

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TÜRKİYE KAYNAKLI *BACILLUS* spp.'LERİN ALKALEN PROTEAZ  
ÜRETİM KAPASİTELERİ VE ENZİMLERİN KISMEN  
KARAKTERİZASYONU**

**Nilgün Tekin**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA**

**2008**

**Her hakkı saklıdır**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### TÜRKİYE KAYNAKLI *BACILLUS* spp.'LERİN ALKALEN PROTEAZ ÜRETİM KAPASİTELERİ ve ENZİMLERİN KISMEN KARAKTERİZASYONU

Nilgün TEKİN

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ

Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden izole edilen toplam 57 adet izolat içerisinde Skim Milk Agar besiyerinde proteolitik zon oluşturabilen 32 izolat içerisinde pH 9.0 veya 10.0'luk Skim Milk Agar besiyerinde gelişme göstererek zon oluşturabilen toplam 14 adet izolat ve standart olarak *Bacillus licheniformis* DSM13 seçilerek alkalen proteaz üretim yetenekleri yönünden incelenmiştir. 1 ünite alkalen proteaz aktivitesi, 30°C'de dakikada 1 µl tirozin açığa çıkması için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Enzim üretim miktarlarına göre yapılan sıralama sonucunda alkalifilik basil olduğu belirlenen Gram (+), hareketli, spor oluşturabilen, katalaz aktivitesine sahip APT5 izolatının (1555 U/ml/g), standart *B. licheniformis* DSM 13'den (1197 U/ml/g) 48 saat sonunda pH 10.0'luk glisin-NaOH tamponunda daha yüksek kapasitede alkalen proteaz aktivitesi görülmüş ve bundan sonraki enzim saflaştırması çalışmalarında alkalifilik *Bacillus* sp. APT5 izolatı kullanılmıştır. Alkalen proteaz enzimi, besiyeri üst sıvısından aseton presipitasyonu ve iyon değişim kromatografisi uygulanarak 500,1 U/mg spesifik aktivitede, 1,6 kat ve %29,5 verimle saflaştırılmıştır. SDS- ve Native-PAGE ile enzimin elektroforetik davranışı belirlenmiştir. APT5 enziminin pH 11 ve 50°C'de optimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Enzimin 50°C'deki 4 saatlik stabilitesi ve pH11.0'deki 3 günlük stabilitesi %100 olarak bulunmuştur. Mn<sup>+2</sup> divalent katyonunun enzimin aktif merkezine bağlandığı düşünülerek aktiviteyi %153 oranında arttırdığı görülmüştür. Serin proteazların bir inhibitörü olan PMSF varlığında APT5 alkalen proteazı ile subtilisin Carlsberg üreticisi *Bacillus licheniformis*'e ait standart enzimin benzer aktivite göstermesi enzimin serin proteazların subtilisinler alt grubuna dahil olabileceğini göstermiştir. Bu çalışma ile alkalifilik APT5 izolatından yeni bir alkalen proteaz enzimi saflaştırılarak karakterize edilmiş, optimum sıcaklık ve pH değerleri ile inhibitör ve metal iyonlarına karşı gösterdiği direnç nedeniyle enzimin yüksek bir yapısal stabiliteye sahip olduğu görülmüştür. Bu özellikleri ile APT5 alkalen proteazının deterjan endüstrisinde yüksek bir kullanım potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir.

Mayıs 2008, 109 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Alkalen proteaz, saflaştırma, karakterizasyon, *Bacillus* sp.

## ABSTRACT

Master Thesis

### ALKALINE PROTEASE PRODUCTION CAPACITY OF *BACILLUS* spp. ISOLATED FROM TURKEY and PARTIAL CHARACTERIZATION OF ENZYMES

Nilgün TEKİN

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Prof.Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ

Thirty two bacterial strains of 57, which produce clear proteolytic zone on Skim Milk Agar, were selected from distinct regions of Turkey. 14 out of 32 isolates could grow and showed clear zone on Skim Milk Agar with pH 9.0 and 10.0 and, thus their alkaline protease production capacities were determined by comparing with alkaline protease producer *Bacillus licheniformis* DSM13 standard strain. One unit of alkaline protease activity is defined as the amount of the enzyme needed for producing 1 µg of tyrosine per minute at 30°C. According to the alkaline protease production levels after cultivation for 48 hours, it was found that Gram (+), rod-shaped, motile, catalase (+), spor forming, alkalophilic bacterium APT5 produced higher amount of alkaline protease (1555 U/ml/g) than standart DSM 13 strain (1197 U/ml/g) when pH 10.0 Glycine-NaOH buffer was used, it is there for further purification experiments were carried on APT5 isolate. Alkaline protease enzyme was purified 1.6 fold from culture supernatant by acetone precipitation and ione-exchange chromatography with 500 U/mg specific activity and 29,5% yield. Electrophoretic mobility of enzyme was determined using SDS- and Native-PAGE. The pH and temperature optima for APT5 alkaline protease were measured as pH 11 and 50°C, respectively. Enzyme showed 100% stability at 50°C for 4 hours and at pH11.0 for 3 days. It was found that Mn divalent cation stimulated the enzyme activity with 153% ratio probably by binding the active site of the enzyme. PMSF which is a specific inhibitor for serine-proteases did not show inhibitory effect on the enzyme activity. On the other hand PMSF showed simillar effect on a standart subtilisine Carlsberg producer bacterium *Bacillus licheniformis*'s enzyme and APT5's alkaline protease. Thus this result showed that APT5 alkaline protease could be a subtilisin protease which is a subgroup of serine proteases. In this study, a new alkaline protease was purified and characterized from the alkalophilic isolate APT5, and it was demonstrated APT5 alkaline protease has a high conformational stability not only because of its optimal pH and temperature, but also its high resistance to inhibitors and metal ions tested. In conclusion, it is thought that APT5 alkaline protease has a potential for being used in detergent industry with its extreme properties.

**May 2008, 109 pages**

**Key words:** Alkaline protease, purification, characterization, *Bacillus* sp.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenim süremde bu konuda çalışma imkanı sunarak önerileri ile beni yönlendiren, önüme birçok fırsatın çıkmasını ve bunları değerlendirmemi sağlayan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ'e;

Aynı zamanda bir proje olan yüksek lisans tezimin tüm deney sürecinde yardımını aldığım ve tecrübeleriyle beni her zaman doğru şekilde yönlendiren, geç saatlere kadar süren laboratuvar çalışmalarını huzurlu ve verimli bir şekilde geçirmemi sağlayan sevgili hocam Sayın Dr. Arzu ÇÖLERİ'ye;

Her zaman her konuda büyük bir dikkatle beni dinleyip değerli yorumlarını benden esirgemeyen ve daha da önemlisi bana olan güvenini hissederek kendime olan özgüvenimi artırıp sadece bilimsel anlamda değil hayat eğitimimde büyük emeği geçen Sayın Hocam Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a;

Enzimin saflaştırılması aşamasında kolon kromatografisi deneyini gerçekleştirdiğim Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Proteom Birimi'nin kapılarını bana açarak kendi laboratuvarımızdaki gibi rahat bir şekilde çalışma olanağı sunan ve kolon kromatografisi deneylerinde beni bilgilendiren Proteom Birimi başkanı Sayın Yrd. Doç. Dr. Duygu ÖZEL DEMİRALP'e ve bu birimdeki sevgili arkadaşlarım Sayın Buket GÜLTEKİN'e, Çağrı GÜMÜŞTEKİN'e ve Meral ALTUNER'e;

Geç saatlere kadar çalışırken beni laboratuvarında yalnız bırakmayıp asla unutamayacağım yardımlarıyla beni destekleyen sevgili arkadaşım Tuğba DEMİRİZ'e, arkadaşlığı ile bana destek veren sevgili dostum Zümrüt YILMAZ'a;

Bana olan güvenlerini her zaman hissettiren, aldığım her karara saygı duyan, sonsuz bir anlayışla laboratuvarında geç saatlere dek süren çalışmalarımı destekleyen ve de her an sevgilerini hissettiğim canım annem ve babama;

Mümkün olsa bir an bile beni yalnız bırakmayacağını bildiğim ama her zaman hayatımın her anında benimle olan ikizim, canım kardeşim Recep TEKİN'e

en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Nilgün TEKİN

Ankara, Mayıs 2008

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1 Alkalifilik <i>Bacillus</i> Cinsi Bakterilerin Özellikleri.....	4
2.2 Alkalifillerin Fizyolojik Özellikleri .....	7
2.3 Proteaz Kaynakları .....	10
2.3.1 Mikrobiyal proteazlar .....	11
2.3.1.1 Bakteriyal proteazlar.....	11
2.3.1.2 Fungal proteazlar .....	12
2.3.1.3 Viral proteazlar .....	13
2.4 Proteazların Sınıflandırılması .....	13
2.4.1 Ekzopeptidazlar.....	14
2.4.1.1 Aminopeptidazlar.....	15
2.4.1.2 Karboksipeptidazlar.....	15
2.4.2 Endopeptidazlar.....	16
2.4.2.1 Serin proteazlar .....	16
2.4.2.1.1 Serin alkalen proteazlar.....	17
2.4.2.1.2 Subtilisinler .....	17
2.4.2.2 Aspartik proteazlar .....	18
2.4.2.3 Sistein/Tiol proteazlar .....	18
2.4.2.4 Metalloproteazlar.....	19
2.5 Bakteriyal Alkalen Proteazlar .....	20
2.6 Alkalen Proteaz Deneyleri .....	21
2.6.1 Alkalen proteaz varlığının belirlenmesi.....	21
2.6.2 Alkalen proteaz biyosentezinin düzenlenmesi .....	22

2.6.3 Alkalen proteazların saflaştırılmaları.....	23
2.7 Alkalen Proteazların Özellikleri .....	26
2.7.1 pH ve sıcaklık istekleri.....	27
2.7.2 Stabilize edicilerin etkisi .....	27
2.7.3 Metal iyonların ve inhibitörlerin etkisi.....	27
2.7.4 Substrat spesifikliği.....	28
2.8 Alkalen Proteazların Kullanım Alanları .....	30
2.8.1 Gıda ve besin endüstrisi.....	33
2.8.2 Peptid sentezi .....	33
2.8.3 Deri endüstrisi.....	34
2.8.4 Endüstriyel ve evsel atıkların giderilmesi.....	35
2.8.5 Fotoğraf endüstrisi.....	35
2.8.6 Medikal kullanımları.....	35
2.8.7 İpek işlenmesi .....	36
2.8.8 Deterjan endüstrisi.....	36
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	38
3.1 Kullanılan Bakteri İzolatları ve Standart Suş .....	38
3.2 Bakteri İzolasyonu ve Alkalen Proteaz Üreticisi İzolatların Belirlenmesi.....	38
3.3 Gram Boyama, Katalaz Aktivitesi ve Faz Kontrast Mikroskopik İnceleme.....	39
3.4. Fenotipik Karakterizasyon.....	39
3.5 Alkalen Proteaz Üretim Koşulları ve Hücre Dışı Enzim Elde Edilmesi .....	39
3.6 Tirozin Konsantrasyon Eğrisi.....	40
3.7 Enzim Ünitesinin Tanımı.....	40
3.8 Alkalen Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	41
3.9 Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırılması .....	41
3.10 Sıcaklık ve pH'ın Alkalen Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi .....	42
3.11 Alkalen Proteaz Enziminin Sıcaklık ve pH Stabilesinin Belirlenmesi .....	42

3.12 Metal İyonlarının Alkalen Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	43
3.13 Hidrojen Peroksidin Alkalen Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	43
3.14 İnhibitörlerin ve Sürfaktanların Alkalen Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	43
3.15 Poliakrilamid Jel Elektroforez.....	44
4. BULGULAR ve TARTIŞMA .....	45
4.1 Araştırılan Bakteri İzolatları .....	45
4.2 Proteaz Aktivitesine Sahip Bakteri İzolatları .....	46
4.3 Alkalen Proteaz Üreticisi İzolatların Bazı Biyokimyasal ve Morfolojik Özellikleri.....	56
4.4 Tirozin Konsantrasyon Eğrisi.. .....	57
4.5 İzolatların Alkalen Proteaz Üretim Değerleri .....	58
4.6 Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırma Sonuçları.....	61
4.7 APT5 Alkalen Proteazının Farklı Sıcaklık Değerlerindeki Aktivite ve Stabilite Sonuçları.....	63
4.8 APT5 Alkalen Proteazının Farklı pH Değerlerindeki Aktivite ve Stabilite Sonuçları .....	67
4.9 Çeşitli İnhibitörlerin, Sürfaktanların ve Metal İyonlarının Alkalen Proteaz Aktivitesine Etkisi.....	71
4.10 Kolon Fraksiyonlarının Poliakrilamid Jel Elektroforetik Analiz Sonuçları.....	82
4.11 APT5 İzolatının Fenotipik Özellikleri.....	85
5. SONUÇLAR.....	88
KAYNAKLAR.....	90
EKLER.....	97
EK 1 Enzim aktivitesi'nde kullanılan kimyasalların hazırlanışları ve içerikleri...98	
EK 2 Fenotipik testlerde kullanılan besiyerlerinin içerikleri.....99	
EK 3 SDS-PAGE'inde kullanılan stoklar ve hazırlanışları.....105	
EK 4 Native-PAGE'inde kullanılan stoklar ve hazırlanışları.....107	
ÖZGEÇMİŞ.....	109

## SİMGELER DİZİNİ

APS	Amonyum per sülfat
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
DFP	Diizopropil florofosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
g	Gram
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
kDa	Kilodalton
M	Molar
µl	Mikrolitre
mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
N-PAG	Native-Poliakrilamid Jel
N-PAGE	Native-Poliakrilamid Jel Elektroforez
PEG	Polietilen Glikol
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforez
PMSF	Fenil Metil Sülfonil Florid
rpm	Dakikada dönüş sayısı
SDS	Sodyum Dodezil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodezil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez
TEMED	Tetra Etil Metilen Daimin
v	Volt

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Alkalifilik bakterilerin buldukları toprak örnekleri ve pH değerleri .....	6
Şekil 2.2 Sitoplazmik pH regülasyonun şematik ifadesi .....	10
Şekil 4.1 <i>Bacillus licheniformis</i> DSM13'ün pH 7.0, 9.0 ve 10.0'lük Skim Milk Agar besiyerlerinde alkalen proteaz aktivitesine bağlı olarak oluşturduğu zonlar .....	46
Şekil 4.2 Skim Milk Agar (pH 7.0) besiyerinde Termofilik <i>Bacillus</i> spp. izolatlarının oluşturdukları proteolitik zonlar .....	48
Şekil 4.3 Termofilik <i>Bacillus</i> spp. izolatlarının Skim Milk Agar (pH 7.0 ve pH 9.0) besiyerinde oluşturdukları proteolitik zonlar .....	49
Şekil 4.4 Halofilik <i>Bacillus</i> spp. izolatlarının Skim Milk Agar (pH 7.0, 9.0 ve pH 10.0) besiyerinde oluşturdukları proteolitik zonlar .....	51
Şekil 4.5 APT İzolatlarının Skim Milk Agar (pH 7.0, 9.0 ve 10.0) besiyerinde oluşturdukları proteolitik zonlar .....	52
Şekil 4.6 Tirozinin ekstinksiyon katsayısının belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon eğrisi .....	57
Şekil 4.7 APT5 alkalen proteazının BioRad iyon değişim kolon kromatografisine ait anyonik karakterdeki Q-kolondan pH 9.0 Glisin-NaOH kullanılarak geçirilmesi ile elde edilmiş elüsyon profili .....	62
Şekil 4.8 APT5 alkalen proteazının farklı sıcaklık değerlerindeki bağlı aktivite değerleri .....	63
Şekil 4.9 APT5 alkalen proteazının farklı pH değerlerindeki bağlı aktivite değerleri .....	67
Şekil 4.10 Sürfaktanların alkalen proteaz aktivitesine etkisi .....	70
Şekil 4.11 İnhibitörlerin alkalen proteaz aktivitesine etkisi .....	74
Şekil 4.12 10mM PMSF'in APT5, <i>Bacillus licheniformis</i> ve <i>Bacillus</i> sp. proteazına etkisi .....	75
Şekil 4.13 Metal iyonlarının alkalen proteaz aktivitesine etkisi .....	79
Şekil 4.14 APT5 alkalen proteazının Q-kolonu ile saflaştırılması sonucu elde edilen farklı fraksiyonlarının SDS-PAG'deki protein profili .....	82

Şekil 4.15.a APT5 alkale proteazının Q-kolonu ile saflaştırılması sonucu elde edilen farklı fraksiyonlarının aktivite, b. gümüş boyama sonrası N-PAG'deki protein profili .....84

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 <i>Bacillus</i> cinsi mikroorganizmaların genel özellikleri.....	4
Çizelge 2.2 <i>Bacillus</i> cinsi mikroorganizmaların değişen dış pH değerlerindeki hücre içi pH değerleri.....	8
Çizelge 2.3 Alkalen proteaz üreticisi <i>Bacillus</i> spp.....	12
Çizelge 2.4 Alkalen proteaz üretimi için optimize edilmiş enzim üretimi koşulları.....	25
Çizelge 2.5 Çeşitli bakteri türlerine ait alkalen proteazların önemli özellikleri .....	29
Çizelge 2.6 Ticari bakteriyal alkalen proteazlar, kaynakları, kullanım alanları ve endüstriyel sağlayıcıları.....	31
Çizelge 4.1 Alkalen proteaz aktivitesi yönünden test edilen izolatlar ve kodları .....	45
Çizelge 4.2 Skim Milk Agarda proteolitik aktivite gösteren 32 adet izolatın gelişim gösterdikleri pH, bu pH değerindeki tek koloni etrafındaki proteolitik zonun büyüklüğü ve gelişim sıcaklıkları ile zon oluşum zamanları.....	47
Çizelge 4.3 Alkalen Proteaz üretim yetenekleri belirlenen bakteri izolatları ve proteolitik aktivite gösterdikleri pH değerleri .....	55
Çizelge 4.4 Alkalen proteaz aktivitesine sahip bakteri izolatlarının morfolojik özellikleri .....	56
Çizelge 4.5 Bazı bakteri izolatlarının ve standart <i>Bacillus licheniformis</i> DSM13 suşunun kazeinli sıvı besiyerinde (pH7.0 ve pH9.0) 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreci sonunda %0.6 kazein içeren pH9.0'luk Glisin-NaOH tamponu ile alkalen proteaz üretim değerleri.....	59
Çizelge 4.6 Bazı bakteri izolatlarının ve standart <i>Bacillus licheniformis</i> DSM13 suşunun kazeinli sıvı besiyerinde (pH7.0 ve pH9.0) 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreci sonunda %0.6 kazein içeren pH10.0'luk Glisin-NaOH tamponu ile alkalen proteaz üretim değerleri.....	60
Çizelge 4.7 APT5 alkalen proteazının saflaştırma basamaklarına ait sonuçlar.....	62
Çizelge 4.8 Bazı <i>Bacillus</i> cinsi bakterilere ait alkalen proteazların ve APT5 alkalen proteazının optimum sıcaklık istekleri ve stabiliteleri.....	66
Çizelge 4.9 Bazı <i>Bacillus</i> cinsi bakterilere ait alkalen proteazların ve APT5	

alkalen proteazının optimum pH'ları ve pH stabiliteleri.....	70
Çizelge 4.10 Bazı <i>Bacillus</i> cinsi bakterilere ait alkalen proteazlarla APT5' e ait alkalen proteazın aktivitesine sürfaktanların etkisi.....	73
Çizelge 4.11 Bazı <i>Bacillus</i> cinsi bakterilerin alkalen proteazları ile APT5 alkalen proteazına PMSF ve EDTA'nın inhibitör etkisi.....	78
Çizelge 4.12 Bazı <i>Bacillus</i> cinsi bakterilerin alkalen proteazlarına ve APT5 alkalen proteazına metal iyonların etkisi .....	81
Çizelge 4.13 AT5 ve <i>Bacillus licheniformis</i> DSM13'ün fenotipik özellikleri.....	86
Çizelge 4.14 AT5 ve <i>Bacillus licheniformis</i> DSM13'ün karbohidrat kullanımı.....	87

## 1. GİRİŞ

Proteazlar (EC 3.4 ), doğada çok çeşitli olarak bulunan proteinlerdeki peptid bağlarının kırılmasını katalizleyen enzim grubudur. Proteazlar bütün canlı organizmalarda bulunan, hücrenin gelişmesi ve farklılaşması için gerekli olan enzimlerdendir. Proteinlerin hidrolizinde spesifik katalitik role sahiptirler. Bu enzimler, çok çeşitli olmalarının yanında metabolizma, gen ekspresyonun regülasyonu, patojenite ve transportta büyük protein moleküllerinin küçük moleküllere hidrolizi ve bunun gibi biyolojik olaylarda önemli görevler yapmaktadır. Son on yılda gıda, deri, farmasötik, biyolojik atık giderimi ve tekstil endüstrisinde protein bazlı boyaların uzaklaştırılmasında alkalen proteaz uygulamaları çok hızlı bir şekilde artmıştır.

Etki şekli ve yapısal çeşitlilikleri nedeni ile proteazların karakterizasyonu oldukça zordur. Yeni moleküler biyoloji tekniklerinin artmasıyla katalitik ve aktif merkezlerinin üç boyutlu yapısı, etki mekanizmaları ve üç boyutlu yapılarındaki evrimsel ilişkilerine göre proteazlar familyalar halinde gruplanmışlardır. Etki ettikleri peptid bağının konumuna göre ekzo- ve endoproteazlar olarak ikiye ayrılan proteazlardan endoproteazlar aktif bölgelerindeki fonksiyonel grupların özellikleri ve katalitik mekanizmaları temel alındığında serin proteazlar, aspartik proteazlar, sistein/tiol proteazlar ve de metalloproteazlar olmak üzere dört gruba ayrılmaktadırlar. Endoproteazların bu dört grubu canlı organizmalarda belirlenmiş ve bunlardan serin proteazlar, sistein proteazlar ile metalloproteazlar bakterilerden izole edilerek saflaştırılmıştır.

Mikroorganizmalar, fermantasyon yöntemi ile kısa sürede fazla miktarlarda üretilmeleri nedeni ile cazip proteaz kaynaklarıdır. Ayrıca mikrobiyal proteazlar uzun raf ömürleri ile ideal koşullarda haftalarca aktivitelerini kaybetmeden depolanabilmektedirler. Proteazlar, mikroorganizmalar tarafından hücre içi ve hücre dışı olarak sentezlenirler. Hücre içi proteazlar sporulasyon, farklılaşma, enzimlerin ve hormonların olgunlaşması, protein katlanması gibi hücresel ve metabolik olaylarda görev yapmaktadır. Hücre dışı proteazların hücre dışı koşullarda hidrolitik ürünlerin hücre içine alınmasına imkan sağlamak gibi rolleri vardır. Aynı zamanda protein parçalanmasını temel alan birçok

ticari alanda da kullanılmaktadırlar. Hücre dışı üretilen ve fermantasyon besiyerine direkt olarak salgılanan mikrobiyal proteazlar üretilmelerindeki kolaylık nedeni ile bitkisel ve hayvansal proteazlara karşı tercih edilmektedirler.

