklenerek yıkama işlemi yine aynı çözücü karışımı ile devam edilmiştir. Her bir eluat için ince tabaka kromatografisi uygulanmış ve R_f değerleri hesaplanmıştır. R_f değerleri yakın olan eluatlar birleştirilmiştir.

3.5. Antioksidan Aktivite Belirleme Metodları

3.5.1. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Bir maddenin antioksidan etkisi içerdiği fenolik madde miktarı ile ilişkilidir. Bitki içerisinde birden fazla fenolik madde vardır ve her birinin konsantrasyon değerlerini hesaplamak mümkün olmadığı için yapılan analizler fenolik madde olduğu bilinen bir standart maddeye göre hesaplanır.

G. pilulifera bitkisinin metanol ekstresinin toplam fenolik madde miktarı Singleton et al., (1999) tarafından önerilen Folin-Ciocalteu metoduna göre yapılmıştır. Bu yöntemin ilkesi, fenolik bileşiklerin alkali ortamda Folin-Ciocalteu ayıracını indirgeyip, kendilerinin oksitlenmiş forma dönüştüğü bir redoks reaksiyonuna dayanmaktadır.

Ekstrenin toplam fenolik bileşik miktarının ölçülmesi için önce stok çözelti hazırlanmıştır. Bu amaçla 1 mg bitki ekstresi 1 ml saf metanolde çözülmüştür. Stok çözeltiden 100 µl alınarak cam deney tüpüne konulmuştur ve hacim 2300 µl’ye saf metanol ile tamamlanmıştır. Karışıma 50µl Folin-Ciocalteu reaktifi ve 3 dakika sonra

da 150 µl %2'lik Na₂CO₃ ilave edilerek 2 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Bu süre sonunda numunelerin 760 nm'deki absorbansı, saf metanolden oluşan köre (blank) karşı okunmuş ve işlemler üç tekerrürlü olarak çalışılmıştır.

Aynı işlemler kalibrasyon eğrisi için hazırlanmış farklı konsantrasyonlarda hazırlanan gallik asit çözeltilerine de uygulanmıştır. Ekstre çözeltilinin absorbansı, çizilen gallik asit kalibrasyon eğrisinden okunarak toplam fenolik madde miktarı gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak hesaplanmıştır.

3.5.2. DPPH radikal giderme aktivitesinin belirlenmesi

Ham saponin ekstresinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesinin belirlenmesi Sanchez-Moreno et al. (1998) metoduna göre yapılmıştır. Bu metodun prensibi fenolik maddelerin DPPH'ı bağlayarak DPPH renginin açılması esasına dayanır.

Ekstrenin değişik konsantrasyonlarda (50-400 µg/ml) hazırlanan çözeltilerinden 500 µl deney tüpüne konulmuştur. 3000 µl DPPH çözeltisi ilave edililerek (6.10⁻⁵M DPPH çözeltisi) kuvvetlice karıştırılıp 30 dakika süresince karanlıkta bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda her bir karışımın absorbansları spektrofotometrede 517 nm'de saf metanolden oluşan köre (blank) karşı okunmuş ve işlemler üç tekerrürlü olarak çalışılmıştır. Bitkinin ve standart antioksidanın % inhibisyon değerleri aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır;

$$I (\%) = (1 - A_{\text{numune}}/A_o) \times 100$$

Daha sonra %inhibisyon-konsantrasyon grafiği çizilmiştir. Grafikten yararlanılarak ekstre ve BHA'nın DPPH serbest radikalının yarısının süpürüldüğü andaki konsantrasyonu olan IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Sentetik antioksidan olan BHA ile kıyaslanmıştır.

3.5.3. CUPRAC metodu ile indirgeme kapasitesinin belirlenmesi

Apak et al. (2004) tarafından geliştirilen antioksidan kapasitesinin değerlendirildiği yönteme 'bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi' denilmektedir ve kısaca CUPRAC metodu olarak adlandırılmaktadır. Yöntem hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlara uygulanabilir. Yönteminin kolay, hızlı, etkili ve maliyetinin

düşük olmasının yanında kullanılan reaktifin kararlı olması ve fizyolojik pH'a yakın ortamlarda çalışılabilmesi bu yöntemin avantajlarından biridir.

Çalışmada CUPRAC metoduna göre tüplere sırasıyla 1mL (10^{-2} M) CuCl_2 , 1 mL ($7,5 \times 10^{-3}$ M) Neocuprin ve 1 mL (1M, pH:7) NH_4Ac konulup çalkalanan tüplere, 10000 $\mu\text{g/ml}$ 'lık ekstrenin metanol çözeltisinden farklı miktarlarda (10-1100 μl) eklenmiştir. Son olarak tüpe toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde H_2O ilave edilmiştir. Tüpler ağzı kapalı bir biçimde 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 450 nm'de absorpsiyon değerleri ölçülmüştür.

Standart grafiğinin hazırlanması için metanolde (10^{-3} M, 250 $\mu\text{g/ml}$) troloks stok çözeltisinden farklı miktarlarda (10-110 μl) eklenerek aynı işlemler yapılmıştır. Elde edilen absorpsiyon değerlerinden troloks standart grafiği çizilmiştir.

Daha sonra ekstrenin ve troloksun lineer olduğu aralık tespit edilerek molar absorpsiyon katsayısı (ϵ) hesaplanmıştır. Sonuçlar troloks eş değeri antioksidan kapasite değeri (TEAC) şeklinde ifade edilmiştir. $\text{TEAC} = \epsilon (\text{Troloks}) / \epsilon (\text{Ekstre})$

Çözeltilerin hazırlanma miktarları:

1000 μl Cu(II) + 1000 μl Nc + 1 μl NH_4Ac + x μl örnek + (1100 μl -x) H_2O

V_{toplam} : 4100 μl

3.5.4. Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesinin belirlenmesi (FRAP)

Bu yöntemde demir (III)'ün indirgenme kapasitesi yoluyla antioksidanların toplam miktar tayini yapılmaktadır. Ekstraktların demir (III)'ü demir (II)'ye indirgeme kapasiteleri ile antioksidan aktiviteleri arasında da yüksek korelasyon bulunmasına rağmen, bunun her zaman doğru olmadığı da bildirilmiştir (Yıldırım et al., 2000).

Çalışmamızda ekstrenin indirgeme gücü Oyaizu (1986) metodu ile belirlenmiştir. İlk olarak ekstrenin 8 farklı konsantrasyon da (0,08-2,4 mg/mL) metanol çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir çözeltiden deney tüplerine 2,5 mL numune alınarak üzerine 200 mM 2,5 ml fosfat tamponu ve %1'lik potasyum ferrosiyonad çözeltisinden ilave edilmiştir. Tüpler 45 °C'de 20 dakika boyunca su banyosunda

inkübe edilmiştir. Daha sonra 2,5 ml %10'luk trikloroasetik asit (TCA) ilave edilerek 10 dakika boyunca 4000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Tüplerdeki karışımların üst kısmından 5'er ml alınarak başka tüplere aktarılmıştır. Yeni tüplere aktarılan numunelerin her birinin üzerine 5 ml deiyonize su eklenerek %0,1'lik FeCl₃ ilave edildikten sonra oluşan yeşil renkli çözeltilerin absorbanları 700 nm'de ölçülmüştür. Blank (Kör) hazırlanırken ekstre dışında kalan tüm işlemler aynen uygulanmıştır (Ekstre yerine 2,5 ml tampon ile başlanır).

Troloks standart grafiği, farklı konsantrasyonlarında (8-2400 mmol/ml) troloks çözeltileri kullanılarak hazırlanmıştır. Aynı işlemler yapılmıştır.

Elde edilen veriler ile konsantrasyona karşı absorban grafikleri çizilmiştir. Daha sonra ekstrenin ve tolaksun lineer olduğu aralık tespit edilerek molar absorplama katsayısı (ϵ) bulunarak sonuçlar troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi (TEAC) $\text{mg}_{\text{troloks}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$ olarak ifade edilmiştir.

3.5.5. β -Karoten-Lineolik Asit Metodu

Bu yöntem, emülsiyondaki lineolik asit oksidasyonu sonucu oluşan radikallerin β -karoten ile reaksiyonundan oluşan sarı rengin zaman içerisinde kaybolması esasına dayanmaktadır. Antioksidan varlığı rengin açılmasını önlemektedir.

β - karoten- lineolik asit emülsiyon karışımının hazırlanması; İşlemler Tepe et al., (2007) göre yapılmıştır. 0,2 mg β -karoten, 1 ml kloroformda çözülmüştür. Üzerine 25 μ l lineolik asit çözeltisi ve 200 mg Tween 40 ilave edilmiştir. Kloroform vakum altında 40°C'de evaporatörde tamamen uzaklaştırılmıştır. 100 ml oksijenle doyurulmuş ve deiyonize suda çözülmüş ve şiddetli şekilde karıştırılmıştır.

Numunelerin ve karşılaştırılmak üzere hazırlanan standart antioksidanların derişimi 2 mg/ml olacak şekilde saf metanolde hazırlanmıştır. Deney tüplerine hazırlanan ekstre, BHA çözeltilerinden 0,2'şer ml alınarak üzerlerine 5 ml hazırlanan emülsiyon çözeltisi ilave edilmiştir. 40°C'de su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondaki çözeltilerin absorbanı 490 nm'de her 20 dakikada bir olmak üzere toplam 120 dakika boyunca 490 nm'de okunmuştur.

3.6. Ham Saponin Ekstresinin Plazmid DNA'ya Etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi

Elektroforez, yüklü moleküllerin bir elektriksel alandaki hareketlerinin izlendiği bir tekniktir. Çözünmüş durumdaki moleküllerin elektrik yüklerinin kitlelerine oranıyla belirlenen hızlarda elektriksel alanda hareket (göç) etmeleri prensibine dayanır.

Elektroforezde destek ortamı selüloz ya da ince (poliakrilamid veya agaroz) jellerden hazırlanabilir. Agaroz, bir kırmızı alg türü olan *Agar agar*'dan elde edilen bir polisakkarittir. Elektroforezde hazırlanacak jelin gözenek büyüklüğü agaroz konsantrasyonuna ayarlanabilir. Agaroz jelin basit ve hızlı olmasının yanında diğer yöntemlerle yeterli düzeyde ayrılamayan DNA parçacıklarının ayrılmasını sağlaması en önemli avantajlarından biridir.

Agaroz jelde örnekler yatay pozisyonda, sabit güç ve yöndeki elektriksel alanda yürütülmektedir. DNA, şeker fosfat omurgasından dolayı negatif yüklüdür ve bir elektriksel alana konulduğu zaman bu negatif yükünden dolayı katottan anoda doğru hareket eder. Bu hareketin hızı, ayrımı yapılacak molekülün büyüklüğüne, yapısına, jelde kullanılan maddenin konsantrasyonuna, iyonik kuvvete ve uygulanan akıma bağlı olarak değişmektedir.

Jelde hareketi sağlanan DNA'nın jelde görünür hale gelebilmesi etidyum bromürün DNA bağları arasına bağlanarak 300 veya 360 nm'de ışığı absorblaması sonucu fluoresan etki göstermesi ile olur. Bu madde jelin içerisine agaroz eritilirken ya da elektroforez sonrası jel etidyum bromür içeren bir solüsyonda bekletilebilir (Westermeyer, 2001).

Çalışmamızda agaroz jel elektroforezi kullanılarak ham saponin ekstresinin plazmid DNA (pBR322) üzerine etkileri araştırılmıştır.

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve hazırlanması: Çalışmaya başlamadan kullanılacak tüm malzemeler sterilitiyi sağlamak amacıyla otoklavlanmıştır.

Tris-borat (TBE) tamponu; pH 8,0 2x litre; 21,6g Trizma-base, 1,86g Na₂EDTA, 11g borik asit eklenerek hazırlanır.

Yükleme Tamponu (Bromophenol blue, BB); 4M üre, 0,025 M EDTA, % 60 Sukroz, % 0,025 bromphenol blue, % 0,025 ksilen eklenerek hazırlanır.

Etidyum Bromur: 0,04 ml/L olarak hazırlanır.

Numunelerin hazırlanması: Kontrol numunesinin hazırlanışı; 0,5 µl DNA, 2 µl Bromphenol blue, 10 µl destile su ependorf tüplere konuldu ve sıcak su banyosunda 2 saat süre ile 37°C’de inkübe edilmiştir.

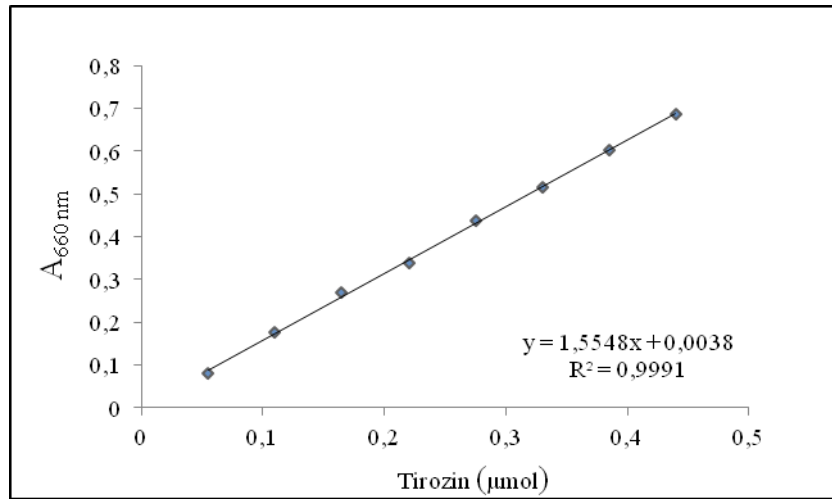
Ekstre içeren numunelerin hazırlanması: 0,5µl DNA, 2µl Bromphenol blue, 8,5µl destile farklı konsantrasyonlardaki ekstrelerden 1,5µl ependorf tüplerine konulmuştur ve 2 saat süre ile 37°C inkübe edildi (2, 10, 20, 30, 40, 50 µg ekstrelerin suda çözünmüş çözeltileri kullanılmıştır).

Agaroz jelin hazırlanması ve agaroz jel elektroforez uygulaması:1g agaroz, 100 ml TBE tamponunda mikrodalgada çözülmüştür. Sıcaklığa 60-50°C düştüğünde kenarları kapatılmış yüzey üzerine, sızıntı ve baloncuk olmamasına dikkat edilerek dökülmüştür. Kuyuları oluşturacak tarak yerleştirilerek donması için bekletilmiştir. Tarak kuyuların yırtılmamasına dikkat edilerek çıkartılarak jel elektroforez tankına konulmuş ve tanka TBE tamponundan ilave edilmiştir. Kuyulara, mikropipet yardımıyla hazırlanan numunelerden 0,6 µl yüklenmiştir. 100 V/cm’de 80 dakika yürütme işlemine devam edilmiştir. Elektroforez işleminden sonra tanktan alınan jelin agaroz jel içindeki DNA’nın boyanarak görünür hale gelmesi için bir kap içinde 20 µL/L etidyum bromür saf suya eklenmiştir. Jel kabın içine dikkatlice yerleştirilerek (kırılmadan) boyanın homojen dağılımı sağlanarak 8-10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra jelin üzerindeki fazla boyanın uzaklaştırılması için (fotoğraf filmi çekilirken parlama yapmaması için) saf suda bir süre bekletilmiştir. Son olarak jel, UV ultraviolet transilluminatörde gözlenerek fotoğrafları çekilmiştir.

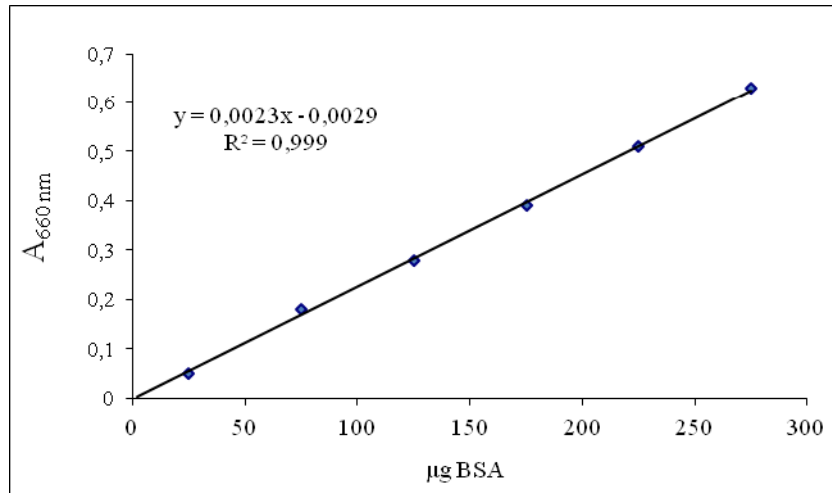
4. BULGULAR

4.1. *Bacillus subtilis* ATCC 6633'den Alkalen Proteaz Üretim Bulguları

B. subtilis ATCC 6633'den alkalen proteaz üretimi, nutrient broth (NB) besiyerinde 37°C'de, 150 rpm çalkalama hızında 48 saat bakterinin inkübasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Üretilen enzimin aktivitesi ve protein miktarı belirlenmiştir. Enzimin aktivitesi kültür üst sıvısında (besiyer süpernatant) ölçülmüş ve toplam aktivitesi 2213,2 EU/ml, spesifik aktivite ise 11,5 EU/mg olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 1. Tirozin standart grafiği



Şekil 4. 2. BSA standart grafiği

Çalışmada her saflaştırma basamağında enzim aktivitesini ve protein miktarlarını hesaplamak için trozin ve BSA standart grafiğinden yararlanılmıştır.