Proteaz üreticisi olduğu bilinen mikroorganizmalar içerisinde çok azı toksik ve patojenik olmamaları nedeni ile ticari kullanımda uygun görülen üreticilerdir (generally recognized as safe; GRAS). *Bacillus* cinsine ait türler alkalen proteaz üreticisi bakterilerin başında gelir. Bu cinse ait en çok tercih edilen türler *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquifaciens* ve *B. mojavensis*'tir. Bir diğer potansiyel alkalen proteaz üreticisi bakteri cinsi ise *Pseudomonas* sp.'dir. Araştırmalara göre ticari alanda en büyük ilgi bakteriyal *Bacillus* sp. üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Dünya genelinde enzim satışlarının %60'ını oluşturan bakteriyal proteazlar endüstriyel enzimlerin en büyük sınıflarından biri haline gelmiştir. Geniş biyokimyasal çeşitlilikleri, mikroorganizmaların hızlı gelişmeleri, hücre kültürleri için limitli alanların yeterli olması ve genetik manipülasyonlarla yeni enzimlerin meydana getirilmesini sağladığı için mikrobiyal proteazlar enzim kaynağı olarak tercih edilmektedir.

Alkalen proteazlar, deterjan enzimlerinin önemli bir grubudur. Organik çözücüler varlığında doğal olarak stabil olmaları ve sentetik reaksiyonlarda kullanılabilmeleri nedeni ile özellikle *Bacillus* cinsi bakterilerden alkalen proteaz üretimi deterjan endüstrisi için ilgi gören bir diğer konudur. Organik çözücülerini tolare edebilen bakteri proteazlarının kullanılması denatürasyon, enzimin inaktive olması ve organik ortamdaki düşük ürün miktarı gibi ana problemlerin çözümlenmesine olanak sağlayabilmektedir. Bakteriyal kökenli proteazları popüler hale getiren dünya üzerindeki en büyük ticari paya sahip olan Danimarka'daki 'Novozyme' firmasıdır.

Uygulama alanları gıda ve besin endüstrisi, peptid sentezi, deri endüstrisi, endüstriyel ve evsel atıkların giderilmesi, fotoğraf endüstrisi, medikal alanlar, ipek işlenmesi ve en çok talep gördüğü deterjan endüstrisidir.

Bu alışma ile Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda gliserol içerisinde saklanan termofilik ve halofilik bakteri izolatları ve Ankara ilinden izole edilen alkalifilik bakteri izolatlarının alkalen proteaz üretim yetenekleri araştırılmıştır. Bu izolatların alkalen proteaz üretim kapasiteleri standart bakteri suşu *Bacillus licheniformis* DSM 13 ile kıyaslanarak belirlenmiştir. Hücre dışı şeklinde yüksek oranda alkalen proteaz üreten APT5 izolatı seçilerek enzimin karakterizasyonu yapılmıştır. Enzimin kısmi saflaştırması, elektroforetik mobilitesi, farklı sıcaklık ve pH değerlerindeki aktivite ve stabilitesi, metal iyonlarının, sürfaktanların ve inhibitörlerin enzim üzerine etkisi belirlenmiştir. Böylece standart enzimden farklılık gösteren stabilizasyonu yüksek alkalen proteaz üreten *Bacillus* sp. izole edilmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Alkalifilik *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Özellikleri

Carl Woese tarafından 16 ve 18S rRNA dizilerinin karşılaştırılmasıyla oluşturulmuş sınıflandırmaya göre *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar Bakteri (Eubakteri) domanini içerisine dahil edilmiştir (Woese and Wolfe 1985, Woese 1999). *Bacillus* cinsi organizmalar Gram (+), spor oluşturabilen, çubuk şeklinde, aerob veya fakültatif aerob, katalaz pozitif mikroorganizmalardır (Claus and Berkeley 1986). *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların ayırt edilmesinde kullanılan temel özellikler çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların genel özellikleri

Özellik	<i>Bacillus</i> cinsi
Çubuk şekli	+
Hücre çapı	<2.5 µm
Filament varlığı	-
Kıvrılmış çubuklar veya filamentlerin varlığı	-
Hareket yeteneği	+
Endospor oluşumu	+
Gram reaksiyonu	+
Zorunlu anaerob üreme	D
Fakültatif anaerob üreme	D
Homolaktik fermantasyon	D
Sülfatın sülfite reaksiyonu	-
Katalaz aktivitesi	+
Oksidaz aktivitesi	D
Glukozdan asit oluşumu	+
Nitratın nitrite redüksiyonu	D
G+C oranı (% mol)	32-69

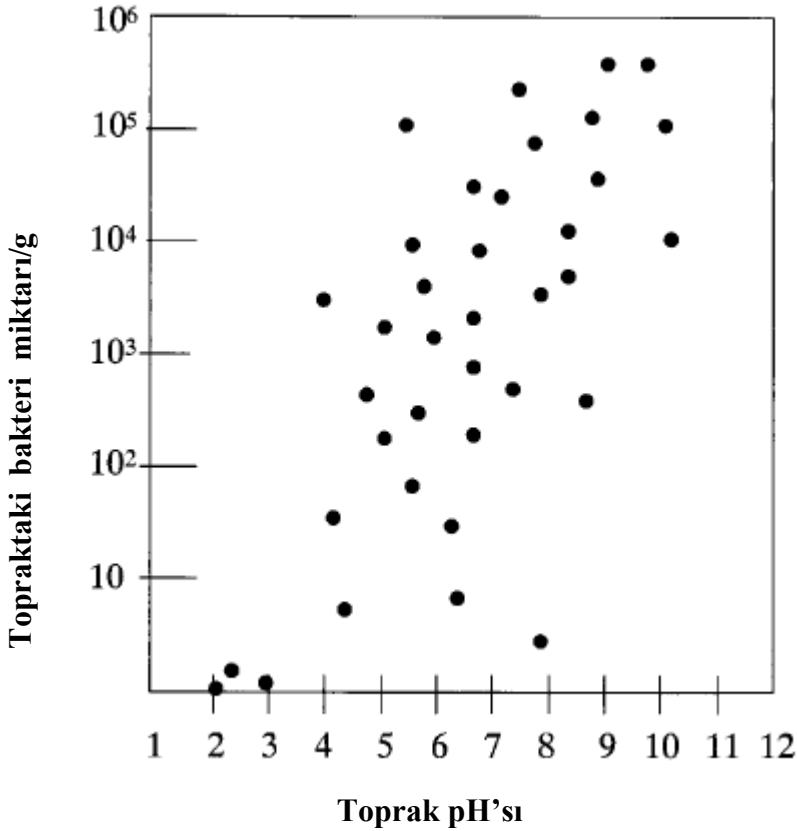
Not: D, Değişken

*Bacillus* cinsine ait sporlar, vejetatif hücre formlarına oranla besin yetersizliği, ısı, UV radyasyon, dezenfektanlar ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi okside edici ajanlarla muameleye karşı çok dirençlidirler. Vejetatif hücrelerdeki endospor şekli, türün özelliğine bağlı olarak terminal, subterminal ve sentral olmak üzere üçe ayrılır. Ayrıca endospor hücrede yine türün özelliğine bağlı olarak şişkinlik oluşturabilir. Sporları ise elipsoidal, yuvarlak, oval, muz veya silindirik şekillerde olabilir. *Bacillus* sporları içten dışarıya doğru gidildikçe öz, iç spor ceket, dış spor ceket, korteks ve ekzosporiyum kısımlarından oluşur. Spor protoplastı ve özündeki düşük su içeriği, spor ceketindeki kalsiyum ve dipiklonik asit gibi yüksek mineral seviyesi, azaltılmış spor geçirgenliği ve spor kromozomunun asitle çözünebilen (SASP) bir grup proteinle doyurularak DNA hasarının önlenmesi direncinin nedenleridir. Zor koşullarda spor oluşturabilme yeteneklerine bağlı olarak düşük sıcaklıklardan yüksek sıcaklıklara, asidik, alkalın veya tuzlu ortamlara kadar çok çeşitli habitatlardan izole edilebilmişlerdir (Claus and Berkeley 1986). Biyokimyasal, morfolojik ve moleküler biyolojik tekniklere göre spor oluşturabilen Gram (+) *Bacillus*'ların taksonomik sınıflandırması aşağıdaki gibidir.

Domain	= Bacteria (Eubacteria)
Alem	= Firmicutes (Gram (+) Bakteri)
Sınıf	= Bacilli
Ordo	= Bacillales
Aile	= Bacillaceae
Cins	= <i>Bacillus</i>

Ekstrem çevre koşullarındaki özel koşullara adapte olarak popülasyon oluşturan mikroorganizmalar, yaşayabildikleri bu koşullara göre göre alkalifiller, halofiller, termofiller ve asidofiller olarak adlandırılmaktadır. Alkalifilik mikroorganizmalar gelişebilmek için pH 9.0 veya daha yüksek alkali koşullara gereksinim duyar ve genellikle optimum pH 10.0'da gelişmektedirler. Alkalifiller esas olarak nötral pH'ya sahip çevre koşullarından, bazen de asidik toprak örneklerinden ve dışarıdan izole edilmektedir. Alkalifilik bakteriler aerobik alkalifiller, anaerobik alkalifiller, Haloalkalifiller, Metanojenler, Siyanobakteriler olmak üzere 5 ana gruba ayrılmaktadır.

Alkalifilik mikroorganizmalar n6trofilik mikroorganizmalarla birlikte doğada ekstrem koşullarda bulunmaktadır. Şekil 2.1’de alkalifilik mikroorganizmaların bulunduğu toprak 6rnekleri ve pH değerleri 6rneklemektedir. Alkalifilik mikroorganizmalar n6tral toprak 6rneklerinde  $10^2$ - $10^5$ /g aralığında bulunma sıklığı g6sterirken n6trofilik mikroorganizma populasyonununun 1/10 ile 1/100’e karşılık gelmektedir. Alkalifilik bakterileri izole edebilmek için alkaline besiyeri kullanılması zorunludur. pH değerini 10.0 civarına ayarlayabilmek için genellikle sodyum karbonat kullanılmaktadır unk6 alkalifiller gelişebilmek için az da olsa sodyum iyonlarına gereksinim duymaktadır (Horikoshi 1999).



Şekil 2.1 Alkalifilik bakterilerin bulundukları toprak 6rnekleri ve pH değerleri

Bazı n6trofilik organizmalar ekstrem pH koşullarında gelişme gösterebilmektedir. Bunun nedeni olumsuz koşullarda hayatta kalabilmek ve çoğalabilmek için membran özelliklerini ve taşıma mekanizmalarını değiştirerek özel fizyolojik ve metabolik sistemlere adapte olmalarıdır. Alkalifilik mikroorganizmalar yüksek alkalın koşullarda gelişebilen farklı bir grup oluşturmaktadır. Buna ilaveten alkalifiller ve alkalotolerantlar olmak üzere iki geniş gruba ayrılırlar. Alkalifil terimi optimum olarak pH 9.0'da gelişen ancak pH 7.0'nin altında ve pH 10.0'un üzerindeki pH koşullarında da gelişebilen organizmalar için kullanılmaktadır. Diğer yandan alkalotolerant organizmalar pH 10.0 üzerindeki pH değerlerinde gelişim gösterebilirken optimum gelişim aralığı nötrale yakındır. Ekstrem alkalifiller fakültatif ve obligat alkalifiller olmak üzere iki alt gruba daha ayrılır. Fakültatif alkalifiller optimal pH 10.0'da ve üzerindeki pH koşullarında gelişim gösterirken nötral koşullarda da gelişebilmektedirler ancak obligat alkalifiller nötral koşullarda gelişim gösterememektedirler (Kumar and Takagi 1999).

## 2.2 Alkalifillerin Fizyolojik Özellikleri

Birçok alkalifil, n6trofilik mikroorganizmaların aksine pH 10.0 civarında optimum gelişme göstermektedir. Bu durumda alkalifilik mikroorganizmaların ekstrem pH koşullarında gelişim gösterebilmeleri n6trofilik mikroorganizmalarla aralarında fizyolojik ve yapısal farklılık olup olmadığı sorusunu akıla getirmektedir. Hücre içi enzimlerin optimum pH'sına göre mikroorganizmaların sitoplazmik pH'sı tahmin edilebilmektedir. Örneğin alkalifilik bir mikroorganizma olan *Micrococcus* sp. 31-2 suşuna ait  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi katalitik aktivitesinin optimum pH 7.5'da gerçekleştirmektedir bu da hücre içi pH'nın nötral olduğunu göstermektedir. Hücre içi pH'yı tahmin etmedeki bir diğer yöntem aktif olarak hücre tarafından taşınmayan zayıf bazların hücre içindeki ve dışındaki dağılımını belirlemektedir. Çizelge 2.2'de *Bacillus* cinsi bakterilerin farklı dış pH değerlerindeki hücre içi pH değerleri verilmektedir (Horikoshi 1999). Hücre içinin nötral hücre dışı ortamın alkalifilik olması, alkalifililikteki anahtar özelliğin hücre yüzeyiyle bağlantılı olduğunu göstermektedir.

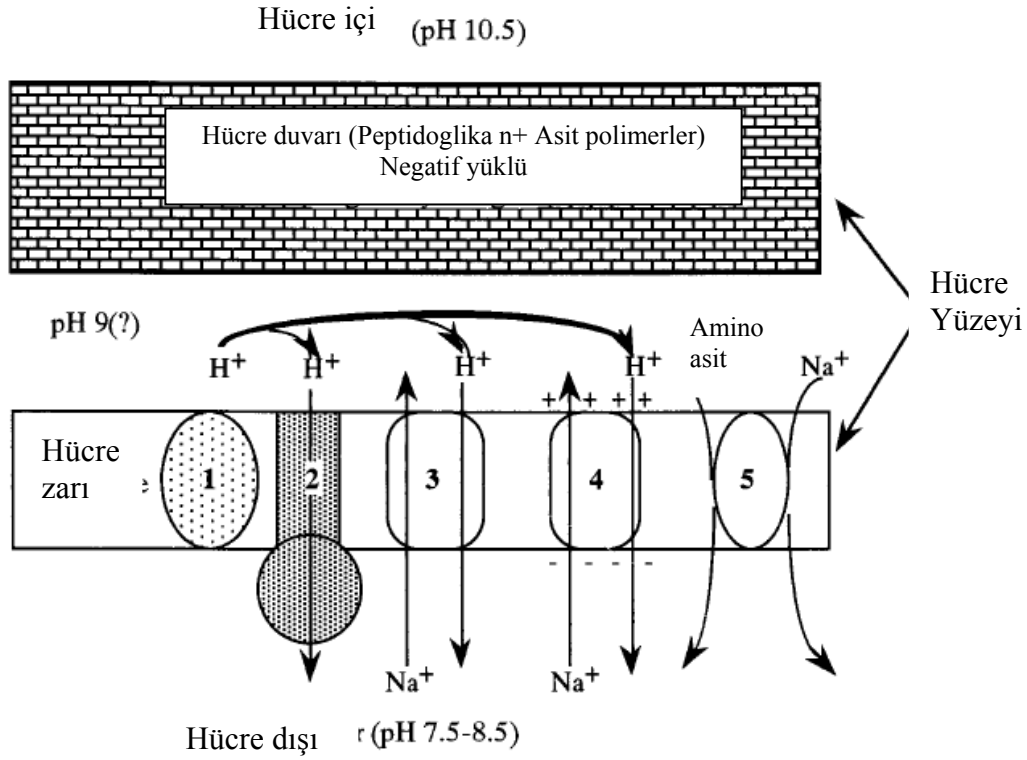
Alkalifilik *Bacillus* cinslerinin protoplastı, alkalın çevre koşullarında stabilitesini kaybettiği zaman hücreyi alkalın koşullarda korumakta anahtar rolü hücre duvarının oynadığı düşünülmüştür. Birçok alkalifilik *Bacillus* spp.'nin hücre duvarı bileşenleri nötrofilik *Bacillus subtilis* ile karşılaştırılarak araştırılmıştır. Ayrıca *Bacillus* spp. hücre duvarları peptidoglikan tabakasına ilaveten galakturonik asit, glukonik asit, glutamik asit, aspartik asit ve fosforik asit gibi asidik polimerleri içerdiği belirlenmiştir. Peptidoglikan tabakaya ait olmayan bu negatif yüklü asidik bileşenlerin, hücre yüzeyinden sodyum ve hidronyum iyonlarının absorbe ederek hidroksil iyonlarını uzaklaştırma yeteneğini sağlayarak alkalın koşullarda gelişmeye yardım ettiği düşünülmektedir.

Çizelge 2.2 *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların değişen dış pH değerlerindeki hücre içi pH değerleri

<b>Mikroorganizma</b>	<b>Hücre dışı pH</b>	<b>Hücre içi pH</b>
<i>Bacillus alcalophilus</i>	8.0	8.0
	9.0	7.6
	10.0	8.6
	11.0	9.2
<i>Bacillus firmus</i>	7.0	7.7
	9.0	8.0
	10.8	8.3
	11.2	8.9
	11.4	9.6
<i>Bacillus sp. YN-2000</i>	7.5	8.5
	8.5	7.9
	9.5	8.1
	10.2	8.4

Alkalifilik mikroorganizmalar etkin olarak pH 9.0 ve 11.0 aralığında gelişmektedir ve  $\text{Na}^+$  iyonlarına ihtiyaç duymaktadırlar. Kemoozmotik teoriye göre, hücrelerdeki proton itirme gücü elektron taşıma zinciri veya ATPaz enzimi tarafından ATP metabolizması ile  $\text{H}^+$  çıkartılması sonucu oluşmaktadır.  $\text{Na}^+$ -bağlı taşıma sistemlerinde  $\text{H}^+$  ile  $\text{Na}^+$  değişimi  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter sistemleri ile gerçekleşmektedir. Böylece  $\text{Na}^+$  ittirici güç ile substratlar  $\text{Na}^+$  eşliğinde hücre içine alınmaktadır. Hücre dışı pH'sını 7.0'den 9.0'a artıran test substratı olarak  $\alpha$ -aminoizobütirat kullanıldığı zaman sodyum iyonlarının varlığında hücre içine substratın alımını artırdığı belirlenmiştir. 0.2N NaCl uygulandığı zaman hücre içine alımın, NaCl uygulanmadığı zamankinden 20 kat daha fazla olduğu bulunmuştur.  $\text{K}^{+2}$ ,  $\text{Li}^{+2}$ ,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{Cs}^{+2}$  ve  $\text{Rb}^{+2}$  gibi katyonların ise hücre içine substratların alımında hiçbir etki göstermediği belirlenmiştir.

Hücre içi pH'sı ile hücre dışı pH'sını dengelenmesinde hücre zarı ve hücre duvarı etkin rol oynamaktadır. Şekil 2.2'de pH 10.5 değerindeki dış ortamın pH'sını 8.0 değerindeki iç ortama dengelemek için hücre yüzeyindeki hücre zarı ve hücre duvarı ile iki farklı bariyer uygulandığı ve membran proteinlerinin transferde rol oynadığını gösterilmektedir (Horikoshi 1999).



Şekil 2.2 Sitoplazmik pH regülasyonunun şematik ifadesi

### 2.3 Proteaz Kaynakları

Proteazlar doğada oldukça yaygın bulunan önemli enzim gruplarından birini oluşturmaktadır. Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi canlı gruplarında geniş çeşitlilik göstermektedirler. Bitkilerden proteaz üretimi zaman gerektiren bir işlemdir. Kültür koşullarının devamlılığı ve gelişme için gerekli olan iklim koşulları gibi faktörler bitkisel proteazların kullanımını yönlendirmektedir. Papain, bromelin, keratinazlar ve fisin bazı iyi bilinen bitki orijinli proteazlardır.

Hayvansal orijinli proteazları pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve renin oluşturmaktadır. Bu proteazlar büyük hacimlerde fazla miktarda saflaştırılabilmektedir.

Ancak bunların üretimi fazla miktarda çiftlik hayvanının kesimini gerektirdiği için tarımsal politikalarla yönlendirilmektedir. Bitkisel ve hayvansal proteazların elde edilmesindeki kısıtlamalar nedeni ile mikrobiyal proteazlara karşı ilgi tüm dünyada artmaktadır.

Biyokimyasal çeşitlikleri ve genetik manipülasyonlara olanak sunması nedeni ile mikroorganizmalar uygun proteaz kaynaklarıdır. Mikrobiyal proteazlar dünya piyasasındaki enzim satışlarında yaklaşık olarak %40'ını kapsamaktadır. Mikroorganizma kaynaklı proteazlar biyoteknolojik metodlarla elde edilmesini sağlayan özellikleri nedeni ile bitkisel ve hayvansal proteazlara karşı tercih edilmektedir. (Deshpande *et al* 1998)

### **2.3.1 Mikrobiyal Proteazlar**

#### **2.3.1.1 Bakteriyal Proteazlar**

Ticari proteazların çoğu *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından nötral ve alkalın olarak üretilmektedir. Çizelge 2.3'de alkalın proteaz üreticisi *Bacillus* türleri verilmiştir (Kumar and Takagi 1999). Bakteriyal nötral proteazlar pH 5.0-8.0 aralığında aktivite göstermektedir ve nispeten termal stabiliteleri düşüktür. Nötral proteazlar, aktivite gösterdikleri pH aralığı ve hayvansal proteazlara göre hidrolize edilmiş gıda proteinlerinde daha az acı tat oluşturmaları nedeni ile gıda endüstrisinde tercih edilmektedir.

Bakteriyal nötral proteazların en karakteristik özelliği, hidrofobik amino asit çiftlerine yüksek afinite göstermeleridir. Termotoleranslarının az olması nedeni ile düşük sıcaklık hidrolizi ile gıda hidrolizatlarının üretiminde avantaj sağlamaktadır. Bakteriyal alkalın proteazlar ise pH 10.0 gibi alkalın koşullarda yüksek aktivite göstermeleri ve geniş substrat spesifikliğı göstermeleriyle karakterize edilirler. Optimal sıcaklıkları 60°C civarındadır. Bakteriyel alkalın proteazların bu özellikleri onları deterjan endüstrisi için uygun kılmaktadır (Deshpande *et al* 1998).

Çizelge 2.3 Alkalen proteaz üreticisi *Bacillus* spp.

---

***Bacillus* spp. ve suşları**

---

*Bacillus alcalophilus* ATCC 21522  
*B. alcalophilus*  
*B.alcalophilus* subsp. *halodurans* KP1239  
*B. amyloliquefaciens*  
*B.circulans*  
*B.coagulans*  
*B.firmus*  
*B.intermedius*  
*B. lentus*  
*B. licheniformis*  
*B. proteolitycus*  
*B. pumilus*  
*B. sphaericus*  
*B. subtilis*  
*B. subtilis* var. *Amylosacchariticus*  
*B. thrungiensis*  
*Bacillus* sp. Ya-B  
*Bacillus* sp. NKS-21  
*Bacillus* sp. B21-2  
*Bacillus* sp. Y  
*Bacillus* sp. CW-1121  
*Bacillus* sp. KSM-K16  
*Bacillus* sp. MK5-6

---

### 2.3.1.2 Fungal proteazlar

Funguslar, bakterilere göre daha çeşitli enzimler üretebilmektedir. Örneğin *Aspergillus oryzae* asidik, nötral ve alkalen proteaz üretebilmektedir. Fungal proteazlar pH 4.0-11.0 gibi çok geniş pH aralığında aktivite göstermekte ve çok geniş bir substrat spesifikliği sergilemektedirler. Ancak, bu proteazların reaksiyon hızları ve bakteriyal proteazlara göre termotoleransları daha düşüktür.

Fungal asit proteazlar pH 4.0-4.5'da optimum aktivite gösterirler ve pH 2.5-6.0 aralığında stabildirler. Sınırlı pH ve sıcaklık özellikleri nedeni ile peynir endüstrisinde kullanılırlar. Metalloproteazlar, olarak adlandırılan nötral fungal proteazlar pH 7.0'de

aktiftirler ve EDTA gibi şelat ajanları ile inhibe olmaktadır. Peptidaz aktiviteleri ve hidrofobik amino asitleri içeren peptidlerin bağlarının hidrolizinde spesifik görevleri nedeni ile gıda protein hidrolizatlarındaki acı tadın uzaklaştırılmasında bitki, hayvan ve bakteri proteazlarına tercih edilirler. Fungal alkalen proteazlar da gıda proteinlerinin modifikasyonunda kullanılmaktadırlar (Deshpande *et al* 1998).

### **2.3.1.3 Viral proteazlar**

AIDS ve kanser gibi ölümcül hastalıklara neden olan virüs proteinlerinin fonksiyonları nedeni ile viral proteazlar giderek önem kazanmaktadır. Serin, aspartik ve sistein peptidazlar birçok virüste bulunmaktadır. Viral aspartik proteazlar viral tutunma ve homodimer replikasyonu ile poliprotein öncüleri olarak ifade edilmektedir. Olgun proteaz öncü proteinin otolizi ile salınır. Retroviral aspartik proteazlar ve bunların mutantları ile saflaştırma, enzimatik analiz ve gen ifadesi ile ilgili çok geniş literatür mevcuttur. AIDS'in yayılımını ve öldürücü etkisini kaldırabilmek amacıyla etkili inhibitörlerin dizaynı için birçok araştırma viral proteazların üç boyutlu yapısı ve bunların sentetik inhibitörlerle interaksyonu üzerine odaklanmıştır (Deshpande *et al* 1998).

## **2.4 Proteazların Sınıflandırılması**

'IUBMB'(The International Union of Biochemistry and Molecular)'ye göre proteazlar hidrolazlar olarak adlandırılan 3. grubun 4. alt grubunda sınıflandırılmıştır.

EC 3 Hidrolaz

EC 3.4 Proteazlar

Ancak proteazlar çok geniş etki mekanizmaları ve yapısal çeşitlilikleri nedeni ile genel enzim adlandırma sisteminde diğer enzim sınıfları gibi sınıflandırılmamaktadır. Şu ana kadar proteazlar üç ana kritere göre sınıflandırılmıştır.

- katalizledikleri reaksiyon tipi
- katalitik bölgenin kimyasal yapısı
- yapılarıyla ilgili evrimsel ilişki

Proteazlar etki gösterdikleri yere göre endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Ekzopeptidazlar substratın amino ya da karboksil ucu tarafındaki peptid bağını parçalarken endopeptidazlar substratın terminal ucunun uzağındaki peptid bağlarını parçalamaktadır.

Aktif bölgelerindeki fonksiyonel amino asit köküne göre proteazlar dört ana grupta sınıflandırılırlar.

- serin proteazlar (EC 3.4.21)
- aspartik proteazlar (EC 3.4.23)
- sistein/tiol proteazlar (EC 3.4.22)
- metalloproteazlar (EC 3.4.24)

Standart sınıflandırmaya uymayan az sayıda farklı proteazlar da bulunmaktadır. Örneğin ATP-bağımlı proteazlar aktivite gösterebilmek için ATP'ye ihtiyaç duymaktadır. Amino asit sekansları temel alındığında proteazlar dört familyada sınıflandırılır ve evrensel ataları olan peptidazlara göre familyalar klan olarak adlandırılan alt gruplara ayrılır.

Her peptidaz ailesi katalizlediği reaksiyonu simgeleyen kod harfine sahiptir. Örneğin 'S' serin proteazlar, 'C' sistein proteazlar, 'A' aspartik proteazlar, 'M' metalloproteazlar ve 'U' bilinmeyen tip proteazı simgelemektedir (Deshpande *et al* 1998).

### **2.4.1 Ekzopeptidazlar**

Ekzopeptidazlar sadece peptid zincirinin sonundaki bölgeye etki etmektedir. Peptid ve proteinlerin N ve C ucundan etki etmelerine göre sırasıyla, aminopeptidazlar ve karboksipeptidazlar olarak sınıflandırılırlar.

### 2.4.1.1 Aminopeptidazlar

Peptid zincirinin serbest N-ucuna etki ederek tek bir amino asitin, dipeptitin veya tripeptidin ayrılmasını sağlarlar. Aminopeptidazlar çok geniş çeşitlilik gösteren bakteri ve fungus türlerinde sentezlenmektedir. Aminopeptidazlar genellikle hücre içi enzimlerdir. Bakteriler ve funguslardaki aminopeptidazların substrat spesifikliği oldukça farklıdır ve organizmalar substratın hidrolizi bakımından da farklılık gösterirler. Örneğin *Escherichia coli*'nin oluşturduğu Aminopeptidaz I, 40000 Da ağırlığında büyük bir proteazdır. pH 7.5-10.5 aralığında optimum aktivite gösterdiği ve  $Mg^{2+}$  veya  $Mn^{2+}$  iyonlarına ihtiyaç duyduğu belirtilmiştir. *Bacillus licheniformis*'in 34000Da ağırlığındaki aminopeptidaz mol başına 1 g-atom  $Zn^{2+}$  içerir ve aktivitesi  $Co^{2+}$  iyonlarıyla artmaktadır. Diğer yandan *Bacillus stearothermophilus*'a ait Aminopeptidaz II 80000 ve 100000Da ağırlığındaki dimerlerden oluşur ve  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  veya  $CO^{2+}$  iyonları tarafından aktive edilir (Deshpande *et al* 1998) .

### 2.4.1.2 Karboksipeptidazlar

Polipeptid zincirini C-ucuna etki ederek tek bir amino asitin ya da dipeptidin ayrılmasını sağlarlar. Karboksipeptidazlar doğal olarak aktif bölgelerinde bulunan amino asitlere göre serin karboksipeptidazlar, sistein karboksipeptidazlar ve metallokarboksipeptidazlar olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar. Serin karboksipeptidazlar *Penicillium spp.*, *Saccharomyces spp.* ve *Aspergillus spp.*'den izole edilmişlerdir ve substrat spesifiklikleri benzer olmasına rağmen pH optimumları, stabiliteleri, moleküler ağırlıkları ve inhibitörlerin etkisi bakımından farklılık göstermektedirler. *Saccharomyces spp.* ve *Pseudomonas spp.*'e ait metallokarboksipeptidazlar aktiviteleri için  $Zn^{2+}$  ya da  $Co^{2+}$  iyonlarına ihtiyaç duyduğu belirtilmiştir (Deshpande *et al* 1998).

## 2.4.2 Endopeptidazlar

Polipeptid zincirinin N ve C ucundan uzakta veya polipeptid zincirinin iç bölgesindeki peptid bağlarına etkilerine göre gruplandırılırlar. Ortamda serbest amino veya karboksil gruplarının varlığı enzim aktivitesine negatif etki etmektedir. Endopeptidazlar serin proteazlar, sistein proteazlar, aspartik proteazlar ve metalloproteazlar olmak üzere dört alt gruba ayrılır.

### 2.4.2.1 Serin proteazlar (EC 3.4.21)

Aktif bölgelerindeki serin grubunun varlığına göre karakterize edilirler. Virüslerde, bakterilerde, ökaryotlarda çok çeşitli ve yaygın olarak bulunmalarıyla organizmalar için hayati olduğu düşünülmektedir. Yapısal benzerliklerine göre serin proteazlar 20 familya içinde gruplanırlar ve bu 20 familya evrensel atalarıyla 6 klanla ayrılmaktadır. Kimotripsin (SA), subtilisin (SB), karboksipeptidaz C (SC) ve *Escherichia* D-Ala-D-Ala peptidaz A (SE) klanlarına ait birey arasında akrabalık ilişkisi yoktur. Bu da serin proteazların evrimsel kökeninde en az dört ayrımın olduğunu göstermektedir. SA, SB ve SC klanlarının reaksiyon mekanizmaları etki gösterdikleri katalitik amino asit triyadı (serin-nükleofil, aspartat-elektrofil ve histidin-yüksüz) bakımından benzerdir. Ayrıca bu bölgelerin geometrik oryantasyonları da benzerdir. Ancak protein katlanmalarındaki farklılıklar bu üç klanı birbirinden evrimsel olarak ayırmaktadır. SE ve SF (Lex A repressörü) klanlarının katalitik mekanizmaları, Ser-His-Asp triyadının olmaması bakımından SA, SB ve SC klanlarından farklılık göstermektedir (Deshpande *et al* 1998). Serin proteazlar 3,4-cis-chloroisocoumarin (3,4-DCI), L-3-carboxytrans 2,3-epoxypropyl-leuclamido (4-guanidine) butane (E.64), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ve tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) ile geri dönüşümsüz inhibe olmalarıyla da karakterize edilirler. Bazı serin proteazlar aktif bölgelerinin yakınında sistein kökünün var olmasına göre *p*-chloromercuribenzoate (PCMB) gibi tiol ajanları tarafından da inhibe olmaktadır.

Serin proteazlar genellikle pH 7.0 ve pH 11.0 aralığında (nötral ve alkali pH'larda) aktiftirler. Esterolitik ve amidaz aktivitelerini de içeren geniş substrat spesifikliğine sahiptirler. Moleküler ağırlıkları 18-35 kDa aralığında değişirken *Blakeslea trispora*' ya ait serin proteaz farklı olarak 126 kDa ağırlığında olduğu bildirilmiştir. Serin proteazların izoelektrik noktaları pH 4.0-6.0 aralığında değişmektedir. Yüksek alkali pH koşullarda aktif olan serin alkalin proteazlar ve subtilisinler serin proteazların iki büyük önemli grubunu oluşturmaktadır (Deshpande *et al* 1998).

#### **2.4.2.1.1 Serin alkalin proteazlar**

Birçok bakteri, maya, küf ve fungus tarafından üretilirler. Patates proteaz inhibitörü olarak bilinen DFP ile inhibe olurlarken tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TLCK) ile inhibe olmazlar. Karboksil uç tarafında fenilalanin, tirozin veya lösin içeren peptid zincirini hidroliz ederler. Optimum pH'ları 10.0 ve izoelektrik noktaları da pH 9.0 civarındadır. Alkalin serin proteazlar *Arthrobacter*, *Flavobacterium* ve subtilisinleri üreten *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilmektedir. Ayrıca *S.cerevisiae*, *Conidobolus* spp., *Aspergillus* spp. ve *Neurospora* spp. tarafından da üretilmektedir (Deshpande *et al* 1998).

#### **2.4.2.1.2 Subtilisinler**

*Bacillus* orijinli subtilisinler serin proteazların ikinci büyük ailesine dâhildirler. İki farklı tipte alkalin proteaz olan subtilisin Carlsberg ve subtilisin Novo (bakteriyal proteaz Nagase) belirlenmiştir. *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen subtilisin Carlsberg 1947'de Linderstrom, Lang ve Ottesen tarafından Carlsberg Laboratuvarı'nda bulunmuştur. Subtilisin Novo ise *Bacillus amyloliquefaciens* tarafından üretilmektedir. Subtilisin Carlsberg deterjan endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yılda 500 tonun üzerinde saf enzim proteini olarak üretilmektedir. Subtilisin Novo subtilisin Carlsberg'e göre daha az ekonomik öneme sahiptir. Her iki subtilisinin de moleküler ağırlığı 27.5 kDa'dur ancak amino asit sekanslarındaki 58 amino asitlik farkla birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Optimum 60°C'de ve pH10.0'da aktivite göstermeleri

bakımından benzerdirler. Her iki enzim de geniş substrat spesifikliği göstermektedir ve aktif bölgelerini Ser221-His64-Asp32 oluşturur. Carlsberg enzimin substrat spesifikliği daha geniştir ve stabilitesi Ca<sup>2+</sup> iyonlarına bağımlı değildir (Deshpande *et al* 1998).

#### **2.4.2.2 Aspartik proteazlar (EC 3.4.23)**

Aspartik asit proteazları asidik proteazlar olarak tanımlanırlar ve katalitik aktivitelerini aspartik asit kökleri üzerine etki ederek gösteren endopeptidazlardır. Asidik proteazlar pepsin (A1), retropepsin (A2) ve pararetrovirüslere ait olan enzimler (A3) olmak üzere üç familyada gruplanırlar. A1 ve A2 familyaları birbirlerine akrabalık gösterirken A3 familyası bu iki familyadan oldukça farklıdır. Çoğu aspartik proteazın aktivitesi pH 3.0-4.0 gibi düşük pH değerlerinde değiştir. Moleküler ağırlıkları 30-45 kDa aralığındadır. Aspartik proteazların aktif bölgeleri Asp-Xaa-Gly triyadından oluşur (Xaa serin veya treonin amino asitlerinden biri olabilir). Aspartik proteazlar pepstain tarafından inhibe olurlar. Diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester (DAN) ve 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy) propane (EPNP) gibi bakır iyonlarını içeren diazoketon bileşiklerine hassastırlar. Mikrobiyal aspartik proteazlar *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Neurospora* tarafından üretilen pepsin benzeri enzimler ve *Endothia* ve *Mucor* spp. tarafından üretilen renin benzeri enzimler olmak üzere iki geniş gruba ayrılmaktadırlar (Deshpande *et al* 1998).

#### **2.4.2.3 Sistein/Tiol proteazlar (EC 3.4.22)**

Sistein proteazlar hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunmaktadır. Yaklaşık 20 familyası belirlenmiştir. Bütün sistein proteazların katalitik aktivitesi sistein ve histidin amino asitlerini içeren katalitik diyadlar üzerinedir. Sistein ve histidin amino asitleinin Cys-His veya His-Cys sırası familyalardaki farklılıkları oluşturur. Sistein proteazlar genellikle HCN ve sistein varlığında aktivite gösterebilmektedirler. Yan zincir spesifiteleri temel alındığında papain benzerleri, arjinin kökünün yıkımı varlığında tiripsin benzerleri, glutamik asite spesifik olanlar ve diğerleri olmak üzere dört gruba ayrılırlar. Papain en iyi bilinen sistein proteazdır. Genellikle nötral pH'da optimum

aktivite gösterirken lizozomal proteazlar gibi çok az bir kısmı asidik pH değerlerinde aktiftirler. Clostripain anaerobik bakteri *Clostridium histolyticum* tarafından üretilir. *Streptococcus* spp. tarafından üretilen Streptopain ise okside olmuş insülin B zinciri de dahil olmak üzere birçok sentetik substrata karşı geniş substrat spesifikliğı gösterir. Clostripainin izoelektrik noktası pH 4.9 ve moleküler ağırlığı 50kDa iken streptopainin izoelektrik noktası pH 8.4 ve molekül ağırlığı 32kDa'dur (Deshpande *et al* 1998).

#### 2.4.2.4 Metalloproteazlar (EC 3.4.24)

Aktivite göstermek için divalent metal iyonlarına ihtiyaç duymalarıyla karakterize edilirler. Metalloproteazlar yüksek organizmalarda kollogenaz, yılan zehirindeki hemorhagic toksin ve bakterilerde termolizin gibi proteazlar olarak canlılar arasında geniş yayılım göstermektedirler. Yaklaşık 30 familyası belirlenmiştir. Bunlardan 17 adeti endopeptidazlara, 12 adeti ekzopeptidazlara ve 1 adeti (M3) hem endo- hem de ekzopeptidazlara dâhildir. Metalloproteaz familyaları metal bağlanma bölgesiyle birlik oluşturan amino asit köküne göre klanlara ayrılır. Etki spesifitelerine göre metalloproteazlar nötral, alkale, *Myxobacter* I ve *Myxobacter* II olmak üzere dört gruba ayrılır. Alkale metalloproteazlar geniş substrat spesifikliğı gösterirken nötral metalloproteazlar sadece hidrofobik amino asitler üzerine etki edebilmektedirler. *Myxobacter* proteaz I koparılacak bağın her iki tarafındaki küçük amino asitlere etki ederken, *Myxobacter* proteaz II peptid bağının bir tarafındaki lizin köklerine etki etmektedir. Metallaoproteazların tümü EDTA gibi şelat ajanları tarafından inhibe olurken, DFP gibi sülfidril ajanları tarafından inhibe olmazlar.

*Bacillus stearothermophilus* tarafından üretilen termolizin, disülfid köprülerini içermeyen 34 kDa ağırlığında tek bir peptiddir. Proteinin iki katlı lobu arasında bulunan Zn atomu esansiyeldir ve dört adet Ca atomu proteinin termostabilitesini sağlamaktadır. 80°C'de yarı ömrü 1 saat olan termolizin oldukça stabil bir proteazdır. Bir diğere önemli nötral metalloproteaz olan kollogenaz ilk olarak anaerobik bakteri *Clostridium histolyticum*'un toksik elemanlarından biri olarak bulunmuştur. Daha sonra funguslara dahil olan *Achromobacter iophagus* tarafından üretildiğı bulunmuştur. Kollogenazın

etkisi oldukça spesifiktir. Sadece kollogen ve jelatin üzerine etki etmektedir. *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen elastaz da bir diğer önemli nötral metalloproteazdır. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Serratia* spp. tarafından üretilen alkalen metalloproteazlar pH 7.0-9.0 aralığında aktiftirler. *Myxobacter* proteaz I'in optimal pH'sı 9.0'dur ve moleküler ağırlığı 14kDa'dur.

Bu enzim *Arthrobacter crystellopoites*'in hücre duvarını lize ederken *Myxobacter* proteaz II'nin bakteriyal hücreler üzerine etkisi yoktur (Deshpande *et al* 1998).

Özet olarak proteazlar protein substratları üzerine etki mekanizmalarına göre endo ve ekzoenzimler olmak üzere iki geniş sınıf oluştururlar. Endoenzimler serin proteazlar, aspartik proteazlar, sistein proteazlar ve metalloproteazlar olmak üzere kategorize edilirler. Bunlar da amino asit sekanslarına ve evrimsel ilişkilerine göre farklı familya ve klanlara sınıflandırılırlar. Optimum aktivite gösterdikleri pH değerlerine göre nötral, asidik ve alkalen proteazlar olmak üzere ayrılırlar. Proteazlar içerisinde alkali koşullarda en iyi aktivite gösteren enzim sınıfı serin proteazlardır.

## **2.5 Bakteriyal alkalen proteazlar**

Mikrobiyal proteazlar enzimoloji çalışmaları başladığından beri kapsamlı olarak araştırılan hidrolitik enzimlerin en önemlisidir. Proteolitik enzim çalışmalarında bu enzimlerin hücrel metabolik aşamalarda önemli rol oynamalarının yanı sıra endüstriyel alanda da önem kazanması yeni bir ilgi konusu olmuştur. Bu enzimler 1914 yılından bu yana deterjanlara ilave edilmeleriyle deterjan endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Hücre içi proteazlar hücrel ve metabolik yollarda farklılaşma, sporulasyon, protein katlanması, enzimlerin olgunlaşması gibi birçok aşamada rol oynamaktadır. Hücre dışı proteazlar ise hücrenin etkileştiği çevresel koşullarda proteinlerin hidroliz edilerek absorbe edilmesi ve bunlardan yararlanılmasında görev almaktadır. (Kalizs 1988). Aynı zamanda hücre dışı proteazlara birçok endüstriyel aşamada protein parçalanmasında ticari olarak ihtiyaç duyulmaktadır (Kumar and Takagi 1999).

Günümüzde proteazlar endüstriyel pazarda satılan total enzimlerin %40'nı oluşturarak deterjan, gıda, ilaç, deri, atık su arıtımı ve gümüşün geri kazanılması gibi alanlarda kullanılmaktadırlar. Bugüne kadar enzim piyasasında, deterjan endüstrisinde alkalen proteazlar alkali pH aralığında stabil olmaları nedeni ile geniş yere sahip olmuşlardır (Gupta *et al* 2002a).

## **2.6 Alkalen Proteaz Deneyleri**

### **2.6.1 Alkalen proteaz varlığının belirlenmesi**

Proteolitik aktivite hem kalitatif hem de kantitatif metotlarla ölçülebilmektedir. Her iki metot protein hidrolizi sonucu kalan enzim proteinin ya da ürünün ölçülmesini temel almaktadır. Proteolitik aktivitenin belirlenmesinde kullanılan deneyler basitlik, hız, hassasiyet ve belirlenme oranı gibi farklılıklar içermektedir.

Kalitatif deneyler proteaz üretiminin sonucu olarak agarlı petrielerde proteolitik zonun varlığının tespit edilmesini temel almaktadır. Kalitatif deneyler; protein agar petri deneyi, radyal difüzyon deneyi, ince tabaka enzim deneyi olmak üzere üç farklı deneyden oluşmaktadır.

Protein agar petri deneyi genellikle seçilen protein substratlarına göre proteolitik aktivitenin görüntülenmesini temel almaktadır. Besiyerine ilave edilen en yaygın substratlar skim milk, kazein, jelâtin, bovine serum albumin ve keratindir. Ortamın pH'sı çeşitli tamponlar ile değiştirilerek ilgilenilen proteazın nötral ya da alkalen olduğu anlaşılabilir. Radyal difüzyon ya da zon difüzyonu olarak adlandırılan deneyde proteaz aktivitesi semi kantitatif olarak ölçülebilmektedir. Agarlı besiyerinden kesilen, içerisine ilgilenilen protein substratı içeren küçük kuyuların etrafında oluşan proteaz zonunun varlığını temel almaktadır. İnce tabaka enzim deneyinin en büyük avantajı karışık bir örnek içerisindeki mikrobiyal proteaz üreticilerinin seçiminde hassas, güvenilir ve ucuz bir metot olmasıdır. Ancak ana dezavantajı deneyde seçilen besiyeridir. Besiyeri hem optimal gelişme hem de enzim üretimi için uygun koşulları

içermelidir. Ayrıca agar jeldeki yoğun substrat konsantrasyonu küflenmeye neden olmaktadır.