4.2. *Bacillus subtilis* ATCC 6633'den İzole Edilen Alkalen Proteazın Saflaştırılması

Besiyer süpernatantından alkalen proteazın laboratuvar koşullarında saflaştırılması için sıra ile 2 farklı teknik kullanılmıştır (%70 amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon kromatografisi). Saflaştırma sürecinde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

4.2.1. Alkalen proteazın amonyum sülfat ile çöktürme bulguları

B. subtilis ATCC 6633'den elde edilen alkalen proteazın yer aldığı besiyer süpernatant %70 amonyum sülfat doygunluğunda çöktürülmüştür. Bunun sonucunda elde edilen çökeleğin saflaştırma katsayısı 6,56 ve saflaştırma verimi % 67,73 olarak bulunmuştur (Çizelge 4. 1).

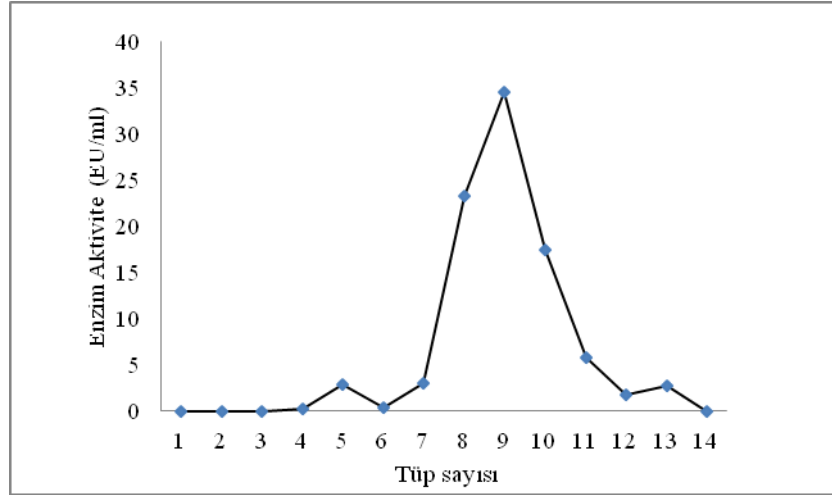
Çizelge 4.1. *B. subtilis* ATCC 6633'den izole edilen alkalen proteazın saflaştırma tablosu

Enzim Fraksiyonu	Hacim	Aktivite (EU/ml)	Toplam Aktivite (EU/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Toplam Protein Miktarı (mg/ml)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Saflaştırma Katsayısı	% Verim
Besiyeri Süpernatant	220	0,87	2213,2	10,06	191,4	11,50	1	100
Amonyum Sülfat Çöktürmesi (%0-70)	15	1,41	1499,1	99,94	21,15	70,87	6,56	67,73
Jel filtrasyon kromatografisi (Sefadeks G-100)	5	0,11	172,5	34,50	0,55	313,63	27,20	7,79

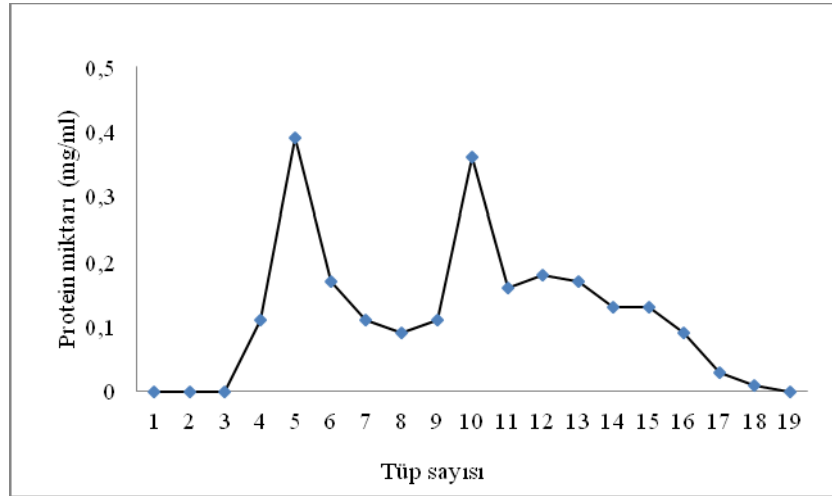
4.2.2. Alkalen proteazın jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırma bulguları

Amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen çökelek tamponda çözüldükten sonra jel filtrasyon kromatografi kolonundan elüsyonu sağlanmıştır. Toplanan tüm elüatlarda (tüp) aktivite ve protein miktar tayini yapılmıştır. Tampon çözeltisi ile yapılan elüsyon sonucu elde edilen elüatların aktivite grafiği Şekil 4.3'de ve protein

miktarlarına ait grafik Şekil 4.4’de verilmiştir. Elüsyon işlemi sonucu saflaştırma katsayısı ve verimi hesaplanmıştır.

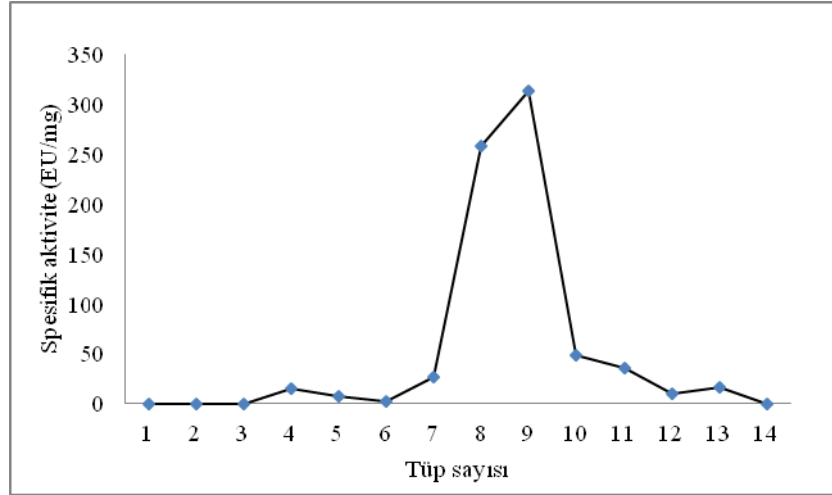


Şekil 4.3. *Bacillus subtilis* ATCC 6633’den izole edilen alkalen proteazın, jel filtrasyon kromatografi kolonundan elde edilen elüatların enzim aktivite sonuçları



Şekil 4.4. *Bacillus subtilis* ATCC 6633’den izole edilen alkalen proteazın, jel filtrasyon kromatografi kolonundan elde edilen elüatların protein miktar sonuçları

Jel filtrasyon kromatografisinde toplanan tüm elüatların spesifik aktivite grafiği Şekil 4.5’de verilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi en fazla aktivite pikinin elde edildiği 8 ve 9. tüp yine en fazla spesifik aktivite göstermektedir.

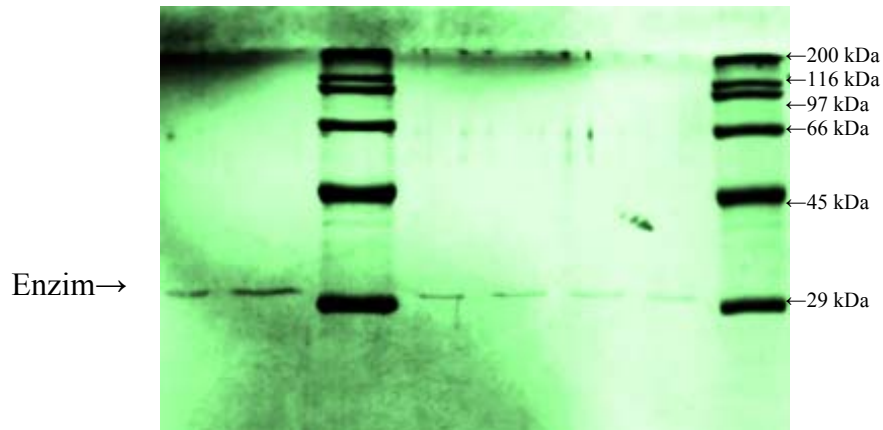


Şekil 4. 5. *Bacillus subtilis* ATCC 6633'den izole edilen alkalen proteazın, jel filtrasyon kromatografi kolonundan elde edilen elüatların spesifik aktivite sonuçları

B. subtilis ATCC 6633'den izole edilen alkalen proteazın jel filtrasyon kromatografisine uygulanması sonucu 27,2 saflaştırma katsayısı ve % 7,79 saflaştırma verimi elde edilmiştir.

4.2.3. SDS-PAGE çalışma bulguları

Jel filtrasyondan elde edilen en fazla aktivite ve spesifik aktivitenin gözlemlendiği tüplerde enzimin moleküler ağırlığının saptanması için SDS-PAGE yapılmıştır. SDS-PAGE ile enzim çözeltisi tek band olarak gözlenmiştir. Enzim uygulaması ile elde edilen bandın ve standartların R_f değerleri hesaplanmıştır. Standart proteinlerin R_f değerlerinden yararlanılarak grafik elde edilmiştir. Grafiğin denkleminde yararlanılarak enzimin moleküler ağırlığı 30,1 kDa olarak bulunmuştur (Şekil 4.6).



Şekil 4.1. Standart protein ve enzimin SDS-PAGE görüntüsü

4.3. Saflaştırılan Alkalen Proteazın Aktivitesi Üzerine Ham Saponin Ekstresinin Etkisinin Belirlenmesi İle İlgili Çalışma Bulguları

Alkalen proteaz aktivitesi üzerine reaksiyon ortamındaki ham saponin ekstresinin etkisi; kazein substratı varlığında enzimin 10 dakika 37°C’de farklı konsantrasyonlarda saponin ile inkübasyon sonunda enzim aktiviteleri ölçülerek değerlendirilmiştir. Kontrol ve ekstreler ile elde edilen enzim aktiviteleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Alkalen proteaz aktivitesi üzerine ham saponin ekstresinin etkisi

Saponin	Aktivite (EU/ml)	% Aktivite
Kontrol (E)*	25,6	100
E+ %1 (w/v) saponin	34,9	136
E+ %5 (w/v) saponin	46,1	180

*Aktivite ölçümünde sadece enzim kullanılmıştır.

Çalışmada saponin miktarı artıkça aktivitede artış gözlenmiştir. %5 (w/v) saponin ekstresi, aktivitede 2 kata yakın artışına neden olmuştur.

4.4. Ekstraksiyon Verimi Bulguları

Gypsophila pilulifera bitkisinin ekstraksiyonu metanol ile gerçekleştirildi. Ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstre verimi, kuru madde üzerinden hesaplanmıştır.

Ekstraksiyon işlemi 64 gr kuru madde ve 8’er saat 3 kez yapılmıştır. İlk 8 saat sonunda %7,8 oranında verim elde edilirken daha sonraki ekstraksiyon sürelerinde verim azalmış olup toplam 24 saatin sonunda toplam %12,7 verim elde edilmiştir.

4.5. Saponin İzolasyon Bulguları

4.5.1. İnce tabaka kromatografisi (İTK) bulguları

Çalışmamızda ekstredeki maddeler polariteleri bakımından karşılaştırmalı olarak farklı çözücü sistemlerinde incelenmiştir. Bu bitki türüne ait yapılmış herhangi bir

İTK çalışması yoktur. Bu nedenle mobil faz belirlenirken diğer bitki türlerinden saponin izolasyonunda kullanılan çözücü karışımları denenmiştir. Ekstre, silikajel kaplı hazır alüminyum plaklara uygulandıktan sonra çözücünün plakalarda da yeteri kadar ilerlemesi sağlanmıştır. Renklendirme reaktifi püskürtülerek meydana gelen spotların R_f değerleri hesaplanmıştır.

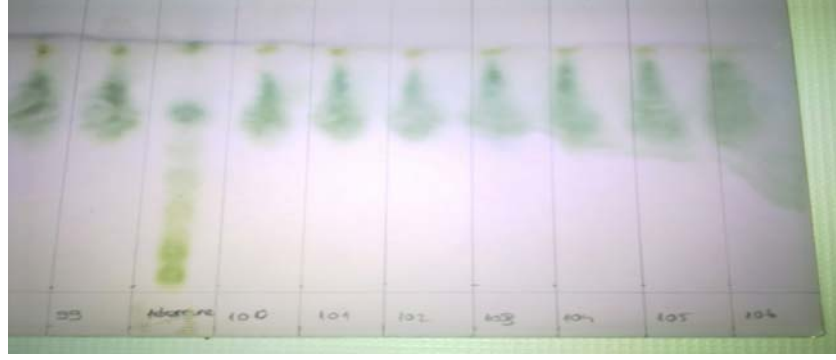
Denenen çözücü karışımlarından en iyi ayırma metanol-kloroform-su (6:5:1) karışımı ile elde edilmiştir. İTK plakalar da renklendirme reaktifi ile görünür hale getirilen 6 farklı spot elde edilmiştir (Şekil 4.7). Renklendirme reaktifi ile mavi renkte görülen spotun saponin olduğu düşünülmüştür (Poslu, 2006; Stochmal et al., 2008) ve saponin izolasyonu için kolon kromatografisi basamağına geçilmiştir.



Şekil 4. 2. İTK sonucu elde edilen ayırım görüntüsü

4.5.2. Kolon kromatografisi bulguları

Ham saponin ekstresinden safsızlıkları ayırmak için ince tabaka yöntemiyle belirlenen çözücü karışımı uygulanarak kolon kromatografisi uygulanmıştır. Her bir elüat 6 ml olacak şekilde ve toplam 180 elüat toplanmıştır. Her bir elüat tekrar İTK plakalarında aynı çözücü ile yürütülerek renklendirme reaktifi ile görünür hale getirilen spotlar elde edilmiştir.



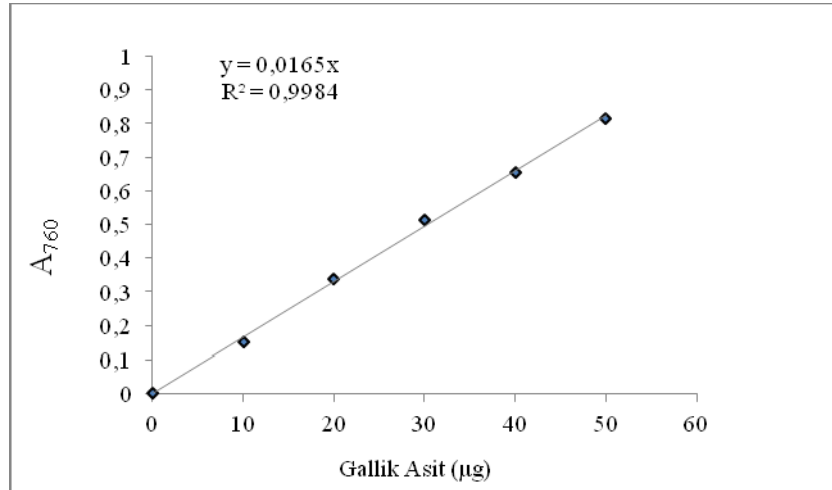
Şekil 4. 3. Kolon kromatografisinden elde edilen eluatların İTK görüntüleri

4.6. *G. pilulifera* Türünün Metanol Ekstresinin Antioksidan Aktivite Bulguları

4.6.1. Toplam fenolik madde miktarı bulguları

G. pilulifera bitkisinin metanol ekstresinde bulunan fenolik bileşik miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi ile total olarak belirlenmiştir. Standart olarak kullanılan gallik asit kalibrasyon eğrisi için 5 farklı konsantrasyon da (10-50 µg) metanol çözeltileri hazırlanmış ve gallik asit standart grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.9).

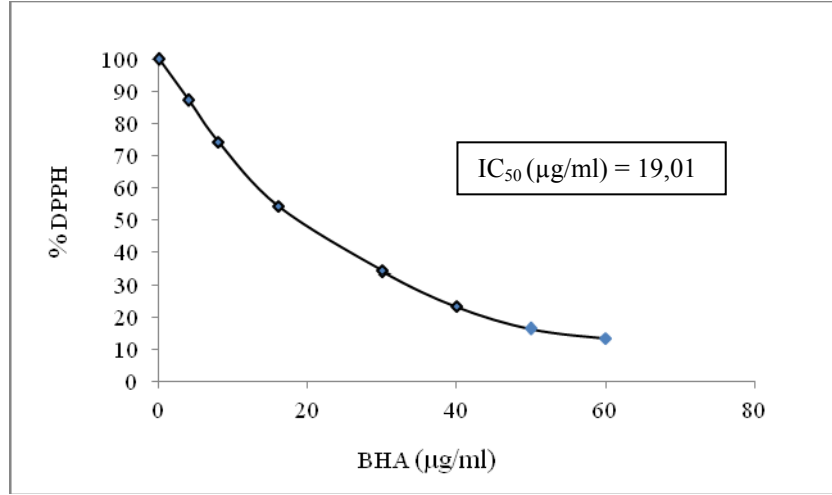
Gallik asit standart grafiğinden yararlanılarak ekstrenin toplam fenolik madde miktarı hesaplanmıştır. Ekstrenin 1 mg'sinde 6,5 µg gallic asit eş değeri madde bulunmuştur.



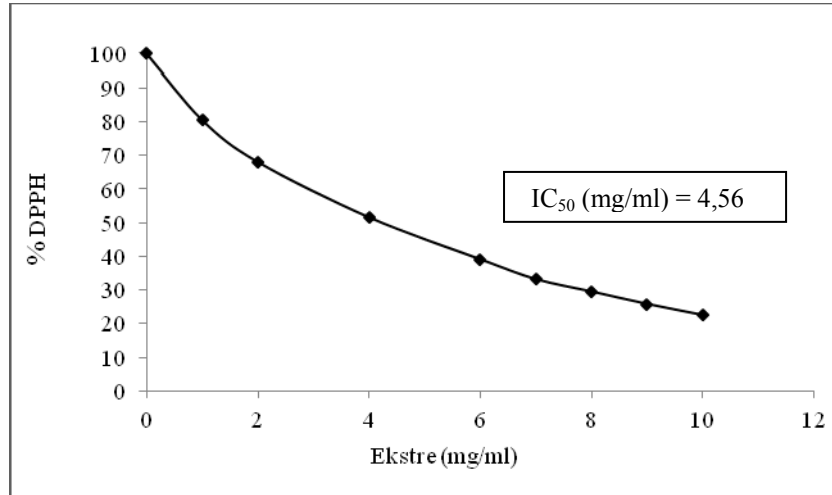
Şekil 4. 4. Gallik asit standart grafiği

4.6.2. DPPH radikal giderme aktivitesi bulguları

Çalışmamızda elde edilen metanollü ekstrenin antioksidan aktivitenin tayini için DPPH radikal giderme aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen bitki ekstresi metanolde çözülmüş ve farklı konsantrasyonlarda denenmiştir. Ekstreler IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 4.5. BHA'nın DPPH radikali süpürme aktivitesi



Şekil 4.6. *G. pilulifera* methanol ekstresinin DPPH radikal giderme aktivitesi

Ekstraktın konsantrasyona bağlı olarak DPPH• radikalini giderdiği gözlenmiştir. Sonuç olarak *G. pilulifera* metanol ekstresinin IC_{50} değeri 4,56 mg/ml, sentetik antioksidan olan BHA'nın ise IC_{50} 19,01 µg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.10 ve 4.11).

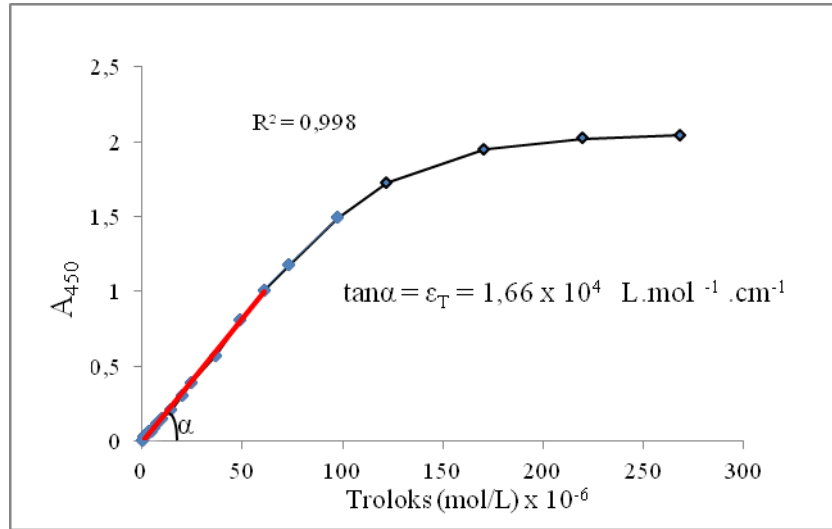
4.6.3. CUPRAC metodu ile indirgeme kapasitesi bulguları

Çalışmamızda ekstrenin ve troloksun kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi, farklı konsantrasyonlarda örneklerin 450 nm’de absorbansları ölçülerek belirlenmiştir. CUPRAC normal yönteminde sonuçlar troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAC) hesaplanarak ifade edilmiştir (Şekil 4.12 ve 4.13).

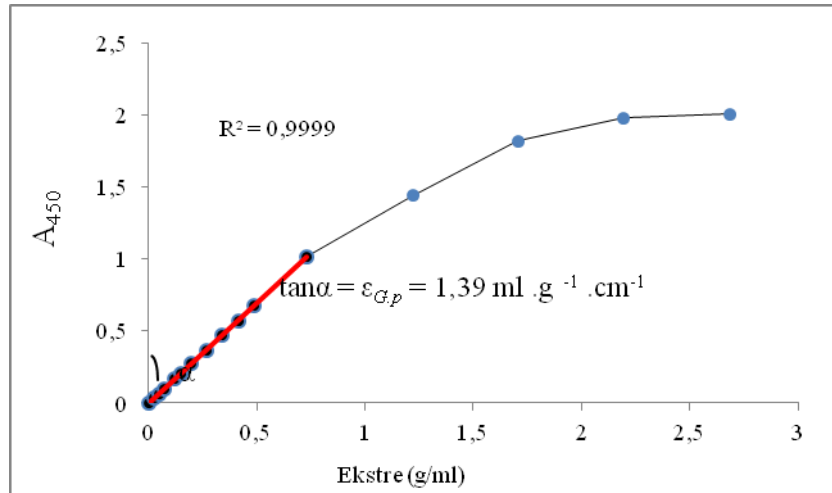
Çalışmamızda sonuçlarımıza göre $\text{TEAC} = \varepsilon (\text{Ekstre}) / \varepsilon (\text{Troloks})$

$$\text{TEAC} = 1,39 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} / 1,66 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$\text{TEAC} = 0,083 \text{ mmol (troloks) / kg (ekstre)}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.7. Troloks molar absorblama katsayı grafiği



Şekil 4.8. *G. pilulifera* molar absorblama katsayı grafiği

4.6.4. İndirgeme gücü kapasitesi (FRAP) bulguları

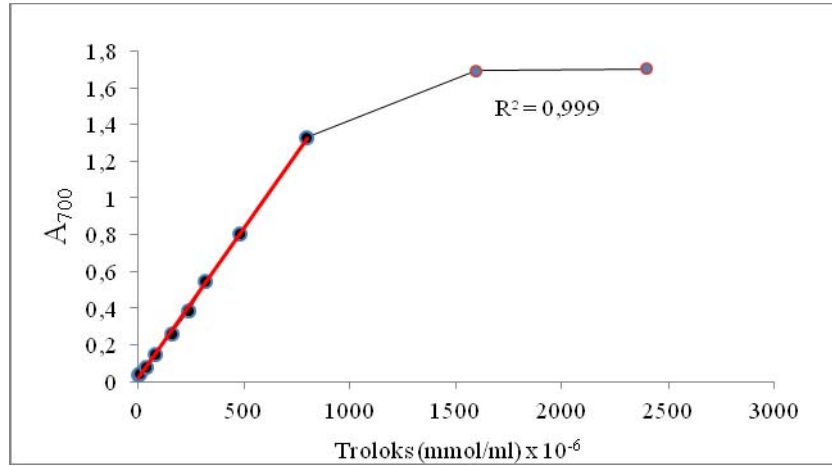
Çalışmada *G. pilulifera* köklerinden elde edilen ekstrenin ve troloksun demiri indirgeme kapasitesi Oyaizu metoduna göre değerlendirilmiş ve elde edilen verilerle konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizilmiştir (Şekil 4.14 ve 4.15).

Çalışmamızda sonuçlarımıza göre $TEAC = \varepsilon (\text{Ekstre}) / \varepsilon (\text{Troloks})$

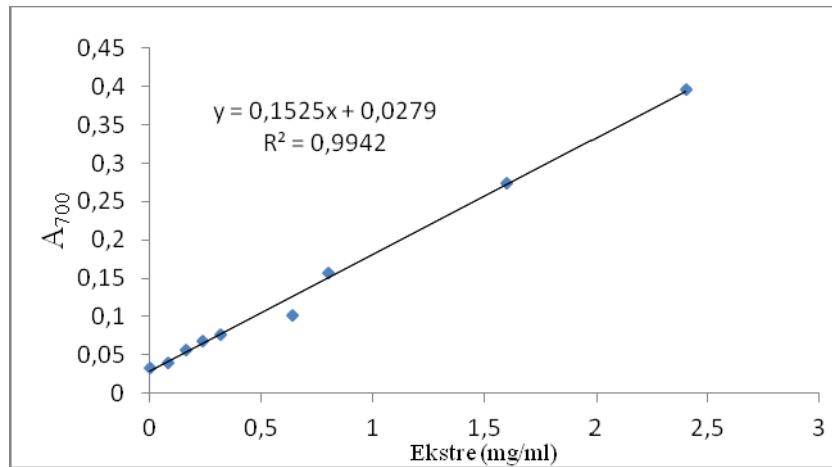
$$TEAC = 0,1525 \text{ ml.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1} / 1.62.10^3 \text{ ml. mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

$$TEAC = 23,5 \mu\text{g (Troloks) /g (Ekstre)}$$

Sonuç olarak elde edilen ekstrenin demir indirgeme kapasitesinin yüksek olmadığı bulunmuştur.



Şekil 4.9. Troloksun demiri indirgeme kapasitesi

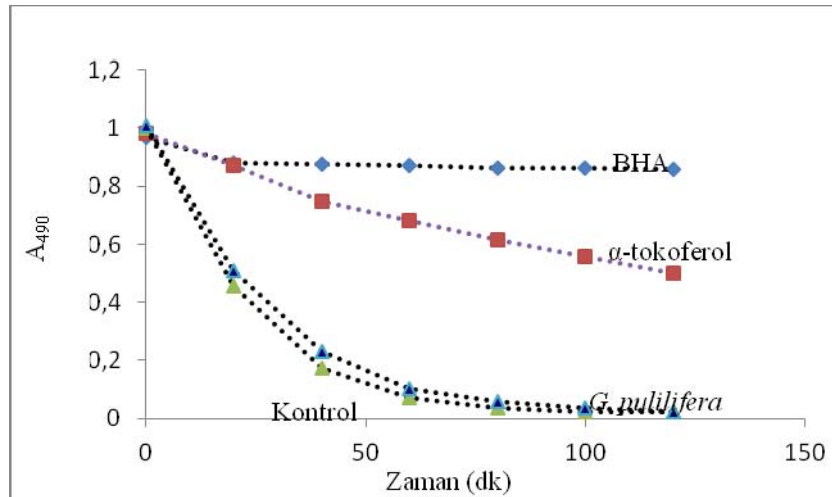


Şekil 4.10. *G. pilulifera* metanol ekstresinin demiri indirgeme kapasitesi

4.6.5. β - Karoten- Lineolik Asit Emülsiyon Metodu ile Antioksidan Aktivite Bulguları

Çalışmada kontrol çözeltisi olarak β -karoten-linoleik emülsiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Bu sistemde β -karoten, linoleik asidin maruz kaldığı oksidasyonun belirli bir kısmını engellemektedir. Grafiğe bakıldığında (Şekil 4.16) kontrol numunesinin absorbans eğrisi en altta, yani ortamdaki linoleik asit oksidasyonunu sadece β -karoten engellenmeye çalışmakta, ekstre ve standart antioksidan maddelerin zamana bağlı olarak absorbans eğrileri ise kontrol numunesinin üzerinde seyir göstermektedir. Bu durum ortama katılan standart antioksidanların β -karoten ile sinerjik etki yaptığını, dolayısıyla linoleik asidin oksidasyonunu daha fazla engellendiğini göstermektedir.

Başlangıç anından 120. dakikaya kadar yapılan ölçümlerde ekstrenin kontrolün biraz üstünde seyretmesine karşın 120. dakikada kontrol ile aynı seyri göstermiştir. Bu nedenle ekstrenin standartlarla kıyaslandığında oksidasyonu engellemede oldukça düşük etki gösterdiği gözlenmiştir.

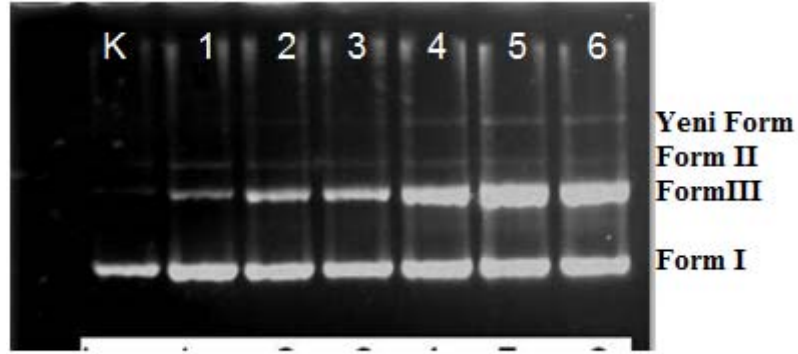


Şekil 4.11. Linoleik asit peroksidasyonunu engellemede ekstre, BHA ve α -tokoferol'un zaman karşı absorbsiyon değişim grafiği

4.7. Ham Saponin Ekstresinin Plazmid DNA Üzerine Etkisi

Agaroz jel elektroforez metodu kullanılarak *G. pilulifera* türünden edilen ham saponin ekstresinin plazmid DNA (pBR322) üzerindeki etkisi izlenmiştir (Şekil

4.17). Kontrol olarak ekstre ile etkileştirilmeyen plazmid DNA kullanılırken diğer gruplarda farklı miktarlarda ekstre eklenerek plazmid DNA ile etkileşimleri sağlanmıştır.



Şekil 4.12. *G. pilulifera* ham saponin eksresinin plazmid DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine etkisini gösteren agoroz jel lektroforez görüntüsü.

K: Plazmid DNA,

1: Plazmid DNA + 2 µg ham saponin ekstresi

2: Plazmid DNA +10 µg ham saponin ekstresi

3: Plazmid DNA+ 20µg ham saponin ekstresi

4: Plazmid DNA+ 30 µg ham saponin ekstresi

5: Plazmid DNA +40 µg ham saponin ekstresi

6: Plazmid DNA + 50 µg ham saponin ekstresi

Şekil 4.17'de görüldüğü gibi kontrolü içeren bantta Form I diğer formlara göre en yüksek oranda gözlenmiştir. Ekstre eklenen gruplarda ise ekstre miktarı ile orantılı olarak plazmid DNA'nın süpersarmal yapısının (Form I) bozularak doğrusal form (Form III) yapısının arttığı görülmüştür. Aynı zamanda kontrol formunda ve 1. grupta gözlenmeyen form II'nin arkasında görülen band yeni bir form oluşumunu göstermiştir ve ekstrenin artan miktarı ile 4, 5, 6. gruplarında daha fazla belirginleşmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 Suşundan Alkalen Proteaz Enziminin Üretimi

Bacillus genusu en önemli ekstraselüler proteaz kaynaklarından biridir (Sarvas et al. 2004; Dias et al., 2008). Yüksek aktivite ve stabilite göstermeleri ve bol miktarda üretebilmeleri nedeniyle ticari olarak kullanılan alkalen proteazların çoğunluğu *Bacillus* suşlarından elde edilmektedir (Johnvesly and Naik, 2001).

Çalışmamızda *Bacillus subtilis* ATCC 6633'den alkalen proteaz enzim üretimi, NB besiyerinde (pH 7,4), 37°C ve 150 rpm'de 48 saat süreyle bakterinin büyütülmesi ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarda farklı *Bacillus* suşlarından alkalen proteaz üretimi için, optimize edilen besiyeri, inkübasyon süresi ve diğer koşullar (pH, ısı, rpm gibi) arasında farklılıklar olduğu görülmektedir (Çizelge 1.4). Dias et al. (2008) tarafından *B. subtilis* ATCC 6633'den alkalen proteaz üretimi için en iyi kaynağın NB olduğunu göstermiştir. Yine Loperena et al., (1994), yaptıkları çalışmada bir *Bacillus* sp.'den proteaz üretimi için NB'nin (8 g/l, maya ekstrakt 3 g/l ve mineral tuzlarının) iyi bir ortam olduğunu bildirmiştir. Başka bir çalışmada tripton ile beraber et ekstraktı veya peptonun kullanıldığı besiyerinin en iyi sonucu verdiği ve NB ile elde edilen değerlerle benzer olduğu bulunmuştur (Varela et al., 1996).