Kalitatif deneyler ise spektrofotometrik metotlar, floresans oligopeptid enerji transferi deneyi, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), floresans bazlı proteaz deneyi ve X ışını bazlı metot deneylerinden oluşmaktadır. Spektrofotometrik yöntemler, protein substrata proteolitik aktivitenin etki etmesinden sonra asitte çözünen hidrolize olmuş ürün fraksiyonlarındaki peptid miktarının belirlenmesini temel almaktadır. Protein substrat genellikle BSA, kazein, hammerstein kazein, hemoglobindir. Açığa çıkan peptid kökleri 'direk belirleme metodu' olarak adlandırılan yöntemle 280nm dalga boyunda Folin reaktifinin kullanılmasıyla belirlenmektedir. Floresans oligopeptid enerji transferi deneyinde proteazın spesifiklik gösterdiği peptid zincirinin C- ya da N- ucundaki amino asitleri içeren floresans işaretli peptid substratın kullanılmasını temel alır. Bu metot spesifik endoproteazların belirlenmesi ve ölçülmesi için hassastır. Deney bileşenlerinin pahalı olması nedeni ile çok fazla kullanılmamaktadır. ELISA temelli deneylerde test edilen enzime karşı kullanılan antikör molekülü için enzimin üç boyutlu yapısının tamamının bilinmesinin gerekmesi bu metodun kullanımını kısıtlamaktadır. Son olarak floresan bazlı proteaz deneylerinde substrat olarak çözünebilir fluorescein isothiocyanate ( FITC) işaretli kazein, FTC-hemoglobin ya da FTC-tirozin kullanılmaktadır. Yöntem basit, ucuz ve proteaz deneyleri için oldukça hassastır. Bu deney ile kullanılan enzimin miktarı nanogram düzeyinde dahi belirlenebilmektedir (Gupta *et al* 2002b).

### **2.6.2 Alkalen proteaz biyosentezinin düzenlenmesi**

Vejetatif büyümeden sporulasyon aşamasına geçiş dönemi olarak bilinen durağan fazda alkalen proteaz üretiminin gerçekleştiği bilinmektedir. Proteazların fazla miktarda üretimi, genellikle bakterilerin gelişme sürecinin durağan fazında karbon ve nitrojen stresine karşı düzenlemelerle gerçekleştirilmektedir. Fazla miktarda alkalen proteaz üretimi fermentasyon besiyerinde durağan fazın ilerleyen safhalarında gerçekleşmektedir. Ancak *Bacillus subtilis* ve *Bacillus licheniformis* gibi birçok basilin proteaz üretimini sporulasyon aşamasında gerçekleştirdiği bilinmektedir. Diğer yandan

sporulasyon ve proteaz üretiminin birbiriyle ilişkili olduğunu, spor oluşturmayan *Bacillus licheniformis* suşlarının proteaz da üretmediklerini ileri sürülmüştür. Ancak 2000’de Khan, durağan fazda proteaz üretimiyle sporulasyon aşamasına geçişin birbiriyle bağlantılı olmadığını açıklamıştır. Benzer bir sonuç *B. licheniformis*’de hücrelerin nükleotid havuzunun (ATP ve GTP) analizi ile açıklanmıştır. Bu sonuçlara göre proteaz üretimi amino asit eksikliğinin ortaya çıktığı koşullar altında gerçekleşmektedir. Farklı gelişme fazları arasında geçiş anları ya da farklı nutrient limitasyonları nükleotid havuzundaki farklılıklarla ayırt edilebilmektedir. Hızla büyüme (exponential) fazında mycophenolic asit ilavesi ile hücrelerin işaretlenmiş GTP içeriklerindeki artış, hücrelerin proteaz üretimini durağan fazda gerçekleştirdiğini göstermektedir. Bu durum hücrelerin hücre dışı proteaz üretimini durağan faza geçerken ortamdaki nutrientlerin azalmasıyla başlattığını açık bir şekilde göstermektedir. Besiyeri kültüründe logaritmik artış fazında hücrelerin gelişmeleri ile durağan fazda elde edilen proteaz miktarı doğru orantılıdır. Bu nedenle besiyerinde gelişmeyi artırıcı manipulasyonların yapılması alkalen proteaz üretimini de artırmaktadır (Gupta *et al* 2002b).

### **2.6.3 Alkalin proteazların saflaştırılmaları**

Proteazların saflaştırılmasıyla ilgili kesin uygulanan kurallar yoktur. Fermentasyonun gerçekleştiği sıvı besiyerinden bakteri kültürü filtrasyon veya santrifügasyon ile uzaklaştırıldıktan sonra besiyeri süpernatantı katı amonyum sülfat kullanılarak salting out yöntemi ile ya da aseton veya etanol kullanılarak solvent ekstraksiyon yöntemi ile konsantre hale getirilir (Gupta *et al* 2002b). Enzimlerin saflaştırılmasında amonyum sülfat presipitasyonu çokça tercih edilen bir metottur. Ancak amonyum sülfattan sadece asidik ve nötral koşullarda faydalanılabilmektedir çünkü bazik koşullarda amonyum sülfattan amonyak açığa çıkmaktadır. Bu nedenle alkalin proteazların saflaştırılmasında sodyum sülfat veya organik çözücüler tercih edilmektedir. Sodyum sülfat kullanımında ise düşük sıcaklık derecelerinde tuzun çözünürlüğünün az olması saflaştırma işlemini olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle birçok araştırmacı aseton ile presipitasyonu tercih etmektedir. %80, %66, %44 gibi değişik oranlarda aseton kullanılarak presipitasyon gerçekleştirilebilmektedir (Kumar and Takagi 1999). Bu yöntemlere ilaveten PEG-

35.000, sıcaklık duyarlı hidrojel, enzimin sıcaklıkla muamele edilmesi ve liyofilizasyon yöntemleri de kullanılarak konsantrasyon artırılabilir. Çizelge 2.4'de çeşitli bakteri türleri için alkalen proteaz üretimi için optimize edilmiş enzim üretim koşulları görülmektedir. İleri derecedeki saflaştırma için affinite kromatografisi, iyon değişimi kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi, affinite presipitasyonu ve de hidrofobik interaksiyon kromatografisi gibi tekniklerden biri ya da daha fazlası uygulanabilmektedir. Boya ligand kromatografisi ve akışkan iki-faz kromatografisi gibi diğer seçenekler dar bir skalada çalışılmıştır ve hala ticari olarak kullanılabilirliği için keşifleri tamamlanmamıştır (Gupta *et al* 2002b).

Affinite kromatografisinde alkalen proteazlar için en yaygın kullanılan tutucular (adsorbents) hidroksiapatit, agaroz immobilize edilmiş *N*-benzoyloxycarbonyl phenylalanine, immobilize edilmiş kazein glutamik asit, aprotinin-agaroz ve kazein-agarozdur. Affinite kromatografisi en başarılı saflaştırma tekniği olmasına rağmen en büyük kısıtlatıcı özelliği enzim desteklerinin mali yüksekliği ve affinite ligandlarının doğası nedeni ile saflaştırma işleminin derecesini düşürmesidir.

Alkalen proteazların saflaştırılmasında en çok kullanılan tekniklerden birisi de iyon değişimi kromatografisidir. Alkalen proteazlar genellikle pozitif yüklüdür ve anyon değiştiricilerine bağlanmamaktadırlar. Bu nedenle katyon değiştiricileri tercih edilmektedir. İyon değişimi kromatografisinde kullanılan matriksler dietil amino etil (DEAE) ve karboksi metil gibi iyonize olabilen fonksiyonel grupları içerir. Böylece yüklü protein molekülleriyle birleşerek proteinlerin matrikse tutunmasını sağlarlar. Tutunmuş protein molekülleri pH'daki gradient değişimi veya elüsyon tamponunun iyonik gücü ile matriksten ayrılmaktadır.

Çizelge 2.4 Alkalen proteaz üretimi için optimize edilmiş enzim üretimi koşulları

Bakteri	pH	Sıcaklık (°C)	rpm	İnküasyon periyodu (saat)	Tercih edilen nitrojen kaynakları	Tercih edilen karbon kaynakları	Referans
<i>Alcaligenes faecalis</i>	8	30	200	48	Soybean meal	- <sup>a</sup>	Thangam and Rajkumar 2000
<i>Bacillus</i> sp. IS-3	10.5	37	200	72	Soybean meal	Glukoz	Purva <i>et al</i> 1998
<i>Bacillus</i> sp. JB99	10	55	180	24	KNO <sub>3</sub>	Sitrik asit	Johnvesly ve Naik 2001
<i>Bacillus</i> sp. K2	7	37	300-500	60-72	Kazein hidrolizat, jelatin	Gliserol	Hameed <i>et al</i> 1999
<i>Bacillus</i> sp. P-2	9.5	30	-	24	Pepton, yeast extract	Glukoz	Kaur <i>et al</i> 2001
<i>Bacillus</i> sp. RGR-14	7	37	200	72-96	Soybean meal, pepton	Nişasta	Oberoi <i>et al</i> 2001; Puri <i>et al</i> 2002
<i>Bacillus</i> sp. SSR-1	10	40	150	18	Biopeptone, yeast extract	Beef extract, laktoz	Singh <i>et al</i> 2001
<i>Bacillus brevis</i> MTCC B0016	10.5	37	200	96	Soybean meal	Laktoz	Banerjee <i>et al</i> 1999
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 21415	7	30	250-400	48	Soybean, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>3</sub>	Laktoz, glukoz	Mabrouk <i>et al</i> 1999
<i>Bacillus mojavensis</i>	7	50	200-250	24	Kazein ya da casamino asitler	Glukoz	Beg <i>et al</i> 2002
<i>Bacillus pumilis</i> MK6-5	9.6	35	250	60	Cornsteep liquor, tripton	Glukoz, sodyum sitrat	Kumar 2002
<i>B. sphaericus</i>	-	30	300	-	Biopeptone, yeast extract	Glukoz	Singh <i>et al</i> 2001
<i>Bacillus subtilis</i> 168	-	36	250	6-8	Nutrient broth, yeast extract	Glukoz, yeast extract	Longo <i>et al</i> 1999
<i>Flavobacterium balustinum</i> P104	7.4	10	150	72	Polypeptone, yeast extract, casein	- <sup>a</sup>	Romero <i>et al</i> 2001
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 25419	-	30-36	250	24;16-18	Yeast extract, tripton, asparajin, NH <sub>4</sub> Cl	Whey: Sukroz	Longo <i>et al</i> 1999

-<sup>a</sup> Besiyerinde karbon kaynağı yoktur major nitrojen kaynağı gerekli karbonu sağlamaktadır

Hidrofobik interaksiyon kromatografisinde farklı proteinlerin dış bölgelerindeki hidrofobik amino asit köklerinin akışkan solvent ile interaksiyonu sonucunda proteinlerin hidrofobik bölgelerinin diğer hidrofobik yüzeyleri tercih etmesini temel alır. Bu hidrofobik interaksiyonlar yüksek tuz konsantrasyonu ile güçlendirilir ve ortamda deterjanlar ile organik çözücülerin olması interaksiyonları zayıflatır. Tampon koşullarıyla birlikte matriksin tipi ve yoğunluğu hidrofobik proteinin bağlanma etkisini belirler. Hidrofobik interaksiyonlar iyon değiştiricilerine göre daha değişkendir. Bu nedenle rezolüsyonu iyon değişimi kromatografisinden daha düşüktür.

Alkalen proteazların saflaştırılmasında kullanılan bir diğer teknik Afinite presipitasyonudur. Çözülebilir makromoleküller (ligand polimer ve makroligand) için fonksiyoneldir. Afinite ligandı içerir ve pH, sıcaklık veya iyonik güç değişimi ile presipitasyon gerçekleştirilebilmektedir. Bu teknikte ligand polimer enzim solüsyonuna eklenir. Ligand polimer daha sonra çöktürülür ve süpernatant uzaklaştırılır. Uygun koşullar altında ilgilenilen protein polimerden toplanır ve polimer tekrar kullanılabilir.

Jel Filtrasyon kromatografisi ile makromoleküller büyüklüklerine göre hızlı bir şekilde ayrıştırılabilirler. Sephacryl, Superose, Superdex ve Toyopearl gibi agaroz bazlı, daha sert ve çapraz bağlı jeller kullanılmaktadır. Bu yöntemin dezavantajı yüklenen proteinlerin düşük kapasitede yüklenebilmesi ve bu nedenle proteinlerin çok fazla seyreltilmesidir (Gupta *et al* 2002a).

## **2.7 Alkalen Proteazların Özellikleri**

Birçok mikroorganizmaya ait alkalen proteaz enzimleri yoğun bir şekilde çalışılmıştır ve elde edilen bu özellikleri değişik endüstrilerde kullanılmaktadır. Çizelge 2.5’de çeşitli bakteri türlerine ait alkalen proteazların önemli özellikleri özetlenmiştir (Gupta *et al* 2002b).

### 2.7.1 pH ve sıcaklık istekleri

Alkalen proteazların optimum pH aralığı genellikle pH 9.0-11.0'dir. Çok yaygın olmasa da pH 11.0'in üzerindeki koşullarda aktivite gösteren alkalen proteazlar bulunmaktadır. Bu enzimlerin izoelektrik noktaları da oldukça yüksektir ve genellikle pH 6.0-12.0 aralığında stabildirler. Alkalen proteazların optimum sıcaklıkları 50-70°C aralığındadır. Buna ilaveten alkalifilik *Bacillus* sp. B13'' e ait enzim istisna olarak 85°C'de optimum aktivite gösterdiği bildirilmiştir. *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. ve *Thermus* sp.'ye ait alkalen proteazlar yüksek sıcaklıklarda oldukça stabildir ve Ca<sup>++</sup> ilavesi enzim termostabilitesini artırdığı belirtilmiştir (Kumar and Takagi 1999).

### 2.7.2 Stabilize edicilerin etkisi

Ticari olarak kullanılan alkalen proteazların genellikle termostabilitesinin yüksek olması istenmektedir. Alkalen proteazlar genellikle doğal olarak termal stabilitesinin yüksek olması kullanım amaçlarına göre avantaj sağlamaktadır. PEG, polihidrik alkoller ve nişastanın reaksiyon karışımına ilave edilmesi veya protein mühendisliği ile proteinin dördüncül yapısına müdahale edilerek alkalen proteazların termostabiliteyi daha da artırılabilir (Gupta *et al* 1999).

### 2.7.3 Metal iyonların ve inhibitörlerin etkisi

Alkalen proteazlar yüksek aktivite gösterebilmek için Ca<sup>+2</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> gibi divalent katyonlara veya bu katyonların kombinasyonlarına ihtiyaç duymaktadırlar. Bu katyonlar *Bacillus* alkalen proteazlarının stabilitesini artırmaktadır. Bu katyonların enzimi termal denatürasyona karşı koruduğu ve yüksek sıcaklıklarda enzimin aktif konformasyonunu korunmasını sağladığı düşünülmektedir (Kumar and Takagi 1999). Ba<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> gibi metal iyonları da alkalen proteazların stabilitesini artırdığı bilinmektedir (Gupta *et al* 2002b).

İnhibisyon çalışmaları kofaktör ihtiyacı ve aktif bölgesinin yapısı bakımından enzimin doğal yapısının anlaşılmasını sağlamaktadır. Alkalen proteazların genellikle PMSF ve DFP ile tamamen inhibe olduğu bilinmektedir. PMSF aktif bölgede bulunan serin köklerine etki ederek enzim aktivitesinin kaybolmasına neden olmaktadır. Bu inhibisyon profili proteazların serin proteazlar olarak sınıflandırılmasını sağlamaktadır. Metal iyonlarında bağımlı olan proteazlar EDTA gibi şelat ajanlarına hassaslık göstermektedir. EDTA varlığında inhibe olan metal iyonlarına bağımlı proteazlar da metalloproteazlar olarak sınıflandırılmıştır (Kumar and Takagi 1999).

#### **2.7.4 Substrat spesifikliği**

Alkalen proteazlar geniş substrat spesifikliğine sahiptirler ve sentetik substratlar ile doğal proteinelere karşı da aktiftirler. Literatürlere göre kazeine karşı azokazein, hemoglobin ve BSA'ya göre daha fazla aktivite gösterirler (Çizelge 2.5). Ayrıca kollogenaz, elastaz, keratinaz gibi spesifik tipte alkalen proteazlar kollogen, elastin, keratin gibi substratlara spesifiklik göstermektedirler. Alkalen proteazlar, peptid bağı koparılabak bölgenin karboksil ucundaki tirozin, fenilalanin ya da lösin gibi aromatik veya hidrofobik amino asit köklerine karşı da spesifiklik göstermektedirler.

(Gupta *et al* 2002b).

Çizelge 2.5 Çeşitli bakteri türlerine ait alkalen proteazların önemli özellikleri

Bakteri	Opt. pH	Opt. Sıcaklık(°C)	Substrat Spesifikliği	MW (kDa)	Diğer özellikler	Referans
<i>Alcaligenes faecalis</i>	9	55	Kazein, BSA, jelatin, azocoll, azocasein	67	-	Thangam ve Rajkumar 2002
<i>Arthrobacter nicotianae</i> 9458	9; 9.5	55-60; 37	$\alpha_{s1}$ ve $\beta$ -casein	55;70-72	-	Smacchi <i>et al</i> 1999
<i>Bacillus</i> sp. JB99	11	70	Kazein	29	Metal iyonlar termostabiliteyi artırıyor	Johnvesly ve Naik 2001
<i>Bacillus</i> sp. NG-27	9.2	40	Kazein	-	90°C'de yarı ömrü 55 dak.	Sumandeep <i>et al</i> 1999
<i>Bacillus</i> sp. KSM-KP43	11	70	Kazein	-	Oksidasyon dirençli	Saeki <i>et al</i> 2002
<i>Bacillus</i> sp. NCDC-180	11;12	50;55	Kazein, sentetik <i>p</i> -nitroanilides	28;29	pH 13.0 üzerinde stabil	Kumar <i>et al</i> 1999
<i>Bacillus</i> sp. PS179	9	75	Azocasein	42	Ca <sup>2+</sup> termostabiliteyi artırıyor	Hutadilok-Towatana <i>et al</i> 1999
<i>Bacillus</i> sp. SSR1	10	40	Azocasein	29	Ca <sup>2+</sup> termostabiliteyi artırıyor	Singh <i>et al</i> 2001
<i>B.brevis</i> MTCC B0016	10.5	37	Azocasein	-	Deterjan uyumlu	Banerjee <i>et. al</i> 1999
<i>B. mojavensis</i>	10.5	60	Kazein	30	Bleach ve SDS stabil, deterjan uyumlu	Beg <i>et al</i> 2002
<i>B. pumilis</i> MK6-5	11.5	50-55	<i>p</i> -nitroanilides	28	Ca <sup>2+</sup> bağımsız	Kumar 2002
<i>Oligotropha carboxydovorans</i> DSM 1227	9	60;50	Kazein,azocasein, azocoll, carbon monooxide dehydrogenase	23	-	Kang <i>et al</i> 1999
<i>Pimelobacter</i> sp. Z-483	9	50	Kazein	23	EDTA dirençli	Oyoma <i>et al</i> 1997
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PST-01	8.5	55	Kazein	38	Organik çözücü dirençli	Ogino <i>et al</i> 1999
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 25419	9.5	48	Azocasein	66.5	-	Romero <i>et al</i> 2001

## 2.8 Alkalen Proteazların Kullanım Alanları

Bakterilerden elde edilen alkalen proteazlar çeşitli endüstri sektörlerinde ve farklı evrensel şirketler tarafından başarılı bir şekilde ticari olarak piyasaya sunulmaktadır. Çizelge 2.6'da alkalen proteazları temel alan ticari ürünler verilmiştir. Deterjan enzimlerindeki başarı spesifik kullanımlar için yeni deterjan proteazlarının araştırılmasına neden olmuştur. Alkazym (Novodan, Kopenhag Danimarka) membran sistemlerinin temizlenmesinde kullanılan önemli bir enzimdir. Membran temizliğinde kullanılan diğer önemli enzimler Tergazyme (Alconox, New York ABD), Ultrasil (Henkel, Düseldorf Almanya) ve P3-pardigm (Henkel-Ecolab, Düseldorf Almanya)'dir. Pronod 153L proteaz enzimi cerrahi malzemelerdeki kan proteinlerinin temizlenmesinde kullanılmaktadır. Bunlara ilaveten alkalen proteazlar kontak lens temizliğinde, moleküler biyolojide nükleik asit izolasyonunda, zehir gibi atıkların kontrolünde, ipeğin plastikten arındırılmasında teknik olarak ilgi görmektedir (Gupta *et al* 2002a). Çizelge 2.6'da ticari bakteriyal alkalen proteazlar, kaynakları, kullanım alanları ve endüstriyel sağlayıcıları sunulmuştur.

Çizelge 2.6 Ticari bakteriyal alkalen proteazlar, kaynakları, kullanım alanları ve endüstriyel sağlayıcıları

Sağlayıcı Firma/Ülke	Ürünün Ticari Adı	Bakteriyal Kaynak	Kullanım Alanı
<b>Novo Nordisk, Danimarka</b>	Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Deterjan, ipek işlenmesi
	Savinase	<i>Bacillus sp.</i>	Deterjan, tekstil
	Esperase	<i>B. lentus</i>	Deterjan, gıda, ipek işlenmesi
	Biofeed pro	<i>B. licheniformis</i>	Yem
	Durazym	<i>Bacillus sp.</i>	Deterjan
	Novozyme 471 MP	-	Fotoğrafik jelatin hidrolizi
	Novozyme 243	<i>B. licheniformis</i>	Diş temizliği
<b>Genencor International, ABD</b>	Nue	<i>Bacillus sp.</i>	Deri
	Purafact	<i>B. lentus</i>	Deterjan
<b>Gist-Brocades, Hollanda</b>	Primatan	Bakteriyal kaynak	Deri
	Subtilisin	<i>B. alcalophilus</i>	Deterjan
	Maxacal	<i>Bacillus sp.</i>	Deterjan
<b>Solvay Enzymes, Almanya</b>	Maxatase	<i>Bacillus sp.</i>	Deterjan
	Opticlean	<i>B. alcalophilus</i>	Deterjan
	Optimase	<i>B. licheniformis</i>	Deterjan
	Maxapem	<i>Bacillus sp</i> protein müh. Varyantı	Deterjan

Çizelge 2.6 Ticari bakteriyal alkalen proteazlar, kaynakları, kullanım alanları ve endüstriyel sağlayıcıları (devam)

<b>Solvay Enzymes, Almanya</b>	HT-proteolytic	<i>B. subtilis</i>	Alkol,yem,gıda,deri,foto. Arıtımı
	Protease	<i>B. licheniformis</i>	Gıda, atık
<b>Amano Pharmaceuticals, Japonya</b>	Proleather	<i>Bacillus sp.</i>	Gıda
	Collogenase	<i>Clostridium sp.</i>	Teknik
	Amano protease S	<i>Bacillus sp.</i>	Gıda
<b>Enzyme Development , ABD</b>	Enzeco alkaline protease	<i>B. licheniformis</i>	Endüstriyel
	Enzeco alkaline protease-L FG	<i>B. licheniformis</i>	Gıda
	Enzeco high alkaline protease	<i>Bacillus sp.</i>	Endüstriyel
<b>Nagasa Biochemicals, Japonya</b>	Biopraxe concentrate	<i>B. subtilis</i>	Kozmetik
	Ps. protease	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Araştırma
	Ps. elastase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Araştırma
	Cryst. Protease	<i>B. subtilis</i> (K2)	Araştırma
	Cryst. Protease	<i>B. subtilis</i> (bioteus)	Araştırma
	Biopraxe	<i>B. subtilis</i>	Deterjan
	Biopraxe SP-10	<i>B. subtilis</i>	Gıda
<b>Godo Shusei, Japonya</b>	Godo-Bap	<i>B. licheniformis</i>	Deterjan, gıda
<b>Rohm, Almanya</b>	Corolase 7089	<i>B. subtilis</i>	Gıda
<b>Wuxi Synder Products, Çin</b>	Wuxi	<i>Bacillus sp.</i>	Deterjan
<b>Advance Biochemicals, Hindistan</b>	Protosol	<i>Bacillus sp.</i>	Deterjan

### 2.8.1 Gıda ve besin endüstrisi

Alkalen proteazlar yüksek gıda değerine sahip protein hidrolizatlarının hazırlanmasında kullanılmaktadır. Protein hidrolizatları kan basıncının düzenlenmesinde, bebek mamalarının formüllerinde, spesifik terapi diyet ürünlerinde ve meyve suları ve bazı içeceklerin raf ömürlerinin artırılmasında kullanılmaktadır. Alkalen proteazlar birçok doğal protein substratının hidrolize edilmesinde kullanılmaktadır. Ticari protein hidrolizatları kazeinden (Miprodan; MD Foods, Viby Almanya), buğdaydan (Lacprodan; MD Foods) ve soya proteininden (Proup; Novo Nordisk, Bagsvaerd, Danimarka) üretilmektedir (Gupta *et al* 2002a). Rebeca *et al* (1991) *Bacillus subtilis* proteazının yüksek gıda değerindeki balık proteini hidrolizatlarının elde edilmesinde kullanılabildiği yayınlamıştır. Sardalya balığından el edilen kas dokusunun *B. licheniformis* alkalen proteazı ile muamele edildiğinde protein hidrolizatındaki angiotensin-1'yi farklılaştıran enzimi inhibe ettiğini yayınlamıştır (Matsui *et al* 1993). Fujimaki *et al* (1970) alkalen proteazı soya proteini hidrolizatlarının üretiminde kullanmıştır. O'Mera and Munro (1984) yağsız et atıklarının alkalen proteaz hidrolizi ile yenilebilir haldeki et haline getirilmesinde kullanılabileceğini yayınlamışlardır. Alkalen proteazların keratinolitik aktiviteleri kuş tüylerinden ve keratin içeren materyallerden protein içeren hayvan yemi elde edilmesinde kullanılmaktadır. Dalev (1990,1994) ve Cheng *et al* (1995) *B. subtilis* ve *B. licheniformis* PWD-1'den elde edilen alkalen proteazlar ile kuş tüyündeki keratinin hidroliz edilebileceğini ve protein konsantrasyonu yüksek hayvan yemi üretiminde kullanılabileceğini yayınlamıştır.

### 2.8.2 Peptid sentezi

Bergman and Frankel-Conrat (1937), proteazların revers-enzimatik reaksiyonunu kullanarak proteaz katalizli peptid sentezinin gerçekleştirilebileceğini yayınladığından bu yana proteazlar yaygın olarak peptid sentezinde kullanılmaktadır. Enzimatik peptid sentezi kimyasal metotlara göre birçok avantaja sahiptir. Reaksiyonlar stearospesifik olarak gerçekleştirilebilir ve reaktanlar yan-zincir korumasına ihtiyaç duymamaktadır (Gupta *et al* 2002a).

Sentetik kimyada proteazların kullanılmasındaki ana kısıtlayıcı faktör susuz koşullarda enzimatik aktivitenin azalmasıdır. Günümüzde Proteazlar kullanılarak dipeptidler (Barros *et al* 1999) ve tripeptidler (So *et al* 2000) başarılı bir şekilde sentezlenmektedir. Organik çözücünün tipi ve doğası proteaz aktivitesi üzerine kuvvetli bir şekilde etki etmektedir. Castro (1999) 14 saf organik çözücünün subtilisinin enzimatik aktivitesi üzerine etkisini araştırmıştır ve subtilisinin ethylenglycol, N-methylformamide, 1,2 ve 1,3-propanediol'e göre gliserolla muamele edildiği zaman 500 kat daha fazla aktivite gösterdiğini yayınlamıştır. Endüstriyel bir proteaz olan Neutrase birçok N<sup>α</sup>-korunmuş dipeptid türevinin asetonitril içerisinde sentezlendiği yayınlanmıştır (Clapes *et al* 1997). N-ucu korunmuş amino asit esterlerinin organik çözücülerde yine endüstriyel bir alkalen proteaz olan Alcalase tarafından katalizlenerek kinetik rezolüsyonunu açıklamıştır (Gupta *et al* 2002a).

### 2.8.3 Deri endüstrisi

Deri işlenmesinde kullanılan hidrojen sülfid ve diğer kimyasallar güvenlik ve çevre açısından oldukça tehlikelidir. Çevresel nedenlerden dolayı kolay kontrolü, hızlı olması, atıkların uzaklaştırılması nedeni ile deri işlenmesinde enzimatik yöntemler tercih edilmektedir (Andersen 1998). Elastolitik ve keratinolitik aktiviteleri sayesinde alkalen proteazlar deri işleme endüstrisinde kullanılabilirler. Proteazlar derinin ıslatılması, kılların uzaklaştırılması ve derinin inceltmesi aşamalarında kullanılabilirler. Enzim uygulaması ile istenmeyen pigmentlerin uzaklaştırarak deri yüzeyini genişletmektedir. Deriden kılların uzaklaştırılması aşamasında, kıl köklerinin şişmesiyle oluşan alkali koşullarda alkalen proteazlar kıl foliküllerindeki proteinlerine etki ederek kolay ve hızlı bir şekilde kılların uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. *B. subtilis* IIQDB32 alkalen proteazı ile koyun derisindeki kılların uzaklaştırılabileceğini yayınlamıştır (Gupta *et al* 2002a).

#### **2.8.4 Endüstriyel ve evsel atıkların giderilmesi**

Proteazlar protein içerikli atık sularda çözünerek sucul sistemlerdeki biyolojik oksijen isteğinin azaltılmasını sağlar. Dalev (1994) *B. subtilis* alkalen proteazını kümeslerdeki kuş tüylerinin uzaklaştırılabilmesinde kullanmıştır. Atık kuş tüyleri kümesin total ağırlığının %5'ini işgal ederken bu atıkların keratin yapısı tamamen parçalandığı için gıda ve yem sanayisinde de kullanılabilir hale gelmiştir. *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* ve *Streptomyces* sp.' ye ait proteolitik enzimlerden ve disülfid azaltıcı ajandan (thioglycolate) oluşan bir formülasyonla borularda tıkanıklığa neden olan kılların parçalanması sağlanmıştır. Bu formülasyon Genex tarafından patentlenmiş ve günümüz marketlerinde ticari olarak satılmaktadır (Jacobson *et al* 1985).

#### **2.8.5 Fotoğraf endüstrisi**

Alkalen proteazlar X-ışını veya fotoğrafik filmlerde gümüşün uzaklaştırılması için kullanılmaktadır. Bu filmlerin içinde buldukları jelatin tabaka %1.5-2 oranında gümüş içermektedir. Bu gümüş filmin yakılmasıyla uzaklaştırılmaktadır ki bu işlem çevreye geri dönüşümsüz zarar vermektedir. Polyesterden yapılan filmlerde ise bu işleme gerek kalmamaktadır. Jelatine bağlı halde bulunan gümüş protein tabakanın proteolitik enzimlerle muamelesi sonucu uzaklaştırılabilmektedir. Jelatinin enzimatik hidrolizi ile sadece gümüş geri kazanılmış olmaz aynı zamanda polyester bazlı film tekrar kullanılabilir hale gelir (Gupta *et al* 2002a). *B. subtilis*'e ait alkalen proteaz ile 50-60°C'de 30 dakika muamele edilen jelatin tabaka ile gümüş uzaklaştırılabildiği belirtilmiştir (Fujiwara *et al* 1991).

#### **2.8.6 Medikal kullanımları**

Alkalen proteazlar medikal önemi olan ürünlerin geliştirilmesinde de kullanılmaktadır. Kudrya and Simonenko (1994) *B. subtilis* 316M'nin elastolitik aktivitesini açıklayarak elastoterez enzimini kullanarak yanık, yatak yaraları, çıban ve derin apselerin

tedavisinde kullanılabileceğini açıklamıştır. Kim *et al* (1996) *Bacillus* sp. CK 11-4 suşunun alkale proteazının fibrinolitik aktivitesini trombolitik ajan olarak kullanmıştır.

### **2.8.7 İpek işlenmesi**

Proteazların en az kullanıldığı alanlardan birisi ipek endüstrisidir. Ham ipeğin %25'ini oluşturan serisin ham ipek ipliklerinin etrafını çevrelemektedir. Ham ipeğe koruyuculuk sağlayan serisin ya da ipek zankı olarak adlandırılan koruyucu tabakanın ipek ipliklerinin boyama aşamasından önce uzaklaştırılması gerekmektedir Serisin kontrollü bir şekilde nişasta kullanılarak ipek iplikleri çekilerek uzaklaştırılmaktadır. Bu yöntem oldukça pahalıdır ve alternatif olarak ipeğin boyanmasından önce enzim preparatlarının kullanılması önerilmiştir (Puri 2001). Çok az sayıda ipekten serisinin uzaklaştırılmasında kullanılmak üzere proteazların kullanıldığı patentler alınmıştır (Gupta *et al* 2002a).

### **2.8.8 Deterjan Endüstrisi**

Deterjan proteazları ile yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu konudaki çalışmalar daha çok evsel kuru temizleme deterjanlarının geliştirilmesi için yapılmaktadır. Kuru temizleme deterjanlarında kullanılmadan önce evsel bulaşık makine deterjanlarında ve hem endüstriyel hem de kurumsal temizleme deterjanlarında kullanımı oldukça popülerdi. Deterjan formüllerinde kullanılan proteazların seçiminde farklı parametreler bulunmaktadır. Deterjan proteazlarının seçimindeki önemli parametrelerden biri pI değeridir. Deterjan solüsyonun pH değeri enzimin pI değeri ile uyumlu olduğun zaman deterjan proteazların en etkili şekilde kullanılabildiği bilinmektedir. Deterjan proteazının seçilmesinde pI değerinin yanı sıra deterjan bileşenleri ile, parfümlerle, surfaktanlarla, beyazlatıcı kimyasallarla, yıkama esnasındaki pH ve sıcaklık değerleriyle, deterjan solüsyonun iyonik gücüyle uyumluluğu, tamamen uzaklaştırılabilmesi ve kullanım ömrü enzimin deterjanlarda kullanımını belirlemektedir. Enzimin EDTA'ya karşı stabil olması deterjan formüllerine eklenmesinde bir avantajdır. Deterjanlara eklenecek olan enzimin metal kofaktöre

ihtiyaç duymaması tercih edilir. Çünkü deterjanlar yüksek miktarda şelat ajanı içermektedir ve metal iyonlarına bağlanan şelatların deterjan solüsyonundan uzaklaştırılması mümkün değildir (Gupta *et al* 2001a).

Deterjanlar yüksek sıcaklık derecelerinde kullanılarak yıkama işlemi gerçekleştirilmektedir. Ancak sentetik ipliklerin yüksek sıcaklıklarda tolerans gösterememesi nedeni ile düşük sıcaklık derecelerinde aktivite gösteren alkalen proteazlara ilgi artmaya başlamıştır. Bu durum enzim araştırmacılarını düşük sıcaklıklarda aktivite gösteren yeni alkalen proteazların araştırılmasına itmiştir. Japonya'da Novo Nordisk Bioendüstrisi 'Kannase' adı verilen 10-20°C'de aktivite gösteren deterjan proteazını geliştirmiştir.

İyi bir deterjan proteazı okside edici ajanlara ve ağartıcı kimyasallar varlığında stabil olmalıdır. Ticari olarak kullanılan enzimlerin çoğu ağartıcı ve okside edici ajanlar varlığında stabil değildir. Enzim bazlı deterjanlar için daha iyi stabilizeye sahip biyomühendislik ürünü enzimler üretmek için rekombinant DNA teknolojisinin kullanımı öne çıkmaktadır. Protein mühendisliği ile var olan amino asit kökleri değiştirilerek ağartıcı ve okside edici ajanlara karşı stabilitenin artırılabilceği açıklanmıştır (Estell *et al* 1985, Bech *et al* 1993, Wolff *et al* 1996).

Alkalen proteaz sınıfının ticari başarısı araştırmacıları pH ve sıcaklık kinetiği yönünden, protein mühendisliği teknikleri ve kimyasal modifikasyonlarla aktif bölgedeki amino asit köklerinin belirlenmesi ve X-ışını kristallografisi yöntemleri ile daha sağlam yeni enzimlerin araştırılmasına yönlendirmiştir. Gelecekte protein mühendisliği ve rekombinant DNA teknolojisi ile alkalen proteazların birçok yeni özelliği ortaya çıkacaktır. Birçok endüstride alkalen proteazlar önemli rol oynamaktadır. Bu enzimlerin potansiyelleri kullanım alanlarından daha fazladır ve gelecekte kullanım alanları daha da artması beklenmektedir (Gupta *et al* 2002b).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Kullanılan Bakteri İzolatları ve Standart Suş

Bu çalışmada toplam 57 adet bakteri izolatu incelenmiş olup, bunlardan 46'sı termofilik 2'si halofilik olmak üzere 48 izolat Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı kültür stoklarından, 9'u ise topraktan izole edilmiştir. Bir alkalen proteaz üreticisi standart alkalifilik bakteri suşu *Bacillus licheniformis* DSM 13 ise DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)'den sağlanmıştır.

#### 3.2 Bakteri İzolasyonu ve Alkale Proteaz Üreticisi İzolatların Belirlenmesi

Bakterilerin izolasyonu amacı ile deterjan sularının akması nedeni ile alkali toprak özelliğindeki bir oto yıkama tesisi civarından toplanan 5 adet toprak örneği, pH 10.0'da Nutrient Broth (Merck 1.05443) besiyerine, 0.25-0.40 g olacak şekilde eklenip 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra, gelişmenin görüldüğü örneklerden steril %0.85 tuz solüsyonu ile seri seyreltmeler yapılmıştır. Alkale proteaz üreticisi izolatların belirlenmesi için, Erarslan vd. (2004) uyguladığı Skim Milk Agar besiyeri modifiye edilerek kullanılmıştır (%0.1 dekstrozu, %0.2 pepton, %0.5 yeast extract, %0.1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, %0.02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, %5 skim milk, %3 agar). Skim milk, ayrıca sterilize edilmiş ve sterilizasyondan sonra skim milk eklenen besiyerinin pH'sı %10 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile 7.0, 9.0 ve 10.0'a ayarlanmıştır.

Mezofilik izolatlar 37°C'de, termofilik izolatlar 55°C'de 72 saat inkübe edilmiş olup inkübasyon sonunda proteaz aktivitesine sahip izolatlar yağsız süt tozunun (skim milkin) hidrolizi sonucunda koloni çevresinde oluşturdukları proteolitik zonun varlığına bağlı olarak belirlenmiştir.

### 3.3 Gram Boyama, Katalaz Aktivitesi ve Faz Kontrast Mikroskopik İnceleme

Nutrient Agar besiyerinde 37°C’de 18-24 saat geliştirilmiş kültürlerden hazırlanan preparatlar Gram boyama yapılarak immersiyon objektifi ile ışık mikroskopunda incelenmiştir. Hücre morfolojileri ve hareket yetenekleri, 15 saatlik sıvı kültürlerden hazırlanan preparatlar ile 100’lük büyütmede faz kontrast mikroskopunda incelenmiştir. Katalaz aktivitesi, Nutrient Agar besiyerinde 37°C’de 18-24 saat geliştirilmiş kültürler ile gerçekleştirilmiş olup lam üzerine alınan bakteri kolonisi %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele edilmiştir. Oksijenden oluşan kabarcığa göre bakteriler katalaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. İzolatların faz kontrast mikroskobu ile spor oluşturma özelliklerine göre spor pozisyonları ve şekilleri saptanmıştır. Spor oluşumu 37°C’de 18-24 saatlik inkübasyon süresi sonunda belirlenmiştir. Spor oluşturan izolatlar; spor şekli (Oval, Elipsoidal, Yuvarlak), vejetatif hücredeki spor pozisyonu (Sentral, Subterminal, Terminal) ve şişkinlik oluşturup oluşturmaması açısından incelenmiştir (Claus and Berkeley 1986).

### 3.4 Fenotipik Karakterizasyon

İzolatların fenotipik özellikleri Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology (Sneath *et al* 1999)’ye göre yapılmış ve kullanılan besiyerlerinin bileşimleri ve inkübasyon süreleri EK 2’de verilmiştir.

### 3.5 Alkalen Proteaz Üretim Koşulları ve Hücre Dışı Enzim Elde Edilmesi

Hücre dışı enzim elde etmek için, pH 7.0 ve 9.0’luk Skim Milk Agar besiyerinde 18 saat inkübasyon sonunda aktifleştirilen izolatlar ve *Bacillus licheniformis* DSM 13’ün yoğunluğu %0.85 tuz çözeltisinde, 660 nm’de absorbansı 0.2-0.4 aralığında olacak şekilde ayarlanmıştır. Gessesse *et al* (1997) tarafından belirlenen sıvı besiyeri modifiye edilerek alkalen proteaz üretim miktarlarının belirlenmesi için kullanılmıştır. Belirlenen besiyerinin içeriği g/l olarak litrede; 5 g kazein, 5 g pepton, 2 g yeast extract, 5 g NaCl,

0.2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.1 g CaCl<sub>2</sub>, 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> olup, sterilize edildikten sonra %10 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile besiyeri pH' sı 7.0 ve 9.0 olarak ayarlanmıştır. Bakteriler, pH 7.0 ve 9.0 olan 5ml'lik sıvı besiyerine %10 oranında aşılanıp bunlardan mezofilik izolatlar 37°C'de, termofilik izolatlar ise 55°C'de 200 rpm'de çalkalanarak 48 ve 72 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda +4°C'de 5000 rpm'de, 20 dakika santrifüj edilerek, elde edilen biyomasın yaş ağırlığı belirlenip, besiyeri üst sıvısı alkalen proteaz kaynağı olarak kullanılmıştır.

### 3.6 Tirozin Konsantrasyon Eğrisi

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan tirozinin mikromolar ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi için 12,5 mg/ml stok tirozin destile suda çözülmüş ve bu stok çözeltiliden 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, 100, 200 µg/ml olacak şekilde seyreltmeler yapılmıştır. Hazırlanan seyreltmelerden 0.5ml alınmış ve üzerine sırasıyla 2.5 ml 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile 0.5 ml 1N Folin-ciocalteu's phenol (Sigma F9252) çözeltilisi eklenerek 30 dakika 30°C'de bekletilmiştir. Bu süre sonunda her bir dilüsyonun 660 nm'deki optik yoğunluğu ölçülmüştür. Bu yolla ekstinksiyon katsayısı, okutulan absorbansa karşı µM tirozin konsantrasyon eğrisinin eğiminden hesaplanmıştır.

### 3.7 Enzim Ünitesinin Tanımı

Bir ünite (U/ml) alkalen proteaz, dakikada 1 µg tirozinin açığa çıkması için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanmış ve aktivite hesaplamaları aşağıdaki formüle göre yapılmıştır (Erarslan vd. 2005)

$$\text{Enzim Aktivitesi(U/ml/dakika)} = \frac{(\text{OD660/eğim}) \times \text{Toplam hacim(ml)}}{\text{Enzim hacmi(ml)} \times \text{İnkübasyon süresi (dak.)}}$$

Örneğin;

OD: Optik yoğunluk

Eğim: Tirozinin 30°C'deki mikromolar ekstinksiyon katsayısı (0.0044 µg/ml)

Toplam Hacim: Toplam hacim (3.5 ml)

Enzim Hacmi: 0.5 ml

İnkübasyon Süresi: 30 dakika

### **3.8 Alkalen Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi**

Alkalen proteaz aktivitesinin belirlenmesinde, Takami *et al* (1989) belirttiği yöntem kullanılmış olup, farklı olarak hammersten kazein yerine kazein (Sigma C4) substrat olarak kullanılmıştır. %0.6 kazein içeren pH 9.0 ve 10.0'luk 50 mM Glisin-NaOH tamponunun 2.5 ml'si ile 0.5ml besiyeri üst sıvısı karıştırılarak 20 dakika 37°C'de inkübe edilmiş ve süre sonunda reaksiyon 2.5 ml 0.1M TCA ile durdurulduktan sonra 37°C'de 30 dakika bekletilip filtre kağıdından süzölmüştür. Filtrasyon sonucu elde edilen süzöntüye 2.5 ml 0.5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile 0.5 ml 1N Folin-ciocalteu's phenol (Sigma F9252) reaktifi eklenerek 30 dakika oda koşulunda inkübe edilmiş ve 660 nm'de absorbansı ölçölmüştür. Kazeinin hidrolizi sonucu dakikada 1µg tirozinin açığa çıkması için gerekli enzim miktarı bir ünite alkalen proteaz aktivitesi (U/ml) olarak belirlenmiş ve enzim aktivitesi deneyi bir örneğe ait 3 paralel tüpün 3 kez tekrar edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Hücre başına düşen enzim üretimini belirlemek için elde edilen enzim aktiviteleri biyomas ağırlığına bölünmüştür ve hücre başına en yüksek alkalen proteaz enzimini üreten izolatın APT5 olduğu belirlenerek bundan sonraki denemeler bu izolat üzerinden gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesi'nde kullanılan kimyasalların hazırlanışları ve içerikleri EK 1'de verilmiştir.

### **3.9 Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırılması**

Yüksek oranda enzim ürettiği belirlenen APT5 izolatı, Skim Milk Agar besiyerinde (pH 9.0) 37°C'de 18 saat aktifleştirilmiş ve bakteri süspansiyonu hazırlanarak absorbansı 600nm'de 0.3'e ayarlanmış ve 6 ml'lik pH 9.0'daki kazeinli sıvı besiyerine %10 olacak şekilde aşılıp, 37°C'de 200 rpm karıştırma hızında 18 saat inkübe edilmiştir. Süre

sonunda, aktif kültür %1 olacak şekilde toplam 300 ml'lik pH 9.0'luk kazeinli sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 200 rpm'de 3 gün boyunca geliştirilmiştir. Bu süre sonunda elde edilen bakteri kültürü, 7500 rpm'de +4°C'de 20 dakika santrifüj edilerek üst sıvı alkalen proteaz enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Besiyeri üst sıvısına -20°C'de soğutulmuş asetondan %85 oranında ilave edilip -20°C'de 1 gece bekletilmiş, 7500 rpm' de +4°C'de 20 dakika santrifüj edilerek çöktürülen enzim soğuk %100'lük aseton ile 7500 rpm'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edilerek pelet yıkanmıştır. Oda koşullarında kurutulmuş pelet 4.7 ml 50 mM pH 10.0'luk Glisin-NaOH tamponu ile çözülmüş ve 50 mM pH 9.0'luk Glisin-NaOH tamponu kullanılarak BioRad iyon değişimi kolon kromatografisi ile bir anyon değiştirici olan kolondan geçirilmiştir.