Bazı çalışmalarda *Bacillus* türlerinden enzim üretiminde besiyerinde organik nitrojen kaynaklarının, inorganik kaynaklara göre daha uygun olduğu bildirilmektedir (Puri et al. 2002; Sangeetha et al. 2008). *Bacillus* sp. K-30 için en iyi nitrojen kaynağı olarak maya ekstraktı ve tripton ile kıyaslandığı zaman et ekstraktı olduğu gösterilmiştir (Naidu and Devi, 2005).

Enzim üretiminde besiyerinin seçimi kadar oluşturulan fiziksel şartlarında (pH, ısı, rpm gibi) etkili olduğu görülmektedir. Denizci et al. (2004), *Bacillus clausii* GMBAE 42'den alkalen proteaz üretimini besiyerinde 37°C ve 150 rpm'de 3 gün süresince bakterinin inkübasyonu ile elde etmiştir. Çalışmamızla benzer şekilde Balık ve Dönmez (1992), *B. subtilis*'den enzim üretimi için en iyi koşulların

besiyerinde 37°C ve 150 rpm’de 48 saat inkübasyon süresi olduğunu bildirmiştir. Adinarayana et al. (2003) yaptıkları çalışmada *B. subtilis* PE-11’den maksimum enzim üretimini, besiyerinde 37°C’de 140 rpm çalkalama hızında ve 48 saat süreyle inkübasyon sonucu elde etmiştir. Garcia de Fernando et al. (1991) ise, proteaz üretiminin çalışılan ısı aralığından (7-40°C) etkilenmediğini ileri sürmüştür. Bazı çalışmalarda enzim üretiminde besiyeri için en iyi pH’nın 7,5 olduğu gösterilmiştir (Yandri et al.,2008; Huang et al., 2006).

Shaheen et al., (2008) tarafından *Bacillus subtilis* BS1’den enzim üretiminin 48 saatten sonra azaldığı bulunmuştur. Gözlenen azalmanın nedeninin, ortamdaki nitrojen ve diğer kaynakların tükenmesi ya da ortamın asidifikasyonuna bağlı enzim inaktivasyonu olduğu ileri sürülmüştür.

5.2. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 Suşundan İzole Edilen Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırılması

Çalışmanın tüm basamaklarında enzim aktivitesi ve protein miktarı ölçülmüş ve saflaştırma katsayıları ile verimler hesaplanmıştır (Çizelge 4.1). Saflaştırmanın ilk basamağında *Bacillus subtilis* ATCC 6633’den üretilen alkalen proteazın besiyer süpernatantının %70 amonyum sülfat doygunluğunda çöktürmesi yapılmış ve %67,73 saflaştırma verim ile 6,56 kat saflaştırma elde edilmiştir. Daha sonra enzim jel filtrasyon kromatografi metodu ile %7,79’lük bir verimle 27,2 kat saflaştırılmıştır.

Literatürde *Bacillus*’un farklı suşlarından proteaz saflaştırılmasına yönelik birçok çalışmanın yer aldığı görülmektedir. *B. subtilis* suşlarından elde edilen alkalen proteazın saflaştırılması için farklı doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi kullanılmıştır. Singh et al. (2001b), *B. sphaericus* suşundan proteazı ultrafiltrasyon sonrası %70 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi ile 17 kat saflaştırmış ve %93,9 verim elde etmişlerdir. *B. marmariensis* GMBE 72 suşundan elde edilen alkalen proteaz %55 doygunluğunda amonyum sülfat ile çöktürülmüş ve %61 verim ile 7 kat saflaştırılmıştır (Kerimak Öner, 2008).

El-Safey ve Abdul-Raouf (2004), *B. subtilis*’den izole ettikleri proteazı %40 amonyum sülfat çöktürmesi ile 4,74 ve ardından jel filtrasyon (Sefadeks G-200)

kromatografisiyle 7,87 kat saflaştırmışlardır. Çalışmamızla benzer saflaştırma basamakları uygulanan bu çalışmada daha az saflaştırma elde edilmiştir. Adinarayana et al. (2003) *B. subtilis* PE-11 suşundan izole ettikleri alkalen proteazı, %60 amonyum sülfat çöktürmesi ile 1,2 kat saflaştırma ve %72 verim elde etmiştir. Daha sonra jel filtrasyon kromatografisi (Sefadeks G-200) 21 kat saflaştırma ile %7,5 verim elde edilmiştir. Çalışmamızda amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon kromatografisi ile daha fazla saflaştırma katsayısı elde etmemize karşın elde edilen enzim verimleri oldukça benzerdir. Bu farklılıklar *Bacillus* suşları ve enzim üretim koşulları ile ilişkilendirilebilir.

Alkalen proteazın farklı kısmi saflaştırma ve kromatografi teknikleri kullanarak saflaştırıldığı görülmektedir (Çizelge 1.5). Huang et al. (2003) iyon değişim (CM ve DEAE sefaroze), jel filtrasyon (Sefakril S-200) ve hidrofobik etkileşim kromatografisini içeren birden fazla kromatografik teknik ile sırayla 1,39; 4,09; 30,43; 38,65 kat saflaştırmıştır. Tüm saflaştırma basamaklarından sonra 0,88 verim elde etmiştir. Burada çalışmamızdan farklı teknikler de kullanılarak daha fazla saflaştırma elde edilmesine karşın saflaştırma basamağı arttıkça verimin oldukça azaldığı görülmektedir.

Bacillus HS08 suşundan izole edilen enzim, iyon değişim (DEAE sefaroze) ve jel filtrasyon (Sefakril S-100) uygulanan saflaştırma basamaklarında sırayla 3,18 ve 4,25 kat saflaştırılmış ve sırayla %12,7 ve %5,1 verim elde edilmiştir (Huang et al, 2006). Çalışmamızla benzer verim oranları elde edilmesine karşın saflaştırma katsayımızın oldukça yüksek olması seçilen *Bacillus* suşu, üretim koşulları ve saflaştırma tekniklerindeki farklılıklarla açıklanabilir.

Başka bir çalışmada *B. pumilus* MK6-5'den elde edilen alkalen proteaz, amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi teknikleri kullanarak %26 verim ile 36,5 kat saflaştırılmıştır. Bu metodları kullanarak elde edilen yüksek saflaştırma oranının inhibitör ve/veya yüksek molekül ağırlıklı kontaminantların (nükleik asitler, lipid miselleri, polisakkaritler ve diğer proteinler) uzaklaştırılması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kumar, 2002). Başka bir çalışmada *B. megaterium*'dan izole edilen alkalen proteazı, çeşitli kromatografik tekniklerle 148 kat saflaştırılmış ve bu yüksek saflaştırmayı kullanılan tekniklerin etkinliğine

bağlarken elde edilen oldukça düşük verimi ise her bir basamakta meydana gelen enzim otolizi ile açıklanmıştır (Yossan et al., 2006).

Çalışmalar ile elde edilen sonuçlardan yola çıkarak her proteaz için farklı üretim koşulları ve saflaştırma basamaklarının belirlenmesinin elde edilen verim ve maliyet açısından önemli olduğu görülmektedir. Singh et al., (2001b), *B. sphaericus*'den 2 ayrı alkalen proteaz izole etmiştir. Kısmi saflaştırma basamaklarında bu iki tip için aynı sonuçlar elde edilmiştir. Daha ileri saflaştırma basamağı olarak (Fenil agaroz ve Q seferoz) kolon uygulaması ile 2 tip proteaz için oldukça farklı sonuçlar elde etmiştir. Bu çalışmada her bir proteaz için saflaştırma basamaklarının optimize edilmesi gerekliliğini göstermektedir.

Çalışmamızda iyi bir saflaştırma kat sayısı elde edilmiştir bu durum saflaştırma için seçilen basamakların etkinliğini göstermektedir. Bununla birlikte görülen verim azalması ise saflaştırma basamaklarında meydana gelen enzim otolizi, jel filtrasyon kromatografisinde elde edilen elüatlardan sadece en fazla pik elde edilen tüpün seçilmesi ve çözeltideki başka maddeler veya kromatografik maddelerle etkileşimler ve/veya inaktivasyonların neden olabileceği ileri sürülebilir (Ward and Swiatek, 2009).

5.3. SDS-PAGE ile Enzimin Molekül Ağırlığı

Jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan alkalen proteaz, SDS-PAGE jel elektroforezi sonrası jelde yapılan boyanma sonrası tek band olarak gözlenmiş ve molekül ağırlığı 30,1 kDa olarak belirlenmiştir. Enzimin SDS-PAGE analizinde elde edilen görüntüsü Şekil 4.6'da verilmiştir.

Alkalen proteazların moleküler ağırlığı genel olarak 15 ve 36 kDa arasında olduğu bilinmesine karşın molekül ağırlığının 90 kDa gibi daha yüksek olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (Kato et al., (1992). Dias et al., (2008), tarafından *B. subtilis* ATCC 6633 suşundan izole edilen alkalen proteazın amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi olarak saflaştırmış ve SDS-PAGE elektroforez metodu ile enzim molekül ağırlığını 40 kDa olarak bulunmuştur. En fazla bilinen ve ticari öneme sahip proteazlar olan Subtilisin Carlsberg ve Subtilisin BPN'nin moleküler ağırlığı, sırayla

27,3 ve 27,5 kDa'dır (Beg and Gupta, 2003). Başka bir çalışmada elde edilen proteazın moleküler ağırlığını 29 kDa olduğu tespit edilirken (Singh et al., 2001a), benzer şekilde *B. pumilus* MK6-5'den saflaştırılan alkalen proteazın moleküler ağırlığı 28 kDa olarak bulunmuştur (Kumar, 2002). Huang et al. (2006) tarafından iyon değişim ve jel filtrasyon basamaklarından sonra saflaştırılan proteazın SDS-PAGE analizi ile tek band olarak gözlenilmiş ve moleküler ağırlığının 30,9 kDa olduğu bulunmuştur. Beg and Gupta (2003), *B. mojavensis*'den izole edilen proteazın moleküler ağırlığını 30 kDa tespit edilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda saflaştırılan *B. subtilis* ATCC 6633 alkalen proteazın 30,1 kDa olan moleküler ağırlığı diğer alkalen proteaz enzimi moleküler ağırlığı verileri uyumludur.

5.4. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 Suşundan İzole Edilen Alkalen Proteaz Enzim Aktivitesine Ham Saponin Ekstresinin Etkisi

Çalışmamızda *B. subtilis* ATCC 6633 kaynağından proteaz elde edilmiş ve *G. pilulifera*'dan ekstrakte edilen ham saponin ekstresinin varlığında enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir.

Proteazlar özellikle deterjan endüstrisinde yoğun olarak kullanılmaktadır. Proteazlar okside edici ajan, surfaktanlarla ve diğer katkı maddeleri ile birlikte deterjanlarda yer almaktadır ve bu ajanlar varlığında aktivitelerini koruyabilmeleri oldukça önemlidir. Bu nedenle yapılan çalışmalarda enzimin deterjanlarda kullanılabilirliğini test için surfaktan ve diğer ajanlar varlığında enzim aktivitesi değerlendirilmiş ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Joo and Chang (2005), *Bacillus clausii* I-52'den saflaştırılan alkalen proteazın aktivitesinde %5 Tween 20'nin varlığında %67 ve 5% (v/v) Triton X-100'ün varlığında %74 oranında artış bildirmiştir. Mei and Jiang (2005) tarafından Triton X-100 ve Tween-80 varlığında alkalen proteaz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda ise surfaktanların, alkalen proteaz aktivitesinde kayıplara neden olduğu gösterilmiştir (Oberoi et al., 2001; Li et al., 2011; Rajkumar et al., 2011).

Çalışmamızla benzer şekilde Gupta et al. (1999), *Bacillus* SB5'den elde edilen proteazın aktivitesinin çeşitli surfaktan ve deterjanlar tarafından stimule edildiğini göstermiştir ve surfaktanlar arasında özellikle saponinin enzimle 1 saat inkübasyon sonunda neredeyse enzim aktivitesinin iki kat arttığı gösterilmiştir. Moreira et al., (2002) tarafından *Nocardiosis sp.*'den elde edilen proteazın, saponin ve diğer surfaktanlar varlığında 30 dakika inkübasyon sonrasında enzim aktivitesinin stimule edildiği ve daha sonra 60 dakika inkübasyon sonrası ise saponin varlığında %75 oranında enzim aktivitesinin korunduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada *Bacillus pumilus* KS12'den elde edilen bir alkalen proteaz olan keratinaz aktivitesinin çeşitli surfaktanlar, deterjanlar ve okside edici ajanlar tarafından stimule edildiği özellikle saponinin varlığında aktivitenin neredeyse iki kat arttığı bulunmuştur (Rajput et al., 2010). Oberoi et al. (2001) ise *Bacillus* sp. RGR-14 den izole edilen alkalen proteazın aktivitesinde saponin varlığında kayıplar meydana geldiğini bildirmiştir. Espósito et al. (2009b) Tween 20 ve 80'nin alkalen proteaz aktivitesini %20 oranında artırırken saponin ise enzim aktivitesinde %35 civarında kayba neden olduğunu bulmuştur.

Farklı olarak Gulati et al. (2005) tarafından yapılan çalışmada çeşitli surfaktanların lipaz enzimi üzerine etkisi değerlendirilmiş ve 1 saat inkübasyon sonucunda saponinin enzim aktivitesini artırdığı bulunmuştur. Başka bir çalışmada saponinin selüloz ve proteaz enzim aktivitelere etkisi araştırılmıştır. Çalışmada, saponin enzimlere ayrı ayrı uygulandığında enzimlerin aktivitelerinde azalmaya neden olurken 2 enzim karıştırıldıktan sonra saponin eklendiğinde proteaz aktivitesinde neredeyse 2 kat artış gözlenmiştir (Chen and Wang, 2008).

Kamande et al. (2000) yaptıkları çalışmada ruminal mikroorganizmalardan elde ettikleri enzimde; proteaz aktivasyonu ve tiyol reaktivitesi üzerine noniyonik surfaktan olan Tween 60 ve Tween 80 etkisini değerlendirmiş ve sırayla %99,2 ve 166,8 oranında artış saptamıştır. Tween 80 ve Tween 60 arasındaki aktivasyon farkını ise Tween 80 varlığında gözlenen tiyol grublarının reaktivitelerindeki artışa bağlanmıştır. Çalışmada surfaktanların enzim aktivasyonundaki etki mekanizması tam olarak açıklanmamasına karşın amfipatik özelliklerinden dolayı surfaktan

moleküllerinin enzim-substrat hidrofobik etkileşimi için uygun aktif alanların oluşumunda bir role sahip olabileceği ileri sürülmüştür.

Bununla beraber surfaktanlar, farklı hidrolitik enzimlerin kullanımına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle surfaktanlar, biyogaz ve endüstriyel glikoz üretim biyoreaktörlerinde selülotik metaryalin enzimatik hidrolizinin artırılmasında kullanılmaktadır. Surfaktanların bu etkisi, enzim stabilitesini artırmasına ve böylece hidroliz esnasında enzim denatürasyonun azalmasına dayandırılmaktadır. Ayrıca surfaktanların enzimin substrattan desorbsiyonunu kolaylaştırdığı böylece adsorbe olan enzimlerin inaktivasyonunu önlediği ileri sürülmektedir (Kamande et al., 2000; Eriksson et al., 2002).

Ayrıca farklı bitkilerden izole edilen saponinlerin enzimlerin aktiviteleri üzerinde etkileri çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Lee et al. (1986), *Gingsen* saponinin Na^+ , K^+ ATPaz enzim aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir. Sroka et al. (1997) tarafından ise saponinin (pankreasından elde edilen enzimlerden) lipolitik aktiviteyi stimüle ettiği fakat amilolitik veya proteolitik aktivite üzerinde etkili olmadığı bulunmuştur. Bununla birlikte saponinlerin; protein, mineral ve steroller ile etkileşim gösterdiği ve bu bileşiklerin fizikokimyasal özelliklerinde ve biyolojik aktivitelerinde modifikasyonlara neden olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca saponin-protein etkileşim sonucunun proteinin türüne ve saponin karışımına bağlı olarak değişebileceği ileri sürülmektedir (Potter et al., 1993; Tanaka et al., 1995).

Sonuç olarak, çalışmada meydana gelen enzim aktivitesindeki artış, ham saponin ekstresinin surfaktan özelliği ile ilişkilendirilebilir. Bu nedenle çalışmamızda kullanılan *G. pilulifera* türü doğal surfaktan kaynağı olarak endüstriyel kullanım için değerlendirilebilir. Bununla beraber *B. subtilis* ATCC 6633 alkalin proteazı surfaktan varlığında aktivitesini korumuştur ve bu özellik ticari deterjan enzimi (katkı maddesi) olarak önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Proteazın kullanıldığı endüstriyel proseslerde çalıştığımız bitkiden elde edilen saponin surfaktan olarak ve enzim etkinliğini artırmak amacıyla kullanılabilir.

5.5. Bitki Ekstraksiyonu ve Kromatografik Tekniklerle Saponin İzolasyonu

Gypsophila türleri ülkemizde geniş bir yayılım göstermektedir ve bu genusun üyelerinin saponin içerdiği bilinmektedir. Literatür çalışmalarında belirtildiği gibi su, alkoller (metanol, etanol) ve bunların sulu karışımları saponinlerin en yaygın kullanılan ekstraksiyon çözücüleridir. Çalışmamızda da *G. pilulifera* bitkisinin metanol ile ekstraksiyonu yapılmış ve ham saponin içeren ekstresi elde edilmiştir.

Saponin içeren bitkilerin ekstraksiyon sonrası uygulanan yöntem ve bitki türüne bağlı olarak saponin verimleri değişmektedir. Sezik vd. (1986), ülkemizin değişik bölgelerinden toplanan 5 farklı *Gypsophila* türüne ait ekstrakt toplam saponin miktarını %11,58 ve 19,58 kadar değişen oranlarda bulmuştur. Battal vd. (2003), Anadolu kökenli çövenlerde ham saponin miktarının %10-25 oranında olduğunu bildirmektedir. Ayrıca saponin verimi açısından optimum ekstraksiyon süresini 8 saat olduğunu ve ekstraksiyon süresi uzadıkça ekstrakta geçen toplam saponin miktarının arttığını bildirmiştir (Battal, 2002). Bizim çalışmamızda da ilk 8 saat sonunda %7,8 oranında verim elde edilirken daha sonraki ekstraksiyon sürelerinde verim azalmış olup toplam 24 saatin sonunda %12,7'lik verim elde edilmiştir. Elde ettiğimiz verim diğer çalışmalarda elde edilen saponin ekstraksiyon verim sınırları içerisinde yer almaktadır.

Saponinlerin izolasyonunda, İTK, silika jel ve ters faz silika jel kolon kromatografisi ve HPLC gibi kromatografik teknikler kullanılmaktadır. Çalışmalarda bitkilerden saponin izolasyonu ve teşhisi için İTK analizinde farklı çözücü sistemleri ve sorbentlerin kullanıldığını görülmektedir (Çizelge 1.8) ve bunlar doğrultusunda çalışmamızda ayırım gerçekleştirilmiştir. Bir çalışmada *Quillaja*'dan saponin saflaştırmak için silika jel kromatografisi (Silica Si-60) ile kloroform:metanol:su (62:32:6, v/v/v) çözücü sistemi kullanılarak saponin izolasyonu gerçekleştirildiği bildirilmektedir (Güçlü-Üstündağ ve Mazza, 2007).

Çalışmamızda ham ekstrede saponin varlığını saptamak ve diğer saflaştırma basamaklarında kompozisyonlarını aydınlatmak için İTK uygulanmış ve daha ileri izolasyon için silika jel kromatografisi yapılmıştır. İTK ile 6 farklı spot içeren bir ayırım gerçekleştirilmiş ve renklendirme reaktifi ile elde edilen mavi spotun saponin

olduğu düşünölmüştür. Saponin izolasyonu için kolon kromatografisi yapılmış fakat kolondan toplanan elüatlarda bozunma gözlendiğı için daha ileri aşamalara devam edilememiş ve saf saponin izole edilememiştir. Toplanan elüatlarda gözlenen bozunma, bitki materyalinin kolon maddesi ile etkileşimi ve/veya bitki fitokimyasallarının oksidasyonundan kaynaklanabilir.

5.6. Ekstrenin Antioksidan Aktivitesi

Antioksidanların aktivitesi, peroksit ve diğör aktif türlere karşı kimyasal reaktivitelerine bağılıdır. Herhangi bir saf maddenin antioksidan özelliğı farklı mekanizmalar üzerinden meydana gelebilir ve antioksidanın konsantrasyonu, substratın tipi, sistemin fiziksel durumu gibi birçok faktör antioksidan aktiviteyi etkilemektedir (Yanishlieva-Maslarova, 2001). Bitkilerin antioksidan özellikleri ise vitaminler, flavonoidler, terpenoidler, karotenoidler, lignin ve saponin gibi fitokimyasalların varlığına bağlanmaktadır (Zheng and Wang, 2001; Bukhari et al., 2008).

Farklı bitki kaynaklarından elde edilen saponinlerin antioksidan aktivitelerini belirleyen çalışmalar mevcuttur (Xi et al., 2008; Lee et al., 2011). Vietnam ginseng (*Panax vietnamensis* Ha&Grushv., Araliaceae) saponinin, serbest radikal ile indüklenen hasarlı dokularda oldukça yüksek koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur (Huong et al., 1998). *Panax* ginseng ekstraktındaki saponinlerinde antioksidatif özelliklerinin bulunduğunu bildirilmektedir (Keum et al., 2000). Ayrıca Li et al. (2009) çay saponinin bazı antioksidan aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir. Chen et al. (2011) ise bitkilerdeki saponin içeriğinin antioksidan aktiviteye önemli şekilde katkı sağlayabileceğini vurgulamıştır. Başka bir çalışmada saponinin serum lipitleri üzerine yararlı etkileri gözlenmiş ve bu etki saponinin antioksidan aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir (Rodrigues et al, 2005). En önemli ticari saponin kaynağından biri olan *Yucca schidigera* 'dan elde edilen ekstraktın antioksidan aktiviteyi olumlu yönde etkilediğı ve bunun fenolik bileşiklerin yanı sıra çeşitli fitokimyasallardan ileri gelebileceğini bildirmiştir (Fidan ve Dündar, 2007).

Çalışmamızda da toplam fenolik madde miktarı ve DPPH radikali süpürme aktivitesi, CUPRAC, FRAP, β - Karoten- Lineolik Asit Emülsiyon metodu olmak üzere 4 farklı

yöntem ile bu türün antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. Sonuç olarak *G. pilulifera* metanol ekstresinin düşük fenolik içeriğe sahip olduğu ve kullanılan tüm metodlarda yüksek antioksidan aktivite göstermediği bulunmuştur. Antioksidan aktivite ve fenolik içerik arasında korelasyon olduğu bilinmektedir (Apak et al. 2006; Güçlü et al., 2006; Ulusoy et al., 2010) ve bu nedenle çalışmamızda gözlenen düşük antioksidan aktivite fenolik içerikle ilişkilendirilebilir. Benzer şekilde Lee et al. (2011) tarafından yapılan çalışmada 2 farklı bitkiden saponin ve fenolik bileşik içeren ekstraktlar elde edilmiş ve antioksidan aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, saponinlerin fenolik bileşik içeren ekstraktlarla kıyaslandığında oldukça düşük antioksidan aktivite gösterdiği bulunmuştur.

Literatüre bakıldığında *Gypsophila* türüne ait toplam fenolik madde miktarını ve antioksidan aktivitesini değerlendiren çok fazla çalışma yoktur. *Gypsophila arrostii* var. *nebulosa* türünden etanol ekstraksiyonu ile elde edilen ham saponinin çalışmamızla benzer yöntemler ile antioksidan aktivitesi değerlendirilmiş ve bulgularımızla paralel olarak düşük fenolik içerik ve çalışılan tüm yöntemlerde düşük antioksidan aktivite gösterdiği bulunmuştur (Özdemir-Şimsek, 2011). Boscaiu et al. (2010), jipsli habitat bitkilerinden 9 türün fenolik ve flavonoid içeriğini değerlendirmiştir. *Gypsophila struthium* subsp. *hispanica* türünün fenolik ve flavonoid içeriğinin diğer bitkiler arasında en düşük değere sahip olduğu bildirilmiştir. Yine Serteser et al., (2009) tarafından farklı *Gypsophila* türlerini de içeren 38 bitkinin *in vitro* antioksidan kapasitesi değerlendirilmiş ve *Gypsophila* türlerinin çalışmadaki diğer türlerden daha düşük antioksidan aktivite gösterdiği bulunmuştur.

Farklı olarak *Gypsophila* L. ekstrenin *in vivo* olarak antioksidan kapasitesi araştırıldığı bir çalışmada, ekstrenin antioksidan enzimlerden katalaz, süperoksitdismutaz, malondialdehit seviyelerinde önemli bir değişime neden olmadığını fakat total glutatyon peroksidaz aktivitesinde önemli bir düşüşe neden olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlardan yola çıkarak saponin ekstresinin, besinlerde yüksek miktarda (helva yapımı gibi) kullanımında toksik etkilerden dolayı dikkat edilmesinin gerekliliği vurgulanmıştır (Güle et al., 2009).

Sonuç olarak çalışmamız sonucu *G. pilulifera* türünden elde edilen ekstrenin gösterdiği düşük antioksidan aktivite bulguları diğer *Gypsophila* türlerinden elde edilen antioksidan bulguları ile uyumludur.

5.7. Elde Edilen Ham Saponin Ekstresinin Plazmid DNA Üzerine Etkisi

Çalışmada, *G. pilulifera* bitki ekstresinin farklı konsantrasyonlarının plazmid DNA'nın yapısı üzerine etkisi araştırılmıştır. Agaroz jel elektroforezi analizi ile ham saponin ekstresi ile etkileşim sonucu plazmid DNA'nın süpersarmal (Form I) yapısını oluşturan bağlanmaların, bir veya iki zincirinde meydana gelen kırılmalar nedeniyle DNA'da farklı formların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.17).

Saponinlerin bitkileri patojen mikroorganizmalara karşı koruduğu ve soğukkanlı hayvanlar için toksik olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda bazı saponinlerin antibakteriyel, antiprotozoal ve farmakolojik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Antiprotozoal ve antibakteriyel etki mekanizmasının ise saponinlerin membranolitik özellikleri ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Cheeke et al., 2000).

Hedera helix L. bitkisinden elde edilen saponin, antiparasitik aktiviteye sahip olduğu ve güçlü bir şekilde DNA sentezini inhibe ederek insan monositlerine karşı antiproliferatif etki gösterdiği bulunmuştur (Delmas et al., 2000). Saponinlerin antiviral aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Sparg et al., 2004). Simões et al. (1999) tarafından izole edilen triterpenoid saponinin, herpes simpleks virüsünde DNA sentezinin inhibe ederek antiviral aktivite gösterdiği ileri sürülmüştür.

Çalışmamızla aynı bitki türü ile yaptıkları çalışmada Arslan et al. (2012) tarafından izole edilen triterpenoid saponinin, akciğer karsinoma hücresi için oldukça sitotoksik olduğu gösterilmiş ve antikanser tedavisinde faydalı olabileceği ileri sürülmüştür.

Bununla beraber, Kang and Cho (1985) tarafından saponinlerin endonükleaz enzimlerin aktivitesine olan etkisinin araştırıldığı çalışmada; bazı restriksiyon endonükleazları ile birlikte izole edilen saponinin kısa sürede plazmid DNA (pBR322) kırıkları meydana getirmede önemli rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Ayrıca bazı çalışmalarda peroksitlerle muamele edilmiş kimyasallar tarafından DNA'nın yapısında değişikliklerin indüklenebildiği gösterilmiştir (Babu et al., 2007).

Çalışmamızda da ekstre ile etkileşimi sonucu plazmid DNA’da oluşan kırıklar nedeniyle değişimler gözlenmiştir. Saponinlerin lipidlerle etkileşimi sonucu hücre zarını etkilemesi surfaktan özelliği ile ilişkilendirilirken çalışmada plazmid DNA yapısında meydana getirdiği değişiklik nükleaz aktivitesi ile açıklanabilir. Bu etkisinden faydalanarak ekstreler, mikroorganizmalara karşı etkili bir şekilde kullanılabilir. Bununla birlikte son yıllarda DNA ve RNA’ya bağlanan ve onları oksidatif veya hidrolitik mekanizma ile kesen kimyasal nükleazlara olan ilgi artmıştır. Bu katalizörlerin; biyoteknolojide terapötik yaklaşımlar ve nükleik asit konformasyonları çalışmalarında potansiyel olarak yararlı araçlar olabileceği düşünülmektedir.

SONUÇ

Çalışmada *B. subtilis* ATCC 6633 suşundan alkalen proteaz elde edilmiş ve 27,2 kat saflaştırılmıştır. Ayrıca saflaştırılan enzimin *Gypsophila pilulifera* türünden elde edilen ham saponin ekstresi varlığında aktivitesinde artış tespit edilmiştir. Bu da saflaştırılan enzimin saponin ile birlikte endüstriyel olarak kullanılabilirliğini göstermektedir. Çünkü çeşitli denatürantlar, surfaktanlar ve oksidantlar varlığında stabil kalan alkalen proteazlar endüstriyel uygulamalar açısından oldukça değerlidir.

Ekstrakte edilen ham saponinin antioksidan kapasitesi üzerine yapılan çalışmalar sonucunda düşük fenolik içerik ve antioksidan aktivite bulunmuştur. Ayrıca ham saponin ekstresinin artan miktarları ile orantılı olarak plazmid DNA'nın süpersarmal formunun bozularak doğrusal formunda artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle DNA yapısında bozunmaya neden olan ham saponin ekstresi, biyomedikal ve biyoteknoloji çalışmalarında endonükleaz, antimikrobiyal ve antikarsinojen etkiye sahip alternatif bir kaynak olabilir.

6. KAYNAKLAR

- Adinarayana, K., Ellaiah, P., Siva Prasad, D., 2003. Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease From A Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE-11. American Association of Pharmaceutical Scientists, 4 (4), Article 56, 1-9.
- Aehle, W., 2007. Enzymes in Industry: Production and Applications. http://books.google.com.tr/books?id=9RGwwbLuIIQC&pg=PA180&lpg=PA180&dq=surfactant+are+increased+protease+stabilization&source=bl&ots=lD1loKJVdN&sig=JloPRmTtlcl0H6J4Tlwh5Z_cAU&hl=tr&sa=X&ei=_DcUT6eeE5DGQbK4_mzAg&ved=0CHYQ6AEwCQ#v=snippet&q=%22in%20detergent%22&f=false. Erişim Tarihi: 16.01.2012.
- Ahmed, I., Anjum Zia, M., Nasir Iqba H.M., 2011. Purification and Kinetic Parameters Characterization of an Alkaline Protease Produced from *Bacillus subtilis* through Submerged Fermentation Technique. World Applied Sciences Journal, 12 (6), 751-757.
- Akcan, N., 2012. Production of extracellular protease in submerged fermentation by *Bacillus licheniformis* ATCC 12759. African Journal of Biotechnology, 11(7), 1729-1735.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, 157s, Konya.
- Albayrak, S., Sağıdıç, O., Aksoy, A. 2010. Bitkisel Ürünlerin ve Gıdaların Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 26 (4), 401-409.
- Alhan, C., şan, M., 2002. Kroner Kalp Hastalığı Tedavisinde Anti-Oksidanlar Yararlı mı? Türkiye Klinikleri Kardiyoloji Dergisi, 15, 203-213.
- Amoros, M., Fauconnier, B., Girre, R.L., 1987. In vitro antiviral activity of a saponin from *Anagallis arvensis*, Primulaceae, against herpes simplex virus and poliovirus. Antiviral Research, 8(1), 13–25.
- Anonim, 2007. MEGEP, Gıda Teknolojisi: Besiyeri Hazırlama. http://cygm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/gida/moduller/besiyeri_hazirlama.pdf. Erişim Tarihi: 12.12.2010.
- Anwar, A., Saleemuddin, M., 1998. Alkaline Proteases: A Review. Bioresource Technology, 64,175-183.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E., 2004, Novel Total Antioxidant Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in The Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 7970-7981.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., Ercağ, E., 2006. The Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) and Polyphenolic Content of Some Herbal Teas. International Journal Food Sciences Nutrition, 57, 292-304

- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji 1. İnternet sitesi. <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAAF6AA849816B2EF2D88412156A07E5B#14>. Erişim Tarihi: 11.11.2011.
- Arıcı, M., Nazır, H., 2010. [N,N'-Bis (salisiliden)-1,3-propandiaminato] Nikel (II) Kompleksinin Sentezi ve DNA Etkisinin İncelenmesi. SDÜ Fen Dergisi (E-Dergi), 5 (1), 67-74.
- Aslan Erdem, S., 2009. Türkiye'de Yetişen Bazı *Rryngium* L. Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar. Farmakognozi Anabilim Dalı Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 160s, Ankara.
- Arslan, I., Çelik, A., Chol, J.H., 2012. A cytotoxic triterpenoid saponin from underground parts of *Gypsophila pilulifera* Boiss.&Heldr. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X12000548?v=s5>. Erişim Tarihi: 28.02.2012.
- Aunstrup, K., 1980. Protenases. In: *Economic Microbiology: Microbial Enzymes and Bioconversions* (Rose A.H., ed.). Academic Press, pp. 50-114, New York.
- Avato, P., Bucci, R., Tava, A., Vitali, C., Rosato, A., Bialy, Z., Jurzysta, M., (2006). Antimicrobial Activity of Saponins from *Medicago* sp.: Structure-Activity Relationship. *Phytotherapy Research*, 20, 454–457.
- Avunduk, S., Mitaine-Offer, A.C., Alankuş-Çalışkan, O., Miyamoto, T., Şenol, S.G., Lacaille-Dubois, M.A., 2008. Triterpene Glycosides from The Roots of *Astragalus flavescens*. *Journal of Natural Products*. 71, 141-145.
- Babaoğlu M., Gezgın S., Topal A., Sade B., Dural H., 2004. *Gypsophila sphaerocephala* Fenzl ex Tchihat.: A Boron Hyperaccumulator Plant Species That May Phytoremediate Soils with Toxic B Levels. *The Turkish Journal of Botany*, 28, 273-278.
- Babu, M.S., Reddy, K.H., Krishna, P.G., 2007. Synthesis, Characterization, DNA Interaction and Cleavage Activity of New Mixed Ligand Copper (II) Complexes with Heterocyclic Bases. *Polyhedron*, 26(3), 572-580.
- Balandrin, M.F., 1996. Commercial Utilization Of Plant-Derived Saponins: An Overview Of Medicinal, Pharmaceutical, and Industrial Applications. In: *Saponins Used in Traditional Medicine* (Waller, G.R., Yamasaki, K., eds.). Plenum Press, pp. 1-14, New York.
- Balık, M., Dönmez, S., 1992. Ekstraselüler *Bacillus* Proteazlarının Bazı Özellikleri Ve Enzim Üretiminin Optimizasyonu. *Gıda*, 17(3), 175-180.
- Banik, R.M., Prakash, M., 2004. Laundry Detergent Compatible Of The Alkaline Protease From *Bacillus cereus*. *Microbiology Research*, 159, 135–140.
- Barett, A.J. 1994. Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases. *Methods in Enzymology*, 244, 1–15.
- Battal, H., 2002. Çöven Ekstraktı Üretimi Üzerine Bir Araştırma. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 44s, Ankara.