### **3.10 Sıcaklık ve pH'ın Alkalen Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi**

Alkalen proteazın optimum aktivite sıcaklığı pH 10.0'luk 50 mM Glisin-NaOH tamponunu içerisinde 30°C, 35°C, 37°C , 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 75°C ve 85°C'lik sıcaklıklar denenerek belirlenmiştir. Optimum pH değerinin belirlenmesi için, enzim aktivitesi pH 8.0 ile pH 13.0 aralığındaki farklı tamponlar kullanarak optimum sıcaklık derecesinde ölçülmüştür. pH 8.0-11.5 aralığında 50 mM'lık Glisin-NaOH tamponu, pH 12.0 ve 13.0 aralığında ise 200 mM'lık Glisin-NaOH tamponu kullanılmıştır.

### **3.11 Alkalen Proteaz Enziminin Sıcaklık ve pH Stabilitesinin Belirlenmesi**

Alkalen proteazın termal stabilitesini belirlemek amacıyla enzim, aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değerinde 20 dakika ve 4 saat bekletildikten sonra aktivitesi ölçülmüş ve bağıl aktivitesi %100 olarak tanımlanmıştır. pH stabilitesinin belirlenmesi için ise enzimin optimum aktivite gösterdiği pH'da 30°C'de 20 dakika ve 3 gün boyunca muamele edildikten sonra kalan aktivitesi ölçülmüştür. Sıcaklığa veya pH değişikliğine

tabi tutulmamış enzim örneğinin aktivitesi %100 olarak alınmış ve diğer sonuçlar ona göre bağıl aktivite (%) cinsinden birbiriyle kıyaslanmıştır.

### **3.12 Metal İyonlarının Alkalen Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi**

$Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Fe^{++}$  ve  $Mn^{++}$  iyonların alkalen proteaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. 5 mM konsantrasyondaki  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  ve  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  çözeltileri, 50 mM pH 11.0'lik Glisin-NaOH tamponu içerisinde hazırlanmış ve bu tamponlar ile enzim aktivitesi ölçülmüştür. Metal iyonu ile muamele edilmemiş enzimin aktivitesi %100 olarak alınmış ve diğer sonuçlar bağıl aktivite (%) cinsinden hesaplanmıştır.

### **3.13 Hidrojen Peroksidin Alkalen Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin**

#### **Belirlenmesi**

Alkalen proteaz enzimi %1 ve %5'lik hidrojen peroksit ile birebir oranında muamele edilerek, 2 saat 30°C'de inkübe edildikten sonra enzim aktivitesi ölçülmüştür. Hidrojen peroksit ile muamele edilmemiş enzimin aktivitesi %100 olarak kabul edilmiş ve sonuçlar bağıl aktivite (%) cinsinden hesaplanmıştır.

### **3.14 İnhibitörlerin ve Sürfaktanların Alkalen Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin**

#### **Belirlenmesi**

1 mM ve 10 mM PMSF (Phenil methyl sulphonyl fluoride), 2.5 mM EDTA ve 1 M üre ile %1'lik Tween-20, Tween-80, Triton X-100 ve %0.5 ve %1'lik SDS, APT5 alkalen proteaz enzimi ile birebir oranında muamele edilerek, 2 saat 30°C'de inkübe edildikten sonra enzim aktivitesi ölçülmüştür. İnhibitör ve deterjanla muamele edilmemiş enzimin aktivitesi %100 olarak kabul edilmiş ve tüm sonuçlar bağıl aktivite (%) olarak hesaplanmıştır.

### 3.15 Poliakrilamid Jel Elektroforez

Kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların protein içeriklerini belirlemek üzere %4'lük yığıma jeli ve %10'luk ayırma jeli ile SDS-PAGE yapılmıştır (Laemli *et al* 1970). Bunun için 500 µl'lik kolon örnekleri vakumlu santrifüjde konsantre edildikten sonra SDS-örnek tamponu eklenmiş ve 3 dakika kaynayan suda bekletilerek protein denatürasyonu sağlanmıştır. Örneklerdeki protein miktarı yarı kantitatif olarak belirlendikten sonra yaklaşık eşit miktarlarda kuyucuklara yüklenmiş, 25 ve 30 mA'de jelde ayrılmış ve %0.2'lik Coomassie Brilliant Blue R250 ile boyanarak resmi çekilmiştir (Esen 1978).

Kolon kromatografisi ile elde edilen örneklerdeki alkalen proteaz enzim proteininin jelde belirlenmesi için %4 yığıma jeli ve %10 ayırma jeli bulunduran Native-PAGE (Laemli *et al* 1970) kullanılmış olup jele %1 oranında süt tozu (skim milk) karıştırılmıştır. Bunun için 500 µl'lik kolon örnekleri vakumlu santrifüjde konsantre edilmiş ve Native-örnek tamponu eklenmiş, 25 ve 30 mA'de elektroforezde ayrılmıştır. Elektroforez sonrası jel, önce % 0.25'lik Triton X-100 ve daha sonra ise 0.1 M Glisin-NaOH tamponu (pH10.0) ile 35°C'de 1'er saat inkübe edilmiş, iki kez tekrarlanan elektroforez sonrası elde edilen jellerden birisinde gümüş nitrat (BioRad Silver Stain Plus kiti) diğesinde ise aktivite boyaması yapılmıştır (Erarslan vd. 2004). Jeldeki alkalen proteaz aktivitesini belirlemek için %0.2'lik Coomassie Brilliant Blue R250 ile boyanarak dekolorize edilmiş ve enzimin etkisiyle oluşan proteolitik zonlar açık, diğerbölgeler mavi renkte olmak üzere resmi çekilmiştir.

SDS-PAGE'inde kullanılan stoklar ve hazırlanışları EK3'te, Native-PAGE'inde kullanılan stoklar ve hazırlanışları EK4'de verilmiştir.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1 Araştırılan Bakteri İzolatları

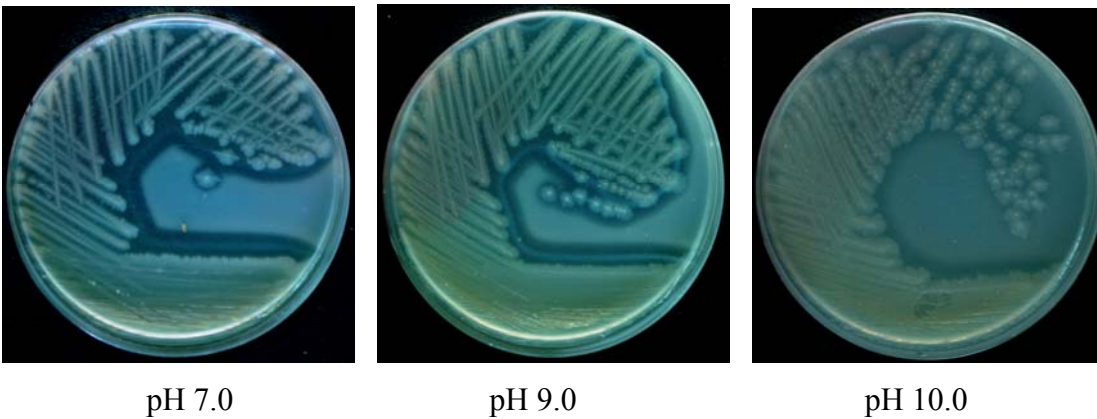
Alkalen proteaz üretim kapasitesine sahip bakteri izolatlarının seçimi amacıyla A.Ü. Biyoloji Bölümü kültür koleksiyonundan sağlanan 46 adet termofilik *Bacillus* spp., 2 adet halofilik *Bacillus* spp. ve topraktan izole edilen 9 adet alkalifilik izolatın kodları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Alkalen proteaz aktivitesi yönünden test edilen izolatlar ve kodları

Bakteri İzolatu	Kodu
Termofilik <i>Bacillus</i> spp. (46 adet)	A148, A3210, A335, A351a, A353, A391a, A392b, A384, A403, A404, A412b, A413, C304, D52b, D98a, D202a, D203b, D204, D211, D213, D214, D221a, D222b, D232a, D242b, D243, D273a, D376b, D401a, D404, D413, D433a, D463, D486, D487, D503, E173b, E183, E184, E184b, E206, E208a, E208b, E272, E287, E331
Halofilik <i>Bacillus</i> spp. (2 adet)	TG11, TG20
Alkalifilik Bakteri İzolatları (9 adet)	APT1, APT2, APT3, APT4, APT5, APT6, APT7, APT8, APT9

## 4.2 Proteaz Aktivitesine Sahip Bakteri İzolatları

Skim Milk Agar besiyerindeki skim milk hidrolizi sonucu proteolitik zon oluşturan izolatlar, proteaz aktivitesine sahip olan izolatlar olarak belirlenmiştir. Standart olarak kullanılan *Bacillus licheniformis* DSM13'ün, pH 7.0, 9.0 ve pH 10'luk Skim Milk Agardaki yağsız süt tozunu (skim milk) hidroliz ederek zon oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.1). Tek bir bakteri kolonisinin etrafındaki zonun büyüklüğü pH7.0'de 0.4cm, pH9.0'da 0.3cm ve pH10.0'da 0.2cm olarak ölçülmüştür. Elli yedi adet bakteri izolatından 32'sinin pH 7.0, 9.0 veya 10.0'da proteolitik aktiviteye sahip olduğu görülmüş olup inkübasyon sıcaklığı, pH değerleri, bu pH değerlerindeki proteolitik zonun büyüklüğü ve zon oluşum zamanı Çizelge 4.2'de verilmiştir. Bu değerlere göre proteolitik aktiviteye sahip toplam 32 izolattan 18'inin sadece pH 7.0'de, 4'ünün pH 7.0 ve 9.0'da, 10'unun ise pH 7.0, 9.0 ve 10'da proteolitik aktivite gösterdiği ve izolatlara göre zon oluşum süresinin 24, 48 veya 72 saat olabildiği görülmüştür. Diğer yandan, 21 adet termofilik *Bacillus* spp.'den sadece 3'ü pH 9.0'da proteolitik aktivite gösterebilirken, her iki halofilik *Bacillus* spp. ve 9 adet APT izolatından 8'i, pH 10.0'da proteolitik aktivite göstermiştir. Proteolitik aktiviteye sahip bakteri izolatlarının Skim Milk Agar besiyerinde oluşturdukları proteolitik zonlar Şekil 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5'de verilmiştir.



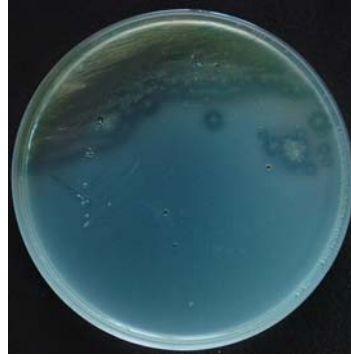
Şekil 4.1 *Bacillus licheniformis* DSM13'ün pH 7.0, 9.0 ve 10.0'luk Skim Milk Agar besiyerlerinde alkalen proteaz aktivitesine bağlı olarak oluşturduğu zonlar

Çizelge 4.2 Skim Milk Agarda proteolitik aktivite gösteren 32 adet izolatın gelişim gösterdikleri pH, bu pH değerindeki tek koloni etrafındaki proteolitik zonun büyüklüğü ve gelişim sıcaklıkları ile zon oluşum zamanları

İzolat	pH	Proteolitik Zonun Büyüküğü (cm)	Sıcaklık	Zon Oluşum Zamanı(Saat)
A148	7.0	0.2	55°C	72
A335	7.0	0.3	55°C	48
A351a	7.0 ve 9.0	0.2 ve 0.1	55°C	48
A391a	7.0	0.2	55°C	24
A392b	7.0	0.5	55°C	24
A384	7.0	0.4	55°C	24
A403	7.0	0.4	55°C	24
A404	7.0	0.3	55°C	24
A412b	7.0	0.2	55°C	24
A413	7.0	0.3	55°C	24
C304	7.0	0.2	55°C	72
D98a	7.0	0.2	55°C	72
D221a	7.0	0.3	55°C	48
D232a	7.0	0.2	55°C	48
D242b	7.0	0.2	55°C	72
D243	7.0	0.2	55°C	48
D401a	7.0	0.2	55°C	72
D433a	7.0	0.3	55°C	48
D487	7.0	0.2	55°C	72
E183	7.0 ve 9.0	0.3 ve 0.1	55°C	48
E287	7.0 ve 9.0	0.4 ve 0.2	55°C	24
TG11	7.0, 9.0 ve 10.0	0.5, 0.4 ve 0.4	37°C	24
TG20	7.0, 9.0 ve 10.0	0.4, 0.2 ve 0.2	37°C	24
APT1	7.0, 9.0 ve 10.0	0.4, 0.8 ve 0.3	37°C	24
APT2	7.0, 9.0 ve 10.0	0.9, 2.0 ve 0.5	37°C	24
APT3	7.0, 9.0 ve 10.0	3.0, 2.0 ve 1.2	37°C	24
APT4	7.0, 9.0 ve 10.0	0.2, 0.2 ve 0.1	37°C	24
APT5	7.0, 9.0 ve 10.0	<0.1, 0.2 ve 0.2	37°C	48
APT6	7.0 ve 9.0	0.2 ve 0.1	37°C	72
APT7	7.0, 9.0 ve 10.0	0.6, 0.2 ve 0.4	37°C	24
APT8	7.0, 9.0 ve 10.0	0.5, 0.3 ve 0.1	37°C	24
APT9	7.0, 9.0 ve 10.0	0.4, 0.3 ve 0.2	37°C	24



A148 pH 7.0



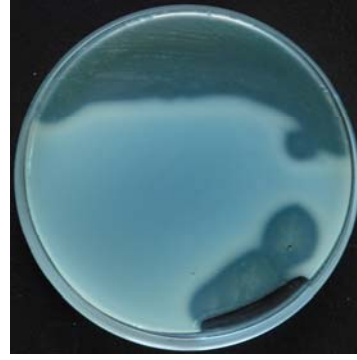
A335 pH 7.0



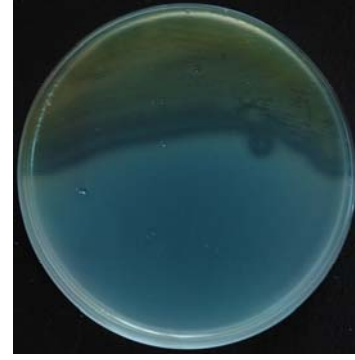
A384 pH 7.0



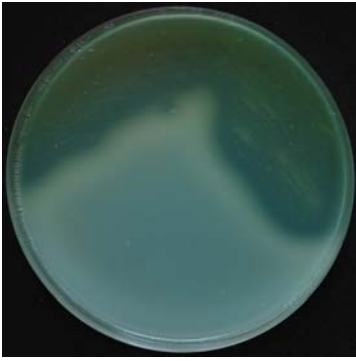
A391a pH 7.0



A392b pH 7.0



A403 pH 7.0



A404 pH 7.0

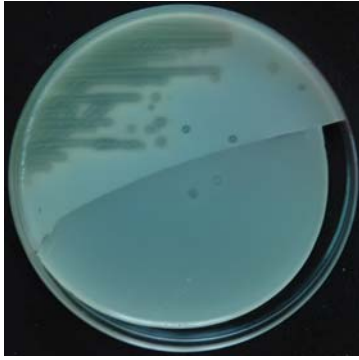


A412b pH 7.0

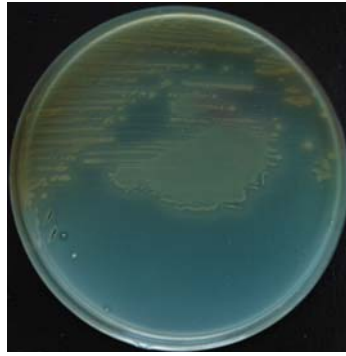


A413 pH 7.0

Şekil 4.2 Skim Milk Agar (pH 7.0) besiyerinde Termofilik *Bacillus* spp. izolatlarının oluşturdukları proteolitik zonlar.



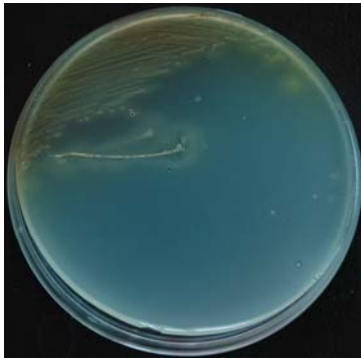
C304 pH 7.0



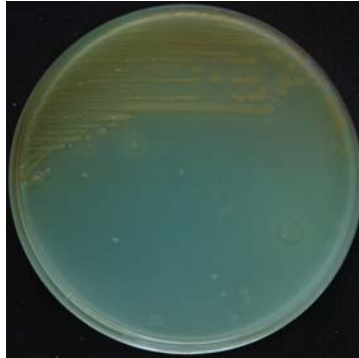
D221a pH 7.0



D232a pH 7.0



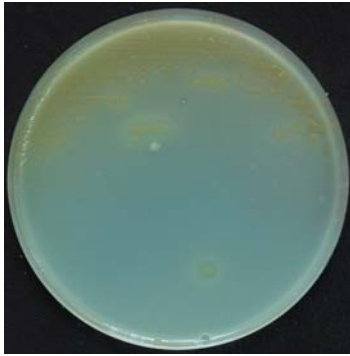
D242b pH 7.0



D243 pH 7.0



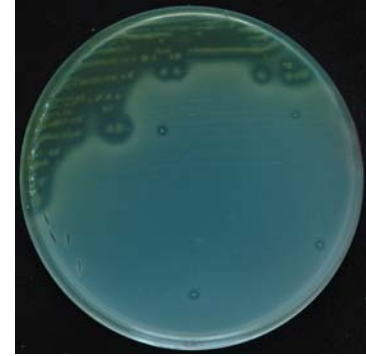
D433a pH 7.0



D487 pH 7.0

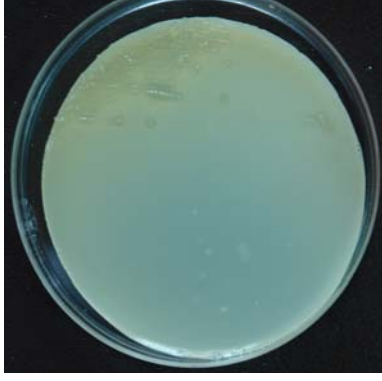


D98a pH 7.0



D401a pH 7.0

Şekil 4.2 Skim Milk Agar (pH 7.0) besiyerinde Termofilik *Bacillus* spp. izolatlarının oluşturdukları proteolitik zonlar (devam)



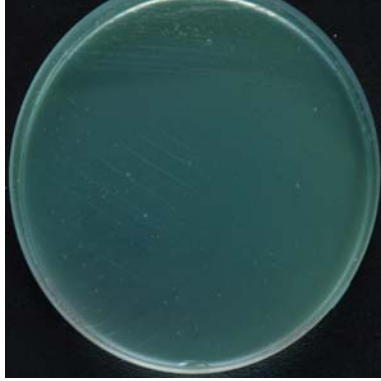
A351a pH 7.0



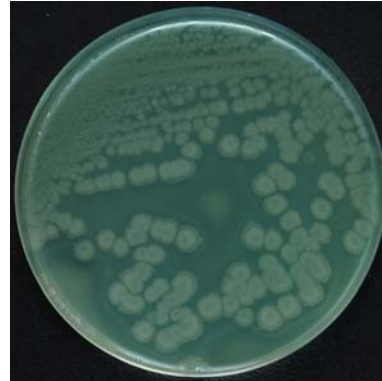
A351a pH 9.0



E183 pH 7.0



E183 pH 9.0

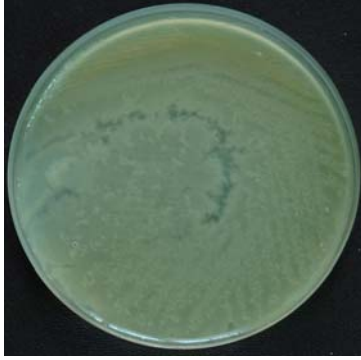


E287 pH 7.0



E287 pH 9.0

Şekil4.3 Termofilik *Bacillus* spp. izolatlarının Skim Milk Agar (pH 7.0 ve pH 9.0) besiyerinde oluşturdukları proteolitik zonlar



TG 11 pH 7.0



TG 11 pH 9.0



TG 11 pH 10.0



TG 20 pH 7.0

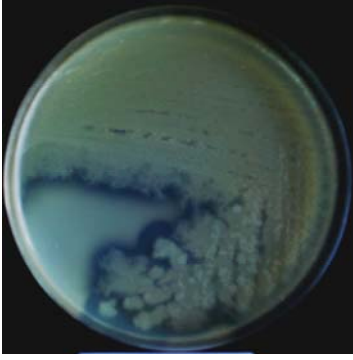


TG 20 pH 9.0



TG 20 pH 10.0

Şekil 4.4 Halofilik *Bacillus* spp. izolatlarının Skim Milk Agar (pH 7.0, 9.0 ve pH 10.0) besiyerinde oluşturdukları proteolitik zonlar



APT1 pH 7.0



APT1 pH 9.0



APT1 pH 10.0



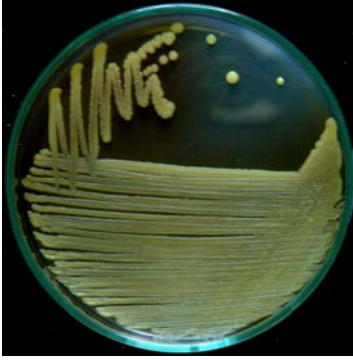
APT2 pH 7.0



APT2 pH 9.0



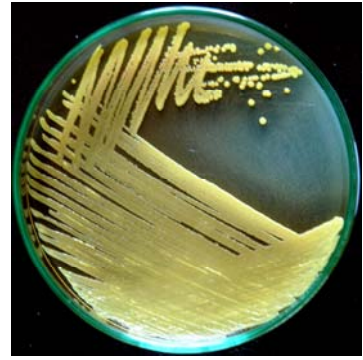
APT2 pH 10.0



APT3 pH 7.0

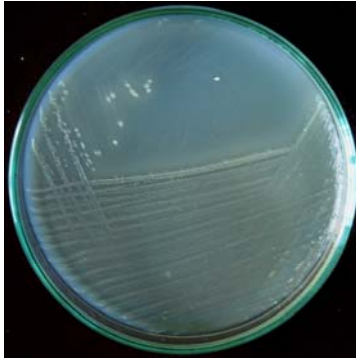


APT3 pH 9.0



APT3 pH 10.0

Şekil 4.5 APT İzolatlarının Skim Milk Agar (pH 7.0, 9.0 ve 10.0) besiyerinde oluşturdukları proteolitik zonlar