- Battal, H., Sarı, F., Velioğlu, S., 2003. Çöven Ekstraktı Üretimi Üzerine Bir Araştırma. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 4 (1), 75-84.
- Beg, Q.K., Saxena, R.K., Gupta, R., 2002. De-repression and Subsequent Induction of Protease Synthesis by *Bacillus mojavensis* Under Fed-Batch Operations. *Process Biochemistry*, 37, 1103–1109.
- Beg, K.Q., Gupta, R., 2003. Purification and Characterization of An Oxidation-Stable, Thiol-Dependent Serine Alkaline Protease From *Bacillus mojavensi*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 294-304.
- Bhaskar, N., Sudeepa, E.S., Rashmi, H.N., Tamil Selvi, A., 2007. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. *Bioresource Technology*, 98, 2758–2764.
- Bhatiya, R., Jadeja, G.R., 2010. Optimization of Environmental and Nutritional Factors For Alkaline Protease Production. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 9, 594-599.
- Bilgehan, H., 2002. Klinik Mikrobiyolojik Tanı, Fakülteler Kitap Evi Barış Yayınları, 777s.
- Boscaiu, M., Sánchez, M., Bautista, I., Donat, P., Lidón, A., Llinares, J., Llul, C., Mayoral, O., Vicente, O., 2010. Phenolic Compounds as Stress Markers in Plants from *Gypsum* Habitats. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Horticulture*, 67(1), 44-49.
- Boyer, P.D. 1971. *The Enzymes*, 3rd ed. Academic Press, Inc., pp. 609-647, New York.
- Brand, H., Brand, E. 2004. A Weighty Issue. *Soap, Perfumery & Cosmetics Asia*, 27–31.
- Bugg, T., 1996. *An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*, Blackwell Science, 246 pp, Oxford, U.K.
- Bukhari S.B., Bhanger, M.I., Memon, S., 2008. Antioxidative activity of extracts from Fenugreek Seeds (*Trigonella foenum-graecum*). *Pakistan Journal of Analytical and Environmental Chemistry*, 9 (2), 78-83.
- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A. Özkan, M. 2004. Meyve ve Sebzelerin Bileşimi, Cilt 1, (Ed, Cemeroğlu, B.), Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi 2. Baskı, (Composition of fruits and vegetables, Vol 1: Fruit and Vegetable Processing Technology), Başkent Klişe Matbaacılık, Ankara, s.670.
- Chaphalkar, S., Dey, S., 1994. Some aspects of production of extracellular protease from *Streptomyces diastaticus*. *Journal of Microbial Biotechnology*, 9, 85–100.
- Chakrabarti, S.K., Matsumura, N., Ranu, R.S. 2000. Purification and Characterization of An Extracellular Alkaline Serine Protease From *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2). *Current Microbiology*, 40, 239–244.

- Cheeke, P.R., 2000. Actual and Potential Applications of *Yucca Schidigera* and *Quillaja Saponaria* Saponins in Human and Animal Nutrition. *Journal of Animal Science*, 77, 1-10.
- Cheetham, P.S.J., 1995. The application of enzymes in industry, *In Hand Book of Enzyme Biotechnology* (Wiseman, A., ed.). *Ellis Horwood*, pp. 419-522, UK.
- Chen, B.Y., Wang, H.T., 2008. Utility of Enzymes from *Fibrobacter succinogenes* and *Prevotella ruminicola* as detergent additives. *Journal of Industrial Microbiology & biotechnology*, 35, 923–930.
- Chen, Y.F., Roan, H.Y., Lii, C.K., Huang, Y.C., Wang, T.S., 2011. Relationship Between Antioxidant and Antiglycation Ability of Saponins, Polyphenols, and Polysaccharides in Chinese Herbal Medicines Used to Treat Diabetes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(11), 2322-2331.
- Cheng, K., Lu, F.P., Li, M., Liu, L.L., Liang, X.M., 2010. Purification and biochemical characterization of a serine alkaline protease TC4 from a new isolated *Bacillus alcalophilus* TCCC11004 in detergent formulations. *African Journal of Biotechnology*, 9(31), 4942-4953.
- Chu, W.H., 2007. Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. *Journal of Indian Microbiol Biotechnology*, 34, 241–245.
- Cirelli, A.F., Ojeda, C., Castro, M.J.L., Salgot, M., 2008. Surfactants In Sludge-Amended Agricultural Soils. *Environmental Chemistry Letters*, 6(3), 135–148.
- Cook, N.C., Samman, S., 1996. Flavonoids—Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects, and Dietary Sources. *Nutritional Biochemistry*, 7, 66-76.
- Cupp-Enyard, C., 2008. Sigma's Non-specific Protease Activity Assay-Casein as a Substrate. *Journal of Visualized Experiments*. (19), e899, DOI: 10.3791/899.
- Davis, P.H., Miller, R.R., Tan, K., 1988. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 10 (Supplement), Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Delmas, F., Di Giorgio, C., Elias, R., Gasquet, M., Azas, N., Mshvildadze, V., Dekanosidze, G., Kemertelidze, E., Timon-David, P., 2000. Antileishmanial Activity of Three Saponins Isolated from ivy,-hederin,-hederin and hederacolchiside A1, as Compared to Their Action on Mammalian Cells Cultured *In Vitro*. *Planta Medica*, 66, 343–347.
- Dembitsky, M.V., 2004. Astonishing Diversity of Natural Surfactants: 1. Glycosides of Fatty Acids and Alcohols. *Lipids*, 39(10), 933-953.
- Deng, A., Wu, J., Zhang, Y., Zhang G., Wen T., 2010. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001. *Bioresource Technology*, 101, 7100–7106.

- Denizci, A.A., Kazan, D., Abeln, E.C., Erarslan, A., 2004. Newly Isolated *Bacillus Clausii* GMBAE 42: An Alkaline Protease Producer Capable To Grow Under Highly Alkaline Conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 96(2), 320-327.
- Desai, J.D., Banat, I.M., 1997. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 47-64.
- Dias, D.R., Vilela, D.M., Silvestre, M.P.C., Schwan, R.F., 2008. Alkaline Protease from *Bacillus* sp. Isolated from Coffee Bean Grown on Cheese Whey. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2027–2034.
- Doğan, P., 2009. *Pediococcus Acidilactici* PBF Suşunda Bakteriyosin Üretiminden Sorumlu Genin Aktarımı. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 115s, Ankara.
- Dündar, Y., Aslan, R., 1999. Hücre Moleküler Statüsünün Anlaşılması ve Fizyolojik Önem Açısından Radikaller-Antioksidanlar. *Cerrahi Tıp Bilim Dergisi*, İnsizyon, 2(2), 134-142.
- Edge, R., Mc Garvey, D. J., Truscott, T. G., 1997. The Carotenoids as Antioxidants, A Review. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 41, 189-200.
- El-Hadj-Ali, N., Agrebi, R., Ghorbel-Frikha, B., Sellami-Kamoun, A., Kanoun, S., Nasri, M., 2007. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 515–523.
- El-Safey, E.M., Abdul-Raouf U.M., 2004. Production, Purification, Characterization of Protease Enzyme from *Bacillus subtilis*. <http://faculty.ksu.edu.sa/72467/Documents/text%20of%20PRODUCTION,%20PURIFICATION%20AND%20CHARACTRIZATION%20OF%20PROTEASE%20ENZYME%20FROM%20BACILLUS%20SUBTILIS.pdf>. Erişim Tarihi: 01.01.2012.
- El-Shanshoury, A.R., El-Sayeed, M.A., Sammour, R.H., El-Shouny, W.A., 1995. Purification And Partial Characterization of Two Extracellular Alkaline Proteases From *Streptomyces Corchorusii* St36. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 99–104.
- Eren Kıran, Ö., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N., 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. *Journal of Science and Engineering*, 9(1), 12-19.
- Erenel, G., Erbaş, D., Arıcıoğlu, A., 1992. Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistemler. *Gazi Tıp Dergisi*, 3, 243-250.
- Eriksson, T., Börjesson, J., Tjerneld, F., 2002. Mechanism of Surfactant Effect in Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(3), 353–364.
- Espósito, T.S., Amaral, I.P.G., Buarque, D.S., Oliveira, G.B., Carvalho, L.B., Jr., Bezerra, R.S., 2009a. Fish Processing Waste as A Source of Alkaline Proteases for Laundry Detergent. *Food Chemistry*, 112, 125–130.

- Espósito, T.S., Amaral I.P.G., Marcuschi M., Carvalho, J.R., Bezerra R.S., 2009b. Surfactants and Oxidants-Resistant-Alkaline Proteases from Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Processing Waste. *Journal of Food Biochemistry* 33, 821-834.
- Estrada, A., Li, B., Laarveld, B., 1998. Adjuvant Action of *Chenopodium quinoa* Saponins on the Induction of Antibody Responses to Intragastric and Intranasal Administered Antigens In Mice. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 21, 225–236.
- Fadıloğlu, S., Erkmén, O., 2004. Gıda Sanayinde Enzimlerin Önemi. *Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Yayınlar Kataloğu*, 1-16.
- Fantal, A.G., 1996. Reactive Oxygen Species in Developmental Toxicity: Review and Hypothesis. *Teratology*, 53, 96-217.
- Fenwick, D.E., Oakenfull, D., 1983. Saponin Content of Food Plants and Someprepared Foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34, 186-191.
- Fidan, A.F., Dündar, Y. 2007. *Yucca Schidigera* ve içerdği Saponinler ile Fenolik Bileşiklerinin, Hipokolesterolemik Ve Antioksidan Etkileri. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 47,2, 31–39.
- Fiechter, A. 1992. Biosurfactants: Moving Towards Industrial Application. *Trends in Biotechnology*, 10(6), 208-217.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, P.S.H., Becker, K., 2002. The Biological Action of Saponins in Animal Systems: A Review. *British Journal of Nutrition*, 88, 587- 605.
- Fukuda, N., Tanaka, H., Shoyama, Y., 2000. Isolation of The Pharmacologically Active Saponin Ginsenoside Rb1 From Ginseng by Immunoaffinity Column Chromatography. *Journal of Natural Products*, 63, 283–285.
- Gaidi, G., Miyamoto, T., Ramezani, M., Lacaille-Dubois, M.A., 2004. Glandulosides A-D, triterpene saponins from *Acanthophyllum glandulosum*. *Journal of Natural Products*, 67, 1114-1118.
- Garcia de Fernando, G.D., Hernandez, P.E., Burgos, J., Sanz, B.,Ordonez, J.A., 1991. Extracellular Proteinase From *Enterococcus faecalis* subsp. Liquefaciens I. Growth and Extracellular Proteinase Production Under Different Culture Conditions. *Folia Microbiologica (Praha)*, 36(5), 423-428.
- Gençkal, H., Tari, C., 2006. Alkaline Protease Production From Alkalophilic *Bacillus* sp. Isolated from Natural Habitats. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 703-710.
- Gerze, A., Omay, D., Güvenilir, Y., 2005. Partial purification and Characterization of Protease Enzyme from *Bacillus subtilis megatherium*. *Applied Biochemistry and Biotechnolog*, 121-124, 335-345.
- Ghagi, R., Satpute, S.K., Chopade, B.A., Banpurkar, A.G., 2011. Study of Functional Properties of *Sapindus mukorossi* As A Potential Bio-Surfactant. *Indian Journal of Science and Technology*, 4(5), 530-533.

- Gouda, M.K., 2006. Optimization and purification of alkaline proteases produced by Marine *Bacillus* sp. MIG newly Isolated from Eastern Harbour of Alexandria. Polish Journal of Microbiology, 55, 119-126.
- Gökpınar, G., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y., 2006. Algal Antioksidanlar. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 23, 85-89.
- Gulati, R., Isar J., Kumar V., Prasad A.K., Parmar V.S., Saxena R.K., 2005. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. Journal Pure and Applied Chemistry, 77(1), 251–262.
- Gupta, R., Gupta, K., Saxena, R.K., Khan, S., 1999. Bleach-Stable, Alkaline Protease From *Bacillus* Sp. Biotechnology Letters, 21, 135–138.
- Gupta, R., Beg, Q.K, Khan, S., Chauhan, B., 2002a. An Overview on Fermentation, Downstream Processing and Properties of Microbial Alkaline Proteases. Applied Microbiology and Biotechnology, 60, 381–395.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P., 2002b. Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 59, 15-32.
- Gupta, A., Roy, I., Patel, R.K., Singh, S.P., Khare, S.K., Gupta, M.N., 2005. One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp. Journal of Chromatography A, 1075 (2005) 103–108.
- Gupta, A., Khare, S.K., 2007. Enhanced Production and Characterization of A Solvent Stable Protease From Solvent Tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. Enzyme and Microbial Technology, 42(1), 11-16.
- Güçlü, K., Altun, M., Özyurek, M., Karademir, S.E., Apak, R., 2006. Antioxidant Capacity of Fresh, Sun- and Sulfited-Dried Malatya Apricot (*Prunus Armeniaca*) Assayed by CUPRAC, ABTS/TEAC and Folin Methods. International Journal of Food Science and Technology 41: 76-85
- Güçlü-Üstündağ, Ö., Mazza, G., 2007. Saponins: Properties, Applications and Processing. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 47, 3, 231-258.
- Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R. 2004. Antioxidant Activity Of Saponins Isolated From Ivy: A-Hederin, Hederasaponin-C, Hederacolchiside-E and Hederacolchiside F. Planta Medica, 70, 561–563.
- Güle, H., Aksoy, A., Macit, E., Aydın, A., Yıldız, O., Topal, T., Erarslan, G., Sayal, A., 2009. *Gypsophila* L.–Containing Diet Reduces Glutathione Peroxidase Activity in Balb/C Mice. Society Of Toxicologic Pathology's 27th Annual Symposium Presentations, Toxicol Pathol, 37, 137.
- Haddar, A., Bougatef, A., Agrebi, R., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M., 2009. A novel Surfactant-Stable Alkaline Serine-Protease from A Newly Isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and Characterization. Process Biochemistry, 44, 29–35
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989. Free Radicals in Biology and Medicine, 2nd Ed., Clarendon Press, 543p., Oxford.

- Halliwell, B., Aruoma, O., 1991. DNA Damage by Oxygen-Derived Species: Its Mechanisms and Measurement in Mammalian Systems. *FEBS Letters*, 281, 9-19.
- Harris, E.D., 1992, Regulation of Antioxidant Enzymes. *FASEB Journal*, 6, 2675-2683.
- Heisler, I., Sutherland, M., Bachran, C., Hebestreit, P., Schnitger, A., Melzig, M.F., 2005. Combined Application of Saponin and Chimeric Toxins Drastically Enhances The Targeted Cytotoxicity On Tumor Cells. *Journal of Controlled Release* 106, 123–137.
- Helal, R., Melzig, M.F., 2011. In vitro Effects of Selected Saponins on the Production and Release of Lysozyme Activity of Human Monocytic and Epithelial Cell Lines. *Sci Pharm*. 2011; 79: 337–349.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., 1992. Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of 28 Vegetables and 9 Fruits Commonly Consumed In The Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 2379-2383.
- Hinman, R.L., 1994. The Changing Face Of The Fermentation Industry. *Chemical Technology*, 24(6), 45–48.
- Hindhumathi, M., Vijayalakshmi, S., Thankamani, V., 2011. Optimization and Cultural Characterization of Alkalophilic Protease producing *Bacillus* sp. GPA4. *Research in Biotechnology*, 2(4), 13-19.
- Hoagland, R.E., Zablotowicz, R.M., Reddy, K.N., 1996. Saponins Used in Food and Agriculture. *Studies of The Phytotoxicity of Saponins on Weed and Crop Plants*, (Waller G.R., Yamasaki K., -eds). Plenum Press, New York.
- Hood, E.E., 2002. From Green Plants to Industrial Enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 279-283.
- Horikoshi, K., 1999. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), 735-750.
- Hostettmann, K., Marston, A., 2005. Saponins. *Chemistry and Pharmacology of Natural Products*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hu, J., Reddy, M. B., Hendrich, S., and Murphy, P. A. 2004. Soyasaponin I and Sapongenol B Have Limited Absorption by caco-2 Intestinal Cells and Limited Bioavailability in Women. *Journal Nutrient*, 134, 1867–1873.
- Huang, Q., Peng, Y., Li, X., Wang, H., Zhang, Y., 2003. Purification and Characterization of An Alkaline Serine Protease From Dehairing Function From *Bacillus pumilus*. *Current Microbiology*, 46, 169–173.
- Huang, G., Ying, T., Huo, P., Jiang, J., 2006. Purification and Characterization Of A Protease From Thermophilic *Bacillus* strain HS08. *African Journal of Biotechnology*, 5(24), 2433-2438.

- Huong, N.T.T., Matsumoto, K., Kasai, R., Yamasaki, K., Watanabe, H., 1998. In Vitro Antioxidant Activity Of Vietnamese Ginseng Saponin and Its Components. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21, 978–981.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., Vivanco, J.M., 2003. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Iranian *Ocimum* Accessions. *Food Chemistry*, 83, 547-550.
- Jellouli, K., Bougatef, A., Manni, L., Agrebi, R., Siala, R., Younes, I., 2009. Moncef Nasrimolecular and Biochemical Characterization Of An Extracellular Serine-Protease from *Vibrio metschnikovii* J1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 939–948.
- Johnvesly, B., Naik, G.R., 2001. Studies On Production Of Thermostable Alkaline Protease From Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus* Sp. JB-99 In A Chemically Defined Medium. *Process Biochemistry*, 37, 139–144.
- Joo, H.S., Kumar, C.G., Park, G.C., Paik, S.R., Chang, C.S., 2002. Optimization Of The Production Of An Extracellular Alkaline Protease From *Bacillus horikoshii*. *Process Biochemistry* 38, 155–159.
- Joo, H.S., Kumar, C.G., Park, G.C., Paik, S.R., Chang, C.S., 2003. Oxidant and Sds-Stable Alkaline Protease From *Bacillus clausii* I-52: Production and Some Properties. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 267–272.
- Joo, H.S., Kumar, C.G., Park, G.C., Paik, S.R., Chang, C.S., 2004. Bleach-Resistant Alkaline Protease Produced by a *Bacillus* sp. Isolated from the Korean Polychaete, *Periserrula leucophryna*. *Process Biochemistry*, 39, 1441-1447.
- Joo, H.S., Chang, C.S., 2005. Oxidant and SDS-Stable Alkaline Protease From a Halo-Tolerant *Bacillus clausii* I-52: Enhanced Production and Simple Purification. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 491-497.
- Jun, H.S., Kim, S.E., Sung, M.K., 2002. Protective Effect of Soybean Saponins and Major Antioxidants Against Aflatoxin B1-induced Mutagenicity and DNA-Adduct Formation. *Journal of Medicinal Food*, 5(4), 235-40.
- Kalkan, S., Halkman, K., 2006. *Bacillus cereus* ve İçme Sütünde Oluşturduğu Sorunlar. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 4(1), 1-11.
- Kamande, G.M., Baah, J., Cheng, K.J., McAllister, T.A., Shelford, J.A., 2000. Effects of Tween 60 and Tween 80 on Protease Activity, Thiol Group Reactivity, Protein Adsorption, and Cellulose Degradation by Rumen Microbial Enzymes. *Journal Of Dairy Science*, 83, 536–542.
- Kang, J.H., Cho, Y.D., 1985. Effect of Ginseng Saponin Fraction on Cleavage of pBR322 by Several Restriction Endonuclease. *Korcan Journal Ginseng Sci.*, 9 (2), 240-241.
- Karsa, D.R., Houston, J., 2006. Chapter 1: What are Surfactants, In: *Chemistry and Technology of Surfactants*, (Farn, R.J., -Ed.), pp. 1-23, Blackwell Publishing Ltd., pp. 1-23, , Oxford.
- Kato, T., Yamagata, Y., Arai, T., Ichishima, E., 1992. Purification of a New Extracellular 90-kDa Serine Proteinase with Isoelectric Point of 3.9 From

- Bacillus subtilis* (natto) and Elucidation of Its Distinct Mode of Action. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 56, 1166–1168.
- Kaur, S., Vohra, R.M., Kapoor, M., Beg, Q.K., Hoondal, G.S., 2001. Enhanced Production and Characterization of A Highly Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus* sp. P-2. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 17 (2), 125-129.
- Kazan, D., Denizci, A.A., Oner, M.N.K., Erarslan, A., 2005. Purification and Characterization Of A Serine Alkaline Protease From *Bacillus clausii* GMBAE 42. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 32, 335–344.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, O.I., 2007. Biyokimya, (5. Baskı), Aktif Yayınevi, 643s, İstanbul.
- Kerimak-Öner, M.N., 2008. Zorunlu Alkalifilik *Bacillus marmariensis* GMBE 72 Soyundan İzole Edilen Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 253 s. Kocaeli.
- Keskin, H., Erkmén, G., 1987, Besin Kimyası. Güryay Matbaacılık, 5. Basım, İstanbul.
- Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, J.M., 2000. Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. Cancer Letters, 150, 41–48.
- Khalil, A.B., Anfoka, G.H., Bdour, S., 2003. Isolation of Plasmids Present In Thermophilic Strains From Hot Springs In Jordan. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 19, 239-241.
- Kim, W., Choi, K., Kim, Y., Park, H., Chol, J., Lee, Y., Oh, H., Kwon, I., Lee, S., 1996. Purification and Characterization of A Fibrinolytic Enzyme Produced From *Bacillus* sp. Strain CK 11-4 Screened From Chungkook-Jangs. Applied and Environmental Microbiology, 62, 2482–2488.
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., 2002. Industrial Enzyme Applications. Current Opinion in Biotechnology, 13, 345-351.
- Kılınç, K., Kılınç, A., 2002, Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi, 33(2), 110-118.
- Kocaoğlu Güçlü, B., Uyanık, F., 2004. Saponinler ve Biyolojik Önemi. Erciyes Üniv Veteriner Fakültesi Dergisi, 1(2), 125-131.
- Kole, M.M., Draper, I., Gerson, D.F., 1988. Production Of Protease By *Bacillus subtilis* Using Simultaneous Control Of Glucose and Ammonium Concentrations. Journal Of Chemical Technology and Biotechnology, 41, 197–206.
- Korkmaz, M., 2007. Türkiye 'de Yetişen Tek Yıllık *Gypsophila L.* (*Caryophyllaceae*) Taksonları Üzerinde Biyosistematik Çalışmalar. SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 260s, Isparta.

- Krinsky, N.I., 1992. Mechanism Of Action Of Biological Antioxidants. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 200(2), 248-254.
- Kumar, C.G., Takagi, H., 1999. Microbial Alkaline Proteases: From A Bioindustrial Viewpoint. Biotechnology Advances, 17, 561-594.
- Kumar, C.G., 2002. Purification and Characterization of A Thermostable Alkalineprotease From Alkalophilic *Bacillus pumilus*. Letters in Applied Microbiology, 34 (1), 13-17.
- Kumar, D., Bhalla, T.C., 2004. *Bacillus* sp. APR.4 protease as laundry additive. Indian Journal of Biotechnology, 3, 563-567.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage Of Structural Proteins During In Assembly of The Head Of Bacteriophage T4. Nature, 227, 680-683.
- Langmaier, F., Mladek, M., Kolomaznik K., Sukop, S., 2002. Isolation of Elastin and Collagen Polypeptides From Long Cattle Tendons As Raw Material for the Cosmetic Industry. International Journal Of Cosmetic Science, 24(5), 273-9.
- Lásztity, R., Hidvégi, M., Bata, A., 1998. Saponins in Food. Food Reviews International , 14(4), 371-390.
- Lee, S.W., Lee, J.S., Kim, Y.H., Jin, K.D., 1986. Effect of Ginseng Saponin on the Na^+ , K^+ -ATPase of Dog Cardiac Sarcolemma. Archives of Pharmacal Research, 9(1), 29-38.
- Lee, J.K., Kim, Y.O., Kim, H.K., Park, S.Y., Oh, T.K., 1996. Purification and Characterization of A Thermostable Alkaline Protease from *Thermoactinomyces* sp. E79 and The DNA Sequence of The Encoding Gene. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 60(5), 840–846
- Lee, J.H., Jeon, J.K., Kim, S.G., Kim, S.H., Chun, T., Imm, J.Y., 2011. Comparative analyses of total phenols, flavonoids, saponins and antioxidant activity in yellow soy beans and mung beans. International Journal of Food Science and Technology, 46, 2513–2519.
- Li, Y., Du, Y., Zou, C., 2009. Effects of pH on Antioxidant and Antimicrobial Properties of Tea Saponins. European Food Research and Technology, 228, 1023–1028.
- Li, G.Y., Cai, Y.J., Liao, X.R., Yin, J., 2011. A Novel Nonionic Surfactant- and Solvent-Stable Alkaline Serine Protease From *Serratia* sp. SYBC H with Duckweed as Nitrogen Source: Production, Purification, Characteristics and Application. Journal Of Industrial Microbiology and Biotechnology, 38, 845–853.
- Liu, J., Henkel, T., 2002. Traditional Chinese Medicine (TCM): Are Polyphenols and Saponins The Key Ingredients Triggering Biological Activities? Current Medicinal Chemistry, 9, 1483–1485.
- Loperena, L., Ferrari, M.D., Belobrajdic, L., Weyrauch, R., Varela, H., 1994. Study of *Bacillus* sp. Culture Conditions to Promote Production of Unhairing Proteases. Revista Argentina de Microbiología, 26, 105-115.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Malinow, M.R., McNulty, W.P., McLaughlin, P., Stafford, C., Burns, A.K., Livingston, A.L., Kohler, G.O., 1981. The toxicity of Alfalfa Saponins In Rats. *Food and Cosmetics Toxicology*, 19 (4), 443–445.
- Maier, R.M., 2003. Biosurfactant: Evolution and Diversity in Bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, 52, 101–121.
- Man, S., Gao, W., Zhang, Y., Huang, L., Liu, C., 2010. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia*, 81(7), 703–714.
- Marker, R. E., Wagner, R. B., Ulshafer, P. R., Wittbecker, G. P. J., Ruof, C. H., 1947. Steroidal sapogenins. *Journal of the American Chemical Society*, 69, 2167–2230.
- Mei, C.F., Jiang, X.L., 2005. A Novel Surfactant- and Oxidation-Stable Alkaline Protease from *Vibrio metschnikovii* DL 33–51. *Process Biochemistry*, 40, 2167–2172.
- Moreira, K.A., Albuquerque, B.F., Teixeira, M.F.S., Porto, A.L.F., Lima, F.J.L., 2002. Application of Protease from *Nocardiopsis* sp. As A Laundry Detergent Additive. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 309-315.
- Mohd, M.K., Jameel, A., 2011. Production and Characterization of alkaline protease from locally isolated alkaliphilic *Bacillus* species. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 3(6), 4596-4603.
- Moradian, F., Khajeh, K., Naderi-Manesh, H., Ahmadvand, R., Sajedi, R.H., Sadeghizadeh, M., 2011. Thiol-Dependent Serine Alkaline Proteases From *Bacillus* sp. HR-08 and KR-8102 Isolation, Production, and Characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 134, 77-87.
- Mukhtar, H., Ul-Haq, I., 2008. Production of alkaline protease by *Bacillus subtilis* and its application as a depilating agent in leather processing. *Pakistan Journal of Botany*, 40(4), 1673-1679.
- Naidu, K.S.B., Devi, K.L., 2005, Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. *African Journal of Biotechnology*, 4(7), 724-726.
- Nascimento, W. C.A.do, Martins, M.L.L., 2006. Studies on the stability of protease from *Bacillus* sp. and its compatibility with commercial detergent. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37. 307-311.
- Nilegaonkar, S.S., Zambare, V.P., Kanekar, P.P., Dhakephalkar, P.K., Sarnaik S.S., 2007. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresource Technology*, 98, 1238–1245.
- Oakenfull, D., Sidhu, G.S., 1990. Could Saponins Be A Useful Treatment For Hypercholesterolaemia? *European Journal of Clinical Nutrition*, 44, 79–88.
- Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., Saxena, R.K., Gupta, R., 2001. Characterization and Wash Performance Analysis of an SDS-Stable Alkaline Protease From a *Bacillus* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 17, 493-497.

- Oleszek, W.A., 2002. Chromatographic Determination of Plant Saponins. *Journal of Chromatography A*, 967 (1), 147–162.
- Oleszek, W., Bialy Z., 2006. Chromatographic Determination of Plant Saponins-An Update (2002-2005). *Journal of Chromatography A*, 1112 (1-2), 78–91
- Oleszek, W., Hamed, A., 2010. Saponin-Based Surfactants, in *Surfactants from Renewable Resources*. (Kjellin, M., Johansson, I.,-eds), John Wiley & Sons Ltd, pp. 239-248, Chichester, UK.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E., 2002. *İnsan Biyokimyası*, Palme Yayıncılık, 813s, Ankara.
- Orhan, E., Omay, D., Güvenilir, Y., 2005. Partial Purification and Characterization of Protease Enzyme from *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124,183-194.
- Osborn, A.E., 2003. Molecules of Interest, Saponins in Cereals. *Phytochemistry*, 62, 1–4.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on Products of Browning Reaction: Antioxidative Activity of Products of Browning reaction. *Japanese Journal of Nutrition*, 40, 307–315.
- Özçelik, H., Özgökçe, F., 1996. Taxonomic Contributions to Genus *Gypsophila* L. (*Caryophyllaceae*) from East Anatolia (Turkey). IV. Plant Life of South West Asia Symp., İzmir/ Türkiye.
- Özçelik, H., Muca, B., 2010. *Ankyropetalum* Fenzl (*Caryophyllaceae*) Cinsine Ait Türlerin Türkiye’deki Yayılışı ve Habitat Özellikleri. *BİBAD–Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 3 (2), 47–56.
- Özçelik, H., Yıldırım, B., 2011. Türkiye Çövenlerinin (*Gypsophila* L. ve *Ankyropetalum* Fenzl spp.) Ekonomik Önemi, Kullanım Olanakları ve Korunması Üzerine Düşünceler. *SDÜ Orman Fakültesi Dergisi (SDU Faculty of Forestry Journal)*, 12, 57-61.
- Özdemir-Şimsek, F., 2011. *Gypsophila* (*Gypsophila Arrostii* var. *Nebulosa*) bikisinin Kimyasal ve Biyokimyasal Özellikleri. Suleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilimdalı, Yüksek Lisans Tezi, 82 s, Isparta.
- Öztaşan, N., Bülbül, A., Eryavuz, A.,Avcı, G., Küçükkurt, İ., Fidan, A.F., 2008. Effect of *Yucca schidigera* extract on blood pressure, antioxidant activity and some blood parameters in the L-name-induced hypertensive rats. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 55, 149-153.
- Price, K.R., Johnson, I.T., Fenwick, G.R., 1987. The Chemistry and Biological Significance of Saponins in Foods and Feedingstuffs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 26, 27-135.
- Polaina, J., Maccabe, A.P., 2007. *Industrial Enzymes: Structure, Function And Application*. Springer-Verlag, pp. 747 -842, Berlin.
- Polgar, L., 1990. Common Feature Of The Four Types Of Protease Mechanisms. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 371, 327–331.