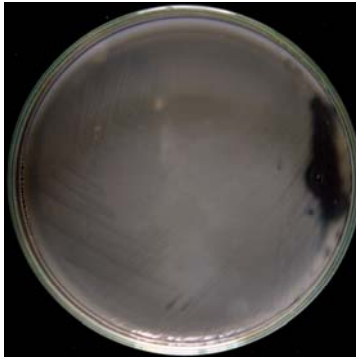
APT4 pH 7.0



APT4 pH 9.0



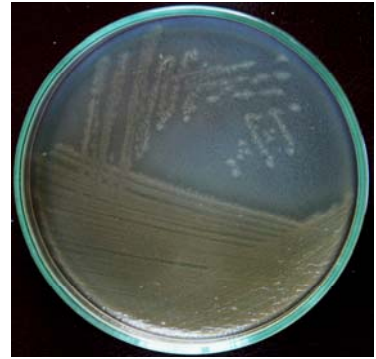
APT4 pH 10.0



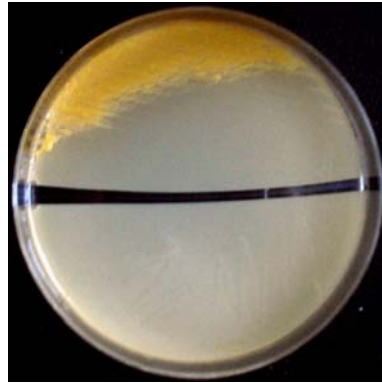
APT5 pH 7.0



APT5 pH 9.0



APT5 pH 10.0



APT6 pH 7.0

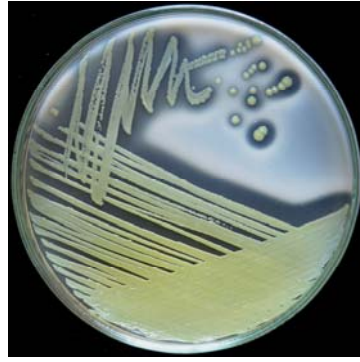


APT6 pH 9.0

Şekil 4.5 APT İzolatlarının Skim Milk Agar (pH 7.0, 9.0 ve 10.0) besiyerinde oluşturdukları proteolitik zonlar (devam)



APT7 pH 7.0



APT7 pH 9.0



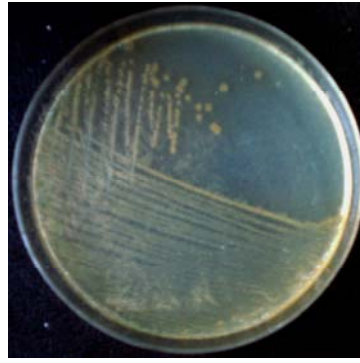
APT7 pH 10.0



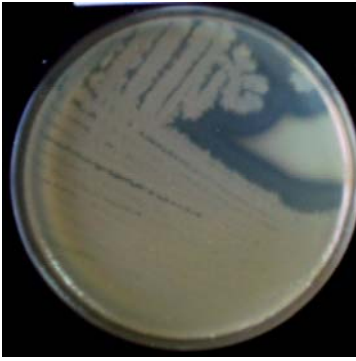
APT8 pH 7.0



APT8 pH 9.0



APT8 pH 10.0



APT9 pH 7.0



APT9 pH 9.0



APT9 pH 10.0

Şekil 4.5 APT İzolatlarının Skim Milk Agar (pH 7.0, 9.0 ve 10.0) besiyerinde oluşturdukları proteolitik zonlar (devam)

Sonuç olarak, 57 adet izolat içerisinde Skim Milk Agar besiyerinde proteolitik zon oluşturabilen 32 adet izolattan pH 9.0 veya 10.0'luk Skim Milk Agar besiyerinde gelişme göstererek zon oluşturabilen toplam 14 adet izolat (Çizelge 4.3) ve standart olarak *Bacillus licheniformis* DSM13 seçilerek alkalen proteaz üretim yetenekleri yönünden incelenmiştir.

Çizelge 4.3 Alkalen Proteaz üretim yetenekleri belirlenen bakteri izolatları ve proteolitik aktivite gösterdikleri pH değerleri

No	İzolatlar	pH
1	APT1	7.0, 9.0 ve 10.0
2	APT2	7.0, 9.0 ve 10.0
3	APT3	7.0, 9.0 ve 10.0
4	APT4	7.0, 9.0 ve 10.0
5	APT5	7.0, 9.0 ve 10.0
6	APT7	7.0, 9.0 ve 10.0
7	APT8	7.0, 9.0 ve 10.0
8	APT9	7.0, 9.0 ve 10.0
9	TG11	7.0, 9.0 ve 10.0
10	TG20	7.0, 9.0 ve 10.0
11	APT6	7.0, 9.0
12	A351a	7.0, 9.0
13	E183	7.0, 9.0
14	E287	7.0, 9.0

### 4.3 Alkalen Proteaz Üreticisi İzolatların Bazı Biyokimyasal ve Morfolojik Özellikleri

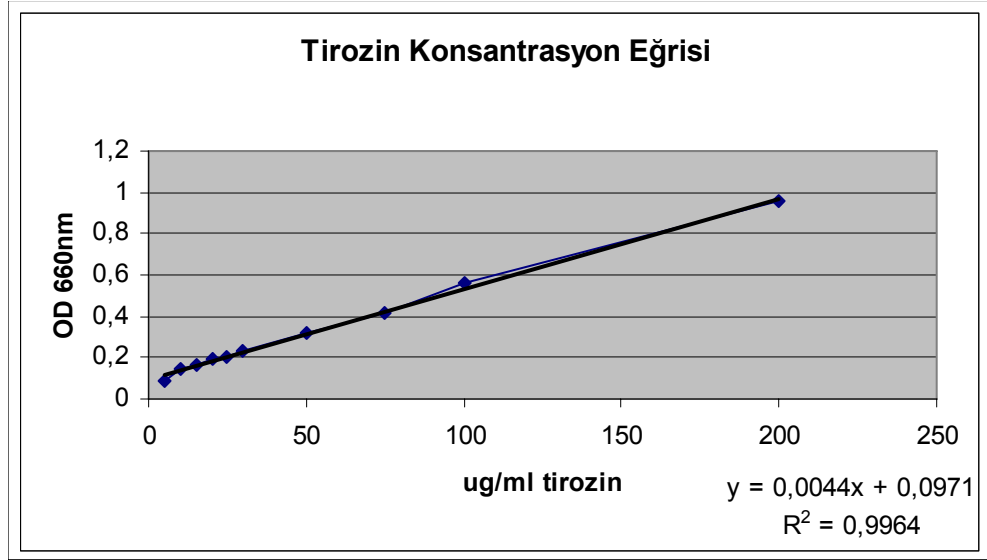
Yapılan biyokimyasal testler ve hücre morfolojisi incelemeleri sonucunda, izolatlardan APT3, APT6 ve APT7 hariç hepsinin Gram (+), katalaz (+), hareketli, spor oluşturan basiller olduğu, APT3, APT6 ve APT7'nin ise Gram (-), hareketli koklar olduğu belirlenmiştir. Ayrıca E287, E183 ve A351a kodlu izolatların termofilik, diğer 11 izolatın ise mezofilik üreme gösterdiği belirlenmiştir. 14 adet bakteri izolatı ve *Bacillus licheniformis* DSM13'ün bazı biyokimyasal ve morfolojik özellikleri Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4 Alkalen proteaz aktivitesine sahip bakteri izolatlarının morfolojik özellikleri

No	Bakteri İzolatı	Katalaz	Gram	Basil/Kok	Hareket	Termofilik Üreme	Spor Pozisyonu	Şişkin Spor	Spor Şekli
1	APT1	+	+	Basil	+	-	subterminal	-	elipsoidal
2	APT2	+	+	Basil	+	-	terminal	-	elipsoidal
3	APT3	+	-	Kok	+	-	spor yok	-	-
4	APT4	+	+	Basil	+	-	terminal	+	elipsoidal
5	APT5	+	+	Basil	+	-	terminal	+	elipsoidal
6	APT6	+	-	Kok	+	-	spor yok	-	-
7	APT7	+	-	Kok	+	-	spor yok	-	-
8	APT8	+	+	Basil	+	-	subterminal	+	elipsoidal
9	APT9	+	+	Basil	+	-	subterminal	-	elipsoidal
10	TG11	+	+	Basil	+	-	subterminal	-	elipsoidal
11	TG20	+	+	Basil	+	-	subterminal	-	elipsoidal
12	E287	+	+	Basil	+	+	subterminal	-	elipsoidal
13	E183	+	+	Basil	+	+	terminal	+	elipsoidal
14	A351a	+	+	Basil	+	+	terminal	+	elipsoidal
15	B.lich.	+	+	Basil	+	-	subterminal	-	elipsoidal

#### 4.4 Tirozin Konsantrasyon Eğrisi

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan tirozinin mikromolar ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi için hazırlanan dilüsyonların optik yoğunluğu 660nm'de spektrofotometrede okutulmuş, okutulan absorbansa karşı  $\mu\text{M}$  tirozin konsantrasyon eğrisi çizilerek eğrinin eğiminden ekstinksiyon katsayısı hesaplanmıştır. Tirozinin ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi için çizilen tirozin konsantrasyon eğrisi Şekil 4.6'da verilmiş olup, alkalen proteaz aktivitesi hesaplanırken  $0.0044 \mu\text{M}/\text{ml}$  olarak bulunan ekstinksiyon katsayısı kullanılmıştır.



Şekil 4.6 Tirozinin ekstinksiyon katsayısının belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon eğrisi

#### 4.5 İzolatların Alkalen Proteaz Üretim Değerleri

%5 oranında süt tozu içeren Skim Milk Agarda zon oluşturabilme yeteneğine sahip 14 adet bakteri izolatı %0.5 kazein içeren pH 7.0 ve pH 9.0'luk sıvı besiyerinde 48 ve 72 saatlik gelişimlerinin ardından besiyeri üst sıvısı alkalen proteaz enzimi kaynağı olarak kullanılmış ve alkalen proteaz aktivitesi %0.6 kazein içeren pH 9.0 ve 10.0 olmak üzere 2 farklı Glisin-NaOH tamponu kullanılarak 5 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Hücre başına düşen enzim üretim miktarı (U/ml/g), enzim aktivitesi (U/ml) bakteri yaş ağırlığına (g) bölünerek hesaplanmıştır. 14 adet izolat ile standart *Bacillus licheniformis* DSM13 suşunun pH 7.0 ve 9.0'luk kazeinli sıvı besiyerinde ürettikleri hücre dışı alkalen proteaz enzimlerinin pH 9.0 ve 10.0'luk Glisin-NaOH tamponuyla ölçülen alkalen proteaz üretim miktarları sırasıyla Çizelge 4.5 ve 4.6'da verilmiştir.

Bu sonuçlara göre, izolatların yaş pelet gram ağırlığı başına düşen enzim üretim miktarları pH 7.0 kazeinli sıvı besiyerinde 4-1900 U/ml/g aralığında, pH 9.0 kazeinli sıvı besiyerinde 5-1555 U/ml/g aralığında değişiklik göstermiştir.

İzolatların, pH 7.0'lik kazeinli sıvı besiyerinde alkalen proteaz üretim kapasitelerine bakıldığında 48 saatte termofilik *Bacillus* sp. E287'nin ürettiği alkalen proteazın pH 10.0'luk Glisin-NaOH tamponu ile en yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Diğer taraftan pH 9.0'luk kazeinli sıvı besiyerinde ise 48 saatte alkalifilik APT5 izolatının ürettiği alkalen proteaz pH 10.0 Glisin-NaOH tamponu ile en yüksek aktiviteyi vermiştir. Her iki izolatın da standart suş *Bacillus licheniformis* DSM13'den daha yüksek alkalen proteaz üretim kapasitesine sahip olduğu görülmüştür.

APT5 izolatının gerek alkalifilik olması gerekse ürettiği enzimin pH 10.0 tamponuyla yüksek alkalen proteaz aktivitesi göstermesi nedeni ile bundan sonraki saflaştırma, karakterizasyon ve stabilite çalışmalarında APT5 izolatu kullanılmıştır.

Çizelge 4.5 Bazı bakteri izolatlarının ve standart *Bacillus licheniformis* DSM13 suşunun kazeinli sıvı besiyerinde (pH7.0 ve pH9.0) 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreci sonunda %0.6 kazein içeren pH9.0'luk Glisin-NaOH tamponu ile alkalen proteaz üretim değerleri

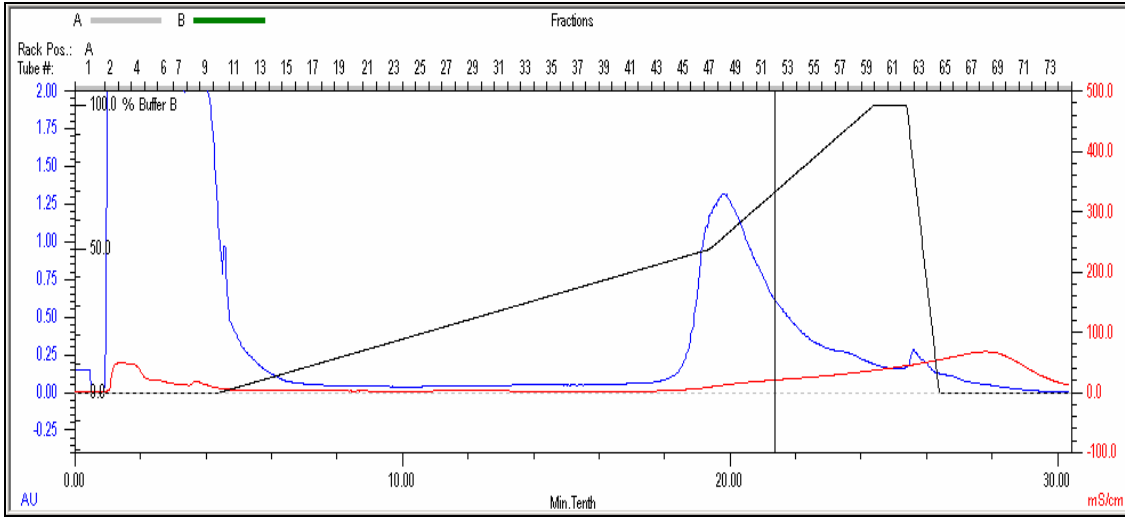
	<b>pH 9.0 Glisin-NaOH ile Ölçülen Enzim Aktivitesi (U/ml/mg)</b>			
	<b>Bakteri Kültürü pH 7.0</b>		<b>Bakteri Kültürü pH 9.0</b>	
	<b>48 Saat</b>	<b>72 Saat</b>	<b>48 Saat</b>	<b>72 Saat</b>
<i>B.licheniformis</i>	778	1016	1376	645
<b>APT1</b>	415	719	298	241
<b>APT2</b>	478	617	359	251
<b>APT3</b>	900	253	303	405
<b>APT4</b>	184	102	75	387
<b>APT5</b>	347	333	1338	448
<b>APT6</b>	7	292	6	5
<b>APT7</b>	608	743	534	688
<b>APT8</b>	169	288	41	351
<b>APT9</b>	700	582	581	472
<b>TG11</b>	894	126	829	490
<b>TG20</b>	708	183	859	741
<b>E287</b>	1179	823	405	174
<b>E183</b>	141	529	13	1124
<b>A351a</b>	837	525	989	1061

Çizelge 4.6 Bazı bakteri izolatlarının ve standart *Bacillus licheniformis* DSM13 suşunun kazeinli sıvı besiyerinde (pH7.0 ve pH9.0) 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreci sonunda %0.6 kazein içeren pH10.0'luk Glisin-NaOH tamponu ile alkalen proteaz üretim değerleri

	<b>pH 10.0 Glisin-NaOH ile Ölçülen Enzim Aktivitesi (U/ml/mg)</b>			
	<b>Bakteri Kültürü pH 7.0</b>		<b>Bakteri Kültürü pH 9.0</b>	
	<b>48 Saat</b>	<b>72 Saat</b>	<b>48 Saat</b>	<b>72 Saat</b>
<i>B.licheniformis</i>	810	600	1197	820
<b>APT1</b>	907	702	361	197
<b>APT2</b>	1033	694	406	375
<b>APT3</b>	479	306	706	403
<b>APT4</b>	143	227	428	462
<b>APT5</b>	191	112	1555	429
<b>APT6</b>	22	4	19	11
<b>APT7</b>	720	582	608	465
<b>APT8</b>	125	50	39	70
<b>APT9</b>	1073	347	774	431
<b>TG11</b>	372	402	803	211
<b>TG20</b>	459	413	727	613
<b>E287</b>	1900	998	19	608
<b>E183</b>	275	36	215	1352
<b>A351a</b>	288	368	602	720

#### 4.6 Alkale Proteaz Enziminin Saflaştırma Sonuçları

APT5 izolatının kazeinli sıvı besiyerinde 37°C’de 72 saatlik inkübasyon sonucu ürettiği alkale proteaz enzimi hücreler ayrıldıktan sonra elde edilen ekstraktan %85’lik soğuk aseton ile çöktürölüp, BioRad iyon değişimi kolon kromatografisi ile anyon değiştirici özellikteki kolondan, pH 10.10 Glisin-NaOH tamponuyla geçirilerek saflaştırılmıştır. Alkale proteazlar genellikle pozitif yüklüdür ve anyon değiştiricilere bağlanmamaktadır (Kumar and Takagi 1999). APT5 alkale proteazının saflaştırılmasında bir anyon değiştirici olan Q kolon kullanılmıştır ve enzimin kolona enjekte edilmesinden sonra kolondan ayrılan ilk fraksiyonlarda beklenildiği gibi alkale proteaz aktivitesi görölmüştür. Şekil 4.5’de gösterildiği üzere, kolon sonrası 73 farklı fraksiyondan dakikada 1 ml akış hızı ile toplanan 6 farklı protein pikine ait 2-7 (A fraksiyonu), 8-9 (B fraksiyonu), 10-11 (C fraksiyonu), 44-56 (D fraksiyonu), 57-60 (E fraksiyonu) ve 62-64 (F fraksiyonu) numaralı fraksiyonların alkale proteaz aktivitesi belirlenmiştir. Anyonik özellikteki Q-kolondan geçirilen enzim örneği, pH10.10’luk Glisin-NaOH’li 1M’lık tuz pikinin öncesinde yer aldığından katyonik karakterde bir enzim olarak tanımlanmıştır. Bu sonuçlara göre ‘A Fraksiyonu’ olarak adlandırılan ilk protein pikine ait 2 ile 7. fraksiyonlar arasında, 232909 U/ml enzim aktivitesi ölçölmüş ve bundan sonraki çalışmalarda bu pike ait fraksiyonlar kullanılmıştır. Sonuç olarak, katyonik karakterdeki alkale proteaz enzimi besiyeri üst sıvısından aseton presipitasyonu ve iyon değişim kromatografisi uygulanarak 500 U/mg spesifik aktivitede, 1,6 kat ve %29,5 verimle saflaştırılmıştır. Çizelge 4.7’de kolondan geçirilen enzime ait saflaştırma basamaklarına ait sonuçlar verilmiştir.



Şekil 4.7 APT5 alkalen proteazının BioRad iyon değişim kolon kromatografisine ait anyonik karakterdeki Q-kolondan pH 9.0 Glisin-NaOH kullanılarak geçirilmesi ile elde edilmiş elüsyon profili (mavi çizgi: 280nm'deki protein absorbansı; siyah çizgi: tuz konsantrasyonu; kırmızı çizgi: protein stabilitesine bağlı iletkenlik)

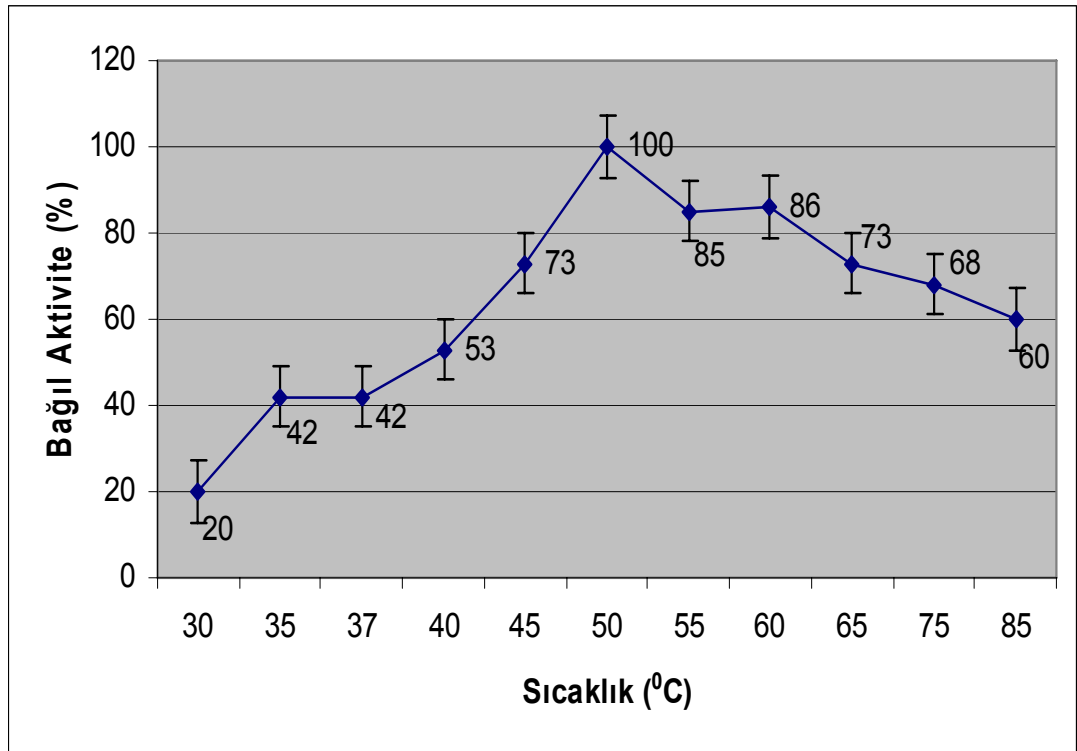
Çizelge 4.7 APT5 alkalen proteazının saflaştırma basamaklarına ait sonuçlar

	Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Aktivite (U/ml)	Toplam aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Ham Ekstrakt	275	0,1	34,9	40,2	11046,9	316,6	100	1,0
Asetonla Çöktürme Sonrası	5	1,9	9,7	842,8	4213,9	435,1	38,1	1,4
İyon-Değişim Kromatografisi Sonrası	14	0,5	6,5	232,9	3260,7	500,1	29,5	1,6

#### 4.7 APT5 Alkalen Proteazının Farklı Sıcaklık Değerlerindeki Aktivite ve Stabilité

##### Sonuçları

Standart enzim olarak kullanılan *B. licheniformis* proteazının (Sigma P4860) optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 40°C ve 7.5 olduğu belirtilmiştir ([http://www.brenda-enzymes.org/php/result\\_flat.php4?ecno=3.4.21.62](http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.4.21.62)). Standart enzimden farklı olarak APT5 izolatına ait alkalen proteazın en iyi çalıştığı sıcaklık aralığı 50-60°C ve optimum sıcaklık isteği 50°C olarak belirlenmiştir. 50°C’de %100 aktif iken 55°C’de bağıl enzim aktivitesi %85 olarak ölçülmüştür. Optimum aktivite gösterdiği 50°C’de 20 dakika ile 4 saatte ve 30°C’de 3 günlük inkübasyon sonunda stabilitesi değişmeyerek %100 olarak kalmaktadır. Farklı sıcaklıklardaki bağıl aktivite değerleri Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.8 APT5 alkalen proteazının farklı sıcaklık değerlerindeki bağıl aktivite değerleri

Alkalen proteazların optimum sıcaklık dereceleri 50-70°C aralığında değişmektedir. Son yıllarda düşük sıcaklıklarda aktivite gösteren alkalen proteazlarla ilgili araştırmalar artmasına rağmen yüksek sıcaklık derecelerinde aktivite gösteren alkalen proteazlara talep daha yoğundur. *Bacillus* suşlarından izole edilen alkalen proteaz enzimlerinin optimum aktivite gösterdikleri sıcaklık dereceleri ve sıcaklık stabiliteleriyle ilgili yapılan çalışmalar APT5 alkalen proteazı ile karşılaştırılarak çizelge 4.8’de verilmiştir. *Bacillus licheniformis* MIR29 alkalen proteazının optimum aktivite gösterdiği sıcaklık derecesi 60°C ve 10 dakikalık stabilitesinin 30-60°C aralığında %100 olduğu, ancak 90°C’de aktivitenin yaklaşık %70’inin kaybolduğu belirlenmiştir (Ferrero *et al* 1995).