- Poslu, H., 2006. *Gypsophila Eriocalyx* Boiss'den Saponin Ekstraksiyonu ve Kimyasal Yapısının Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 73s, Ankara.
- Potter, S.M., Jimenez-Flores, R., Pollack, J., Lone, T.A., Berber-Jimenez, M.D. 1993. Protein-Saponin Interaction and Its Influence on Blood Lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1287–1291.
- Puri, S., Beg, Q.K., Gupta, R., 2002. Optimization of Alkaline Protease Production from *Bacillus* sp. by Response Surface Methodology. *Current Microbiology*, 44, 286–290.
- Rajkumar, R., Jayappriyan, K.R., Rengasamy R., 2011. Purification and Characterization Of A Protease Produced by *Bacillus megaterium* RRM2: Application In Detergent And Dehairing Industries. *Journal of Basic Microbiology* 2011, 51, 614–624.
- Rajput, R., Sharma, R., Gupta, R., 2010. Biochemical Characterization of a Thiol-Activated, Oxidation Stable Keratinase from *Bacillus pumilus* KS12. *Enzyme Research*, Article ID 132148, 7 pages.
- Rao, A.V., Sung, M.G, 1995. Saponins As Anticarcinogens. *The Journal of Nutrition*, 125, 717-724.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects Of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 597-635.
- Rhiouani, H., Settaf, A., Lyoussi, B., Cherrah, Y., Lacaille-Dubois, M.A., Hassar, M., 1999. Effects of saponins from *Herniaria glabra* on blood pressure and renal function in spontaneously hypertensive rats. *Therapie*, 54, 735-739.
- Robbins, R.J., 2003. Phenolic Acids In Foods: An Overview Of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 51, 2866-2887.
- Rodrigues, H.G., Diniz, Y.S., Faine, L.A., Galhardi, C.M., Burneiko, R.C., Almeida, J.A., Ribas, B.O., Novelli, E.L., 2005. Antioxidant Effect Of Saponin: Potential Action Of A Soybean Flavonoid On Glucose Tolerance And Risk Factors For Atherosclerosis. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(2), 79-85.
- Ryan, D., Robards, K., 1998. Phenolic Compounds in Olives. *Analyst*, 123(5), 31-44.
- Salleh, A.S., Zaliha, R.J., Rahman, R.A., Basri, M., 2006. New Lipases and Proteases. Nova Science Publishers, Inc., pp. 77-95, NewYork.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., 1998. A Procedure To Measure The Antiradical Efficiency Of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270–276.
- San Martin, R., Briones R., 1999. Industrial Uses And Sustainable Supply Of *Quillaja saponaria* (Rosaceae) Saponins. *Economic Botany*, 53, 302-311.

- Sangeetha, R., Geetha, A., Arulpandi, I., 2008. Optimization Of Protease and Lipase Production by *Bacillus pumilus* SG 2 Isolated From An Industrial Effluent. The Internet Journal of Microbiology, 5, 2.
- Sareen, R., Mishra, P., 2008. Purification and Characterization Of Organic Solvent Stable Protease From *Bacillus licheniformis* RSP-09-37. Applied Microbiology and Biotechnology, 79(3): 399-405.
- Sarvas, M., Harwood, C.R., Bron, S., van Dijl, J.M., 2004. Posttranslational folding of secretory protein in gram-positive bacteria. Biochimica Biophysica Acta, 1694, 311–327.
- Saxena, R.K., Davidson, W.S., Sheoran, A., Giri, B., 2003. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. Process Biochemistry, 39 (2), 239–247.
- Sen S., Satyanarayana, T., 1993. Optimization Of Alkaline Protease Production By Thermophilic *Bacillus licheniformis* S-40. Indian Journal of Microbiology, 33, 43-47.
- Serteser, A., Kargıoğlu M., Gök V., Bağcı Y., Özcan M., Arslan D., 2009. Antioxidant Properties Of Some Plants Growing Wild in Turkey. Grasas Y Aceites, 60 (2), 147-154.
- Sezik, E., Yeşilada, E., Akdemir, Z., Berkman, Z., Demirezer, Ö., Zor, M., 1986. Türkiye'de Yetişen Triterpenik Saponozit Taşıyan Bitkilerin Değerlendirilmesi. VI. Bitkisel İlaç Hammadeleri Toplantısı Bildiri Kitabı, 93-98.
- Shafee, N., Aris, S.N., Rahman, R.N.Z.A., Basri, M., Salleh, A.B., 2005. Optimization Of Environmental and Nutritional Conditions For The Production Of Alkaline Protease By A Newly Isolated Bacterium *Bacillus cereus* Strain 146. Journal of Applied Sciences Research, 1(1), 1-8.
- Shaheen, M., Aamer, A.S., Abdul, H., Fariha H., 2008. Influence Of Culture Conditions On Production and Activity Of Protease From *Bacillus subtilis*. Pakistan Journal of Botany, 40(5), 2161-2169.
- Simões, C.M.O., Amoros, M., Girre, L., 1999. Mechanism of Antiviral Activity Of Triterpenoid Saponins. Phytotherapy Research 13, 323–328.
- Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C., 2001a. Serine Alkaline Protease From A Newly Isolated *Bacillus sp.* SSR1. Process Biochemistry, 36, 781–785.
- Singh, J., Vohra, R.M., Sahoo, D.K., 2001b. Purification and Characterization of Two Extracellular Alkaline Protease From A Newly Isolated Obligate Alkalophilic *Bacillus sphaericus*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 26, 387-393.
- Singleton, V., Orthofer, R., Lamuela-Ravento's, R., 1999. Analysis Of Total Phenols And Other Oxidation Substrates And Antioxidants By Means Of Folin-Ciocalteu Reagent. In L. Packer (Ed.). Oxidants And Antioxidants, Part A, Methods In Enzymology, Academic Press, pp. 152–178, New York.
- Sparg, S.G., Light, M.E., van Staden, J., 2004. Biological Activities and Distribution Of Plant Saponins. Journal of Ethnopharmacology, 94, 219–243.

- Soetan, K.O., Oyekunle, M.A., Aiyelaagbe, O.O., Fafunso, M.A., 2006. Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum Bicolor* L. Moench. African Journal of Biotechnology, 5 (23), 2405-2407.
- Son, I.S., Kim, J.H., Sohn, H.Y., Son, K.H., Kim, J.S., Kwon, C.S., 2007. Antioxidative and Hypolipidemic Effects of Diosgenin, a Steroidal Saponin of Yam (*Dioscorea* Spp.), on High-Cholesterol Fed Rats. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 71, 3063-3071.
- Srividya, S., Mala, M., 2011. Influence of process parameters on the production of detergent compatible alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. Y. Turk Journal of Biology 35, 177-182.
- Sroka, Z., Jurzysta, M., Tylcz, J., Rzadkowska-Bodalska, H., 1997. Stimulation Of Pancreatic Lipase Activity By Saponins Isolated From *Medicago sativa* L.. Zeitschrift Fur Naturforschung C., 52(3-4), 235-239.
- Stochmal, A., Oleszek, W., Kapusta, I., 2008. 20. Chapter, TLC of Triterpenes. In Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. CRC Press, E-book ISBN:978-1-4200-4678-6.
- Sung, M.K., Kendall, C.W., Rao, A.V., 1995. Effect of soybean saponins and gypsophila saponin on morphology of colon carcinoma cells in culture. Food and Chemical Toxicology, 33(5), 357-66.
- Tanaka, M., Fang-I, L., Ishizaki, S., Taguchi, T. 1995. Interaction of Saponins With Salt Soluble Proteins From Walleye Pollack Meat. Fisheries Science, 61, 373-374.
- Telefoncu, A., 1996. Protein Saflaştırma ve Karakterizasyonu, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Çeşme İzmir-Türkiye, 272s.
- Temizkan, G., Yılmaz, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Topal Sarıkaya, A., Arda, N., 2008 Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, (Temizkan, G., Arda, N., -eds), 3. Baskı, Nobel Yayınevi, 345s, İstanbul.
- Tepe, B., Daferera, B., Tepe, A., Polissiou, M., Sokmen, A., 2007. Antioxidant Activity Of The Essential Oil And Various Extracts Of *Nepeta Flavida* Hub.-Mor. From Turkey. Food Chemistry, 103, 1358-1364.
- Thangam, E.B., Rajkumar, G.S., 2002. Purification and Characterization Of An Alkaline Protease From *Alcaligenes faecalis*. Biotechnology Applied Biochemistry, 35, 149-154.
- Traore, F., Faure, R., Olivier, E., Gasquet, M., Azas, N., Debrauwer, L., Keita, A., Timon-David, P., Balansard, G., 2000. Structure and antiprotozoal activity of triterpenoid saponins from *Glinus oppositifolius*. Planta Medica, 66, 368-371.
- Ulusoy, E., Kolayli S, Sarıkaya AO, 2010. Antioxidant and antimicrobial activity of different floral origin honeys from Türkiye. Journal of Food Biochemistry 34: 321-335.
- Urum, K., Pekdemir, T., 2004. Evaluation of Biosurfactant for Crude Oil Contaminated Soil Washing. Chemosphere, 57(9), 1139-1150.

- Uyar, F., Porsuk, İ., Kızıllı, G., İnce Yılmaz, E., 2011. Optimal conditions for production of extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* strain CA15. Eur. Asian Journal of BioSciences, 5, 1-9.
- Varela, H., Ferrari, M.D., Belobrajdic, L., Weyrauch, R., Loperena, L., 1996. Effect Of Medium Composition On The Production By A New *Bacillus Subtilis* Isolate Of Protease With Promising Unhairing Activity. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 12, 643-645
- Ward, W.W., Swiatek, G., 2009. Protein Purification. Current Analytical Chemistry, 5(2), 1-21.
- Westermeyer, R., 2001. Electrophoresis in Practice, 3rd edn. Wiley, pp. 145-150, New York.
- Whitford, D., 2005. Proteins, Structure and Function. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 188-245, England.
- Williams, F.N., 1989. Revision of the forms of the Genus *Gypsophila* L., Jown Bot. Lond., 27, 321- 329.
- Wollgast, J., Anklam, E., 2000. Review on Polyphenols in Theobroma Cacao: Changes in Composition During the Manufacture of Chocolate and Methodology for Identification and Quantification. Food Research International, 33, 423-447.
- Xi, M., Hai, C., Tang, H., Chen, M., Fang, K., Liang, X., 2008. Antioxidant and Antiglycation Properties of Total Saponins Extracted from Traditional Chinese Medicine Used to Treat Diabetes Mellitus. Phytotherapy Research, 22, 228–237.
- Xu, F.Q., Zhong, H.M., Liu, H.Y., Liu, H.Q., Chen, C.X., 2007. Steroidal Saponins From *Lysimachia Paridiformis*. Journal of Asian Natural Products Research, 9(6-8), 493-497.
- Yan, L.L., Zhang, Y.J., Gao, W.Y., Man, S.L., Wang, Y., 2009. *In vitro* and *In vivo* anticancer activity of steroid saponins of *Paris polyphylla* Var. *Yunnanensis*. Experimental Oncology, 31, 27–32.
- Yandri, A.S., Suhartati, T., Hadi, S., Herasari, D., 2008. The Chemical Modification of Protease Enzyme Isolated From Local Bacteria Isolate, *Bacillus Subtilis* ITBCCB148 with Cyanuric Chloride-Polyethylenglycol. European Journal of Scientific Research, 23, 77-186.
- Yanishlieva-Maslarova, N.V., 2001. Sources of Natural Antioxidants: Vegetables, Fruits, Herbs, Spices and Teas. In: Antioxidants in Food, Practical Application. (Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon M., -eds.), , CRC Press, 380s, Boca Raton.
- Yang, J.K., Shih, I.L., Tzeng, Y.M., Wang, S.L., 2000. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinise crustacean wastes. Enzyme and Microbial Technology, 26, 406-413.
- Yıldırım, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A.A., Algur, Ö.F., Bilaloğlu, V., 2000. Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tilia (*Tilia argentea* Desf ex DC), Sage (*Salvia triloba* L.), and Black Tea (*Camellia*

- sinensis*) Extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 5030-5034.
- Yoshiki, Y., Okubo, K., 1995. Active oxygen scavenging activity of DDMP (2,3-dihydro-2, 5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one) saponin in soybean seed. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 59, 1556-1557.
- Yossan, S., Reungsang, A., Yasuda, M., 2006. Purification and Characterization of Alkaline Protease From *Bacillus megaterium* Isolated From Thai Fish Sauce Fermentation Process. ScienceAsia, 32, 377-383.
- Young, I.S., Woodside, J.V., 2001. Antioxidants in Health and Disease. Journal of Clinical Pathology, 54, 176-186.
- Yücekutlu, A.N., Bildacı, I., 2008. Determination of Plant Saponins and Some of *Gypsophila* Species: A review of the literature. Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 36 (2), 129-135
- Yücel, E.S., 2002. Taze Sıkılmış ve Ticari Domates ve Portakal Sularının Antioksidan Aktivitelerinin Saptanması ve Toplam Fenolik Madde Ve Askorbik Asit İçeriklerinin Antioksidan Aktivitelerine Olan Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, 59s, Ankara.
- Zambare, V.P., Nilegaonkar, S.S., Kanekar, P.P., 2007. Production Of An Alkaline Protease By *Bacillus cereus* MCM B-326 and Its Application As A Dehairing Agent. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23(11), 1569–1574.
- Zheng, W., Wang, S.Y., 2001., Antioxidant Activity And Phenolic Compounds In Selected Herbs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(11), 5165-5170.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Sercan ÖZBEK YAZICI

Doğum Yeri ve Yılı: Isparta/ 20.11.1975

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Isparta Sağlık Meslek Lisesi, 1995.

Lisans: Atatürk Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu, 2000.

Yüksek Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, 2004.

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, 2000-2006.

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, 2006-Devam ediyor.

Yayınları

- 1- Sercan Ozbek Yazıcı, İsmail Ozmen, Umut Celikoglu, Hasan Ozcelik, Hasan Genç, 2012. In vitro Antioxidant Activities of Extracts From Some Nepeta Species International Journal of Health and Nutrition, Vol 3, No 1.
- 2- Sercan Özbek Yazıcı, Fevziye Özdemir, İsmail Ozmen, Tülay İleri Büyükoğlu, Şevkinaz Konak1, Hasan Özçelik, Hasan Genç. Extracts Obtained from *Nepeta italica* L. and *Nepeta cilicia* Boiss. Apud Bentham on Antioxidant Enzymes Hacettepe J. Biol. & Chem., 2012, 40 (2), 149–154.
- 3- Sercan Ozbek, Fevziye Ozdemir, Şevkinaz Konak, , İsmail Ozmen, Tülay İleri-Buyukoglu, Hasan Genc, 2010. “The Effects of the Extracts Obtained from *Nepeta Cilicica* Boiss. on the Antioxidant Enzymes”, 3rd International Congrress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, 2, (1), pp.72-73.

- 4- Sercan Ozbek, Fevziye Ozdemir, Şevkinaz Konak, , İsmail Ozmen, Tülay Ileri-Buyukoglu, Hasan Genc, 2010. "The Effects of Extacts Obtained from *Nepeta italica* L. Species on the Antioxidant Enzymes." 3rd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. Cell Membranes and Free Radical Research Vol. 2, No.1, Isparta, Türkiye, pp.71.
- 5- Sercan Özbek Yazıcı, İsmail Özmen, Umut Çelikoğlu. "Effects of *Gypsophila pilulifera* Boiss. & Hausskn. Extract on Plasmid DNA" 2nd International Non-Wood Forest Products Symposium 8-10 September 2011 - Isparta/TURKEY, s 104.
- 6- Sercan Özbek Yazıcı, İsmail Ozmen, Umut Çelikoğlu, Hasan Özçelik. "Determination of Antioxidant Activity of *Gypsophila pilulifera* Boiss. & Hausskn Extract" 2nd International Non-Wood Forest Products Symposium 8-10 September 2011 - Isparta/TURKEY, s 103.
- 7- İsmail Ozmen, Umut Celikoglu, Hasan Ozcelik, Sercan Ozbek Yazıcı, "In vitro Antioxidant Activity of Extract of *Ankyropetalum reuteri* Fenzl.", 2nd International Non-Wood Forest Products Symposium 8-10 September 2011 - Isparta/TURKEY, s 102-105.
- 8- İsmail Ozmen, Umut Celikoğlu, Sercan Özbek Yazıcı, "Effects Of *Ankyropetalum reuteri* Fenzl Extract on Plasmid DNA". 2nd International Non-Wood Forest Products Symposium 8-10 September 2011 - Isparta/TURKEY, s 191-193.
- 9- İsmail Ozmen, Umut Celikoğlu, Sercan Özbek Yazıcı, Hasan Özçelik, Hasan Genç. "Antioxidant Activities of Extracts Obtained From Some *Nepeta* Species", 2nd International Non-Wood Forest Products Symposium 8-10 September 2011 - Isparta/TURKEY, s 106.
- 10- Zeynep Katırcı, Nezire İmriz, Umut Çelikoğlu, İsmail Özmen, Sercan Özbek Yazıcı, Doğal Bitkisel Yağlar ile Elde edilen Sabunların Plazmid DNA Üzerine etkilerinin İncelenmesi, I. Kozmetik Kongresi, 2011.