Bir *Bacillus* sp.’den izole edilen AP-1 enziminin 50°C’de, AP-2 enziminin 55°C’de optimum aktivite gösterdiği, 50°C’de AP-1’in yarı ömrünün 50, AP-2’nin 40 dakika olduğu açıklanmıştır (Kumar *et al* 1998). *Bacillus* sp.’den elde edilen ve beyazlatıcılar varlığında stabil olan alkalen proteazın optimum sıcaklığının 60-70°C olduğu ve 60°C’ye kadar 20 dakikalık stabilitesinin %100 oranında kaldığını belirtilmiştir (Gupta *et al* 1999). Gupta *et al* (2001) *Bacillus* sp.’den elde ettikleri SDS-stabil alkalen proteazın 20-80°C aralığında ve optimum 60°C’de aktivite gösterdiğini, 45°C’de 1 saatten daha uzun süre stabil kaldığını ve yarı ömrünün 50°C’de 90 dakika olduğunu belirtmiştir.

*Bacillus pumilus*’dan elde edilen hücre dışı alkalen proteazın 30-60°C aralığında ve optimum 55°C’de aktivite gösterdiği, 30 dakikalık inkübasyon sonunda 50°C’de aktivitesinin %47’sini, 60°C’de %15’ini koruduğu ve 70°C’de 10 dakika sonunda aktivitesinin tamamını kaybettiği bildirilmiştir (Zhang *et al* 2002).

Oksidant ve SDS-stabil *Bacillus clausii* I-52 alkalen proteazının 60-65°C aralığında optimum aktivite gösterdiği ancak 70°C’den sonra aktivitenin hızla azaldığı, 55°C’de 1 saatlik inkübasyon sonunda stabil olduğu ve 30 dakikada 60°C’de aktivitesinin %45’ini kaybettiği açıklanmıştır (Chang *et al* 2003). *Bacillus clausii* GMBAE 42’den saflaştırılan serin alkalen proteazın 30°C’de 6 gün boyunca stabil olduğu, 50°C’de 2

saatlik inkübasyon sonucunda stabilitesini koruduğu, aynı süre sonunda 55°C’de aktivitesinin %60’ını, 60°C’de tamamını kaybettiği ancak 60°C’de 30 dakikalık inkübasyon sonunda %55 aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Erarslan vd. 2004).

*Bacillus licheniformis* RP1’e ait termostabil alkalen proteazın optimum aktivitesinin 65-70°C olarak belirlenmiştir. 50 ve 55°C’de 1 saat inkübasyon sonunda enzim stabilitesinin korunduğu, 60°C’de %45 aktivite gösterdiği, ancak reaksiyon ortamına CaCl<sub>2</sub> ilavesi sonucunda aktivite ilkinde göre %85 oranında arttığı bildirilmiştir (Nasri *et al* 2006). Deri endüstrisinde kılların uzaklaştırılmasında (dehairing) kullanılan *Bacillus cereus* MCM B-326’dan elde edilen proteaz 30-60°C aralığında ve optimum 55°C’de aktivite göstermiştir ve 80°C’de tamamen inaktive olmuştur (Sarnaik *et al* 2006). Organik çözücülerle deterjanları tolere edebilen *Bacillus* sp. RKY3’den elde edilen proteaz 30-70°C aralığında ve optimum 60°C’de aktivite göstermiştir. 70°C’de 15 dakika sonunda enzim aktivitesinin %60’ını koruduğu belirtilmiştir (Ryu *et al* 2008).

APT5 alkalen proteazı 50°C’de gösterdiği optimum aktivite ve 85°C’de de %60 oranında aktivitesini koruması, 50°C’de 4 saatlik inkübasyon sonunda stabilitesini tamamen koruması nedeni ile alkalen proteazların aktivite sıcaklığı ve stabiliteleri bakımından yayınlanan enzimlerle uygunluk gösterirken 4 saatlik stabilitesinin %100 olması birçok çalışmanın sonucuna göre, enzimin oldukça stabil olduğunu göstermiştir.

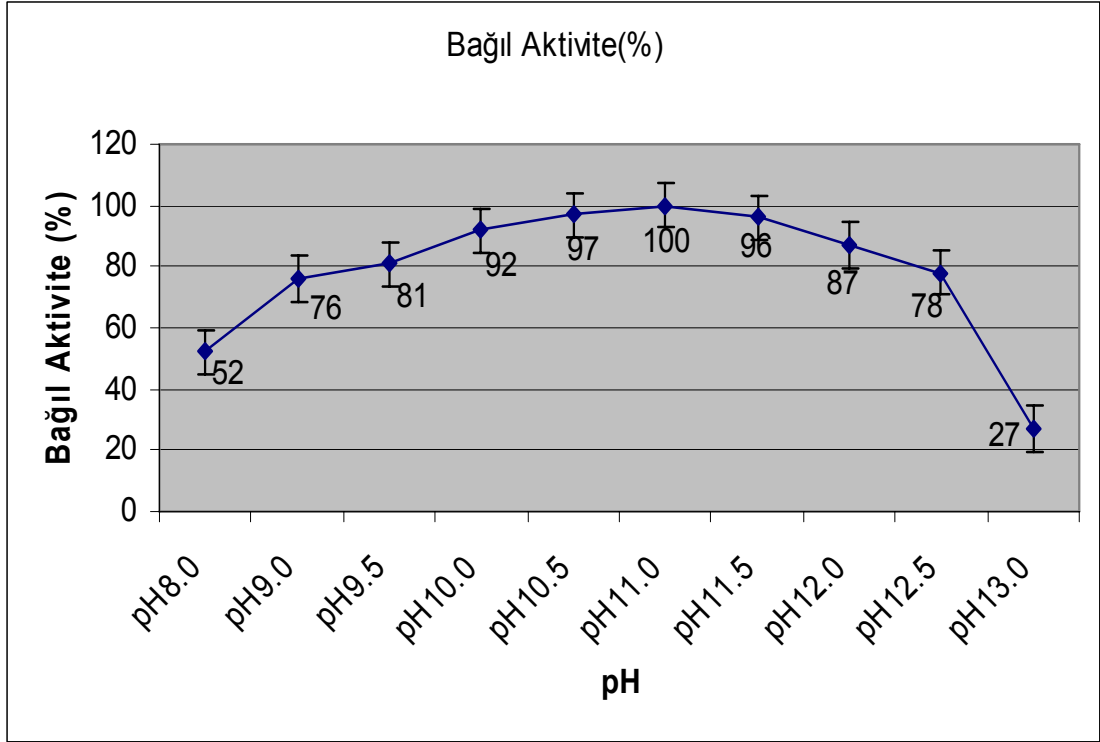
Çizelge 4.8 Bazı *Bacillus* cinsi bakterilere ait alkalen proteazların ve APT5 alkalen proteazının optimum sıcaklık istekleri ve stabiliteleeri

Bakteri	Optimum sıcaklık (°C)	Sıcaklık Stabilitesi (°C)	Aktivite aralığı (°C)	Kaynak
APT5	50	50°C'de 4 saatte %100 stabil	30-85	
<i>Bacillus licheniformis</i> MIR29	60	30-60°C'de 10 dakikada %100 stabil	30-60	Ferrero <i>et al</i> 1995
<i>Bacillus</i> spp. (AP-1 enzimi)	50	50°C'de yarı ömrü 50 dakika	-	Kumar <i>et al</i> 1998
<i>Bacillus</i> spp. (AP-2 enzimi)	55	55°C'de yarı ömrü 40 dakika	-	Kumar <i>et al</i> 1998
<i>Bacillus</i> sp.	60-70	60°C'de 20 dakikada %100 stabil	-	Gupta <i>et al</i> 1999
<i>Bacillus</i> sp.	60	1 saatten uzun süre 45°C'de stabil, yarı ömrü 50°C'de 90 dakika	20-80	Gupta <i>et al</i> 2001
<i>Bacillus pumilus</i>	55	30 dakikada 50°C'de %47, 60°C'de %15 aktivite, 70°C'de 10 dakikada inhibisyon	30-60	Zhang <i>et al</i> 2002
<i>Bacillus clausii</i> I-52	60-65	1 saatte 55°C'de stabil, 30 dakikada 60°C'de %55 aktivite	-	Chang <i>et al</i> 2003
<i>Bacillus clausii</i> GMBAE 42	60	2 saatte 55°C'de %40'ını, 60°C'de inhibisyon, 60°C'de 30 dakikada %55 aktivite	30-65	Erarslan vd. 2004
<i>Bacillus licheniformis</i> RP1	65-70	1 saatte 50 ve 55°C'de stabil, 60°C'de %45 aktivite	-	Nasri <i>et al</i> 2006
<i>Bacillus cereus</i> MCM B-326	55	30 dakikada 80°C'de inaktive	30-60	Sarnaik <i>et al</i> 2006
<i>Bacillus</i> sp. RKY3	60	15 dakikada 70°C'de %60 aktivite	30-70	Ryu <i>et al</i> 2008

#### 4.8 APT5 Alkalen Proteazının Farklı pH Değerlerindeki Aktivite ve Stabilité

##### Sonuçları

APT5 izolatına ait alkalen proteaz enziminin pH aralığı, en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değeri olan 50°C'de pH 10.0-12.0 olup, optimum pH değeri 11.0 olarak belirlenmiştir. Enzim, optimum çalıştığı pH11.0'de %100 aktifken, pH10.5'da bağıl enzim aktivitesi %97, pH 11.5'de %96 olarak ölçülmüştür. Farklı pH değerlerinde APT5'e ait bağıl aktivite değerleri Şekil 4.9'da verilmiştir. 30°C'de enzimin optimum çalıştığı pH 11.0'de 20 dakikalık ve 3 günlük stabilitesi değişmeyerek %100 olarak kaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.9 APT5 alkalen proteazının farklı pH değerlerindeki bağıl aktivite değerleri

Alkalen proteazların optimum pH aralığı 8.0-12.0 olarak bilinmektedir (Gupta *et al* 2002b) ancak daha yüksek pH koşullarında aktivite gösteren alkalen proteazlar da mevcuttur. Çizelge 4.9'da *Bacillus* cinsi bakterilere ait alkalen proteazların optimum pH'ları ve pH stabilitesi APT5 alkalen proteazı ile karşılaştırılarak özetlenmiştir. Literatürde Horikoshi *et al* (1990) *Bacillus* sp. no. AH-101'den elde ettikleri alkalen proteazın pH 11.0-12.0'de optimum aktivite gösterdiğini bildirmiştir. *Bacillus licheniformis* MIR29'dan izole edilen alkalen proteaz pH 11.0-13.0 aralığında optimum aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Ferrero *et al* 1995).

*Bacillus* spp.'den izole edilen AP-1 enzimi pH 11.0, AP-2 enzimi pH 12.0'de optimum aktivite gösterirken, 1 günlük inkübasyon sonunda sırasıyla pH 6.0-11.0 ve pH 6.0-9.0 aralığında enzimin stabilitesi değişmemiştir (Kumar *et al* 1998). *Bacillus* sp.'den elde ettikleri ağartıcılar varlığında stabil alkalen proteazın pH 10.0'da optimum aktivite gösterdiği ve 40°C'de 1 saatlik inkübasyon sonunda pH 5.0-12.0 aralığında enzimin stabilitesini koruduğu belirlenmiştir (Gupta *et al* 1999).

Gupta *et al* (2001) çalışmalarında *Bacillus* sp.'den elde ettikleri SDS-stabil alkalen proteazın pH 11.0'de optimum aktivite gösterdiğini, 25°C'de 1 saatlik inkübasyon sonunda pH 6.0-12.0 aralığında stabil kaldığını belirtmişlerdir. *Bacillus pumilus*'dan elde edilen hücre dışı alkalen proteazın pH 6.0-11.0 aralığında stabil ve optimum pH 10.0'da aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Zhang *et al* 2002). Oksidant ve SDS-stabil *Bacillus clausii* I-52'ye ait alkalen proteaz optimum aktiviteyi pH 11.0'de göstermiştir. Enzim farklı tamponlarda 72 saat inkübasyon sonunda pH 5.0-12.0 aralığında stabilitesini korurken pH4.5 ve altındaki pH değerleriyle pH12.0 ve üzerindeki pH değerlerinde aktivitesinin %80'inin fazlasını kaybetmiştir (Chang *et al* 2003).

*Bacillus clausii* GMBAE 42'den elde edilen serin alkalen proteazın optimum pH 11.3 değerinde aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Oda sıcaklığında 4 günlük farklı pH değerindeki tamponlarla inkübasyon sonunda enzim pH 9.0-11.5 aralığında stabilitesini korurken sadece %30'luk bir aktivite kaybı pH 12.0-13.0'da gözlenmiştir (Erarslan vd. 2004). *Bacillus licheniformis* RP1'e ait termostabil alkalen proteaz pH7.0-13.0

aralığında yüksek aktivite gösterirken optimum pH 10.0-11.0'de aktivite göstermektedir. Farklı pH'ya sahip tamponlarla 40°C'de 1 saatlik inkübasyonlar sonunda enzimin pH8.0-10.0'da stabil olduğu, pH11.0'da %96, pH12.0'da %72 aktivite gösterdiği açıklanmıştır (Nasri *et al* 2006).

Deri endüstrisinde hayvan postlarından kılların uzaklaştırılmasında kullanılan *Bacillus cereus* MCM B-326'dan elde edilen proteazın, pH 6.0-12.0 aralığında aktif olduğu optimum pH 9.0 değerinde aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Sarnaik *et al* 2006). Organik çözücülerle deterjanları tolere edebilen *Bacillus* sp. RKY3'den elde edilen proteazın pH 4.0-11.0 aktivite gösterdiği, optimum aktivitesini pH 7.0'de gösterdiği saptanmıştır. Enzim pH7.0-9.0 aralığında stabilitesini korurken diğer pH değerlerinde %80 oranında aktivite göstermiştir (Ryu *et al* 2008).

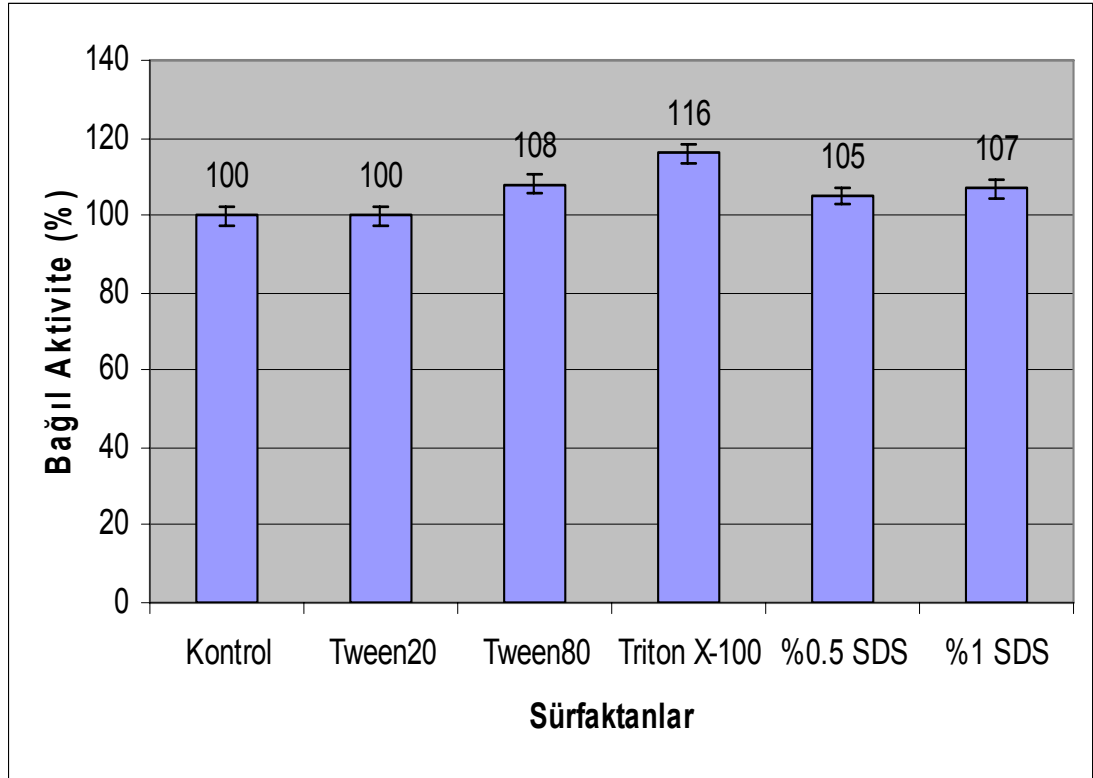
Literatürde bildirilen alkalen proteazların optimum pH değerleri ve pH stabilitesi göz önüne alındığında APT5 izolatından elde edilen alkalen proteaz yüksek pH stabilitesi ve pH 11.0'lik optimum aktivitesiyle alkalen proteazların pH özelliklerine uygunluk göstererek oldukça stabil bir enzim olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.9 Bazı *Bacillus* cinsi bakterilere ait alkalen proteazların ve APT5 alkalen proteazının optimum pH'ları ve pH stabiliteleri

Bakteri	Optimum pH	pH stabilitesi	Kaynak
APT5	11.0	3 günde 30°C'de %100 stabil	
<i>Bacillus</i> sp. no. AH-101	11.0-12.0	-	Horikoshi <i>et al</i> 1990
<i>Bacillus licheniformis</i> MIR29	11.0-13.0	-	Ferrero <i>et al</i> 1995
<i>Bacillus</i> spp. (AP-1 enzimi)	11.0	24 saatte pH 6.0-11.0'de stabil	Kumar <i>et al</i> 1998
<i>Bacillus</i> spp. (AP-1 enzimi)	12.0	24 saatte pH 6.0-9.0'da stabil	Kumar <i>et al</i> 1998
<i>Bacillus</i> sp.	10.0	1 saatte 40°C'de pH 5.0-12.0'de stabil	Gupta <i>et al</i> 1999
<i>Bacillus</i> sp.	11.0	1 saatte 25°C'de pH 6.0-12.0'de stabil	Gupta <i>et al</i> 2001
<i>Bacillus pumilus</i>	10.0	-	Zhang <i>et al</i> 2002
<i>Bacillus clausii</i> I-52	11.0	72 saatte pH 5.0-12.0'de stabil <pH4.5 ve >pH12.0'de %80 inhibisyon	Chang <i>et al</i> 2003
<i>Bacillus clausii</i> GMBAE 42	11.3	4 günde oda koşulunda pH 9.0-11.5'da stabil pH 12.0-13.0'de %70 aktivite	Erarslan vd. 2004
<i>Bacillus licheniformis</i> RP1	10.0-11.0	1 saatte 40°C'de pH8.0-10.0'da stabil, pH11.0'da %96, pH12.0'de %72 aktivite	Nasri <i>et al</i> 2006
<i>Bacillus cereus</i> MCM B-326	9.0	-	Sarnaik <i>et al</i> 2006
<i>Bacillus</i> sp. RKY3	7.0	pH7.0-9.0'da stabil	Ryu <i>et al</i> 2008

#### 4.9 Çeşitli İnhibitörlerin, Sürfaktanların ve Metal İyonların Alkalen Proteaz Aktivitesine Etkisi

İyonik olmayan sürfaktanlardan Tween 20, Tween 80, Triton X-100 %1 oranında, kuvvetli anyonik sürfaktanlardan olan SDS %0.5 ve %1 oranında hazırlanarak 2 saat enzimle 30°C’de muamele edilmiş ve alkalen proteaz aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Kullanılan sürfaktanlardan hiçbiri enzim aktivitesini yüksek oranda inhibe etmemiş, aksine Triton X-100 aktiviteyi %16 oranında artırırken, alkalen proteaz aktivitesini azalttığı bilinen SDS, %1’lik ve %0.5’lik oranlarda enzimle muamele edildiği zaman, sırasıyla %7 ve %5 oranında artırmıştır. Tween 80’in ise %8 oranında aktiviteyi artırdığı görülmüştür. Sürfaktanların alkalen proteaz aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.10’da sunulmuştur.



Şekil 4.10 Sürfaktanların APT5 alkalen proteaz aktivitesine etkisi

%1 oranındaki Triton X-100 ve Tween-80 alkale proteaz aktivitesini artırırken (%8 ve %16 oranında) diğere sürfaktanlar (Tween 20 ve SDS) APT5 alkale proteaz aktivitesini etkilememiştir. *Bacillus* cinsi bakterilere ait alkale proteazlarla APT5' e ait alkale proteazın aktivitesine sürfaktanların etkisi çizelge 4.10'da özetlenmiştir. Literatüre bakıldığı zaman, Ferrero *et al* (1996) 3.5mM SDS'in *Bacillus licheniformis* MIR 29'dan elde edilen termostabil alkale proteaz aktivitesini %22 oranında azalttığını, APT5 alkale proteazına benzer olarak Kumar *et al* (1998) alkalifilik *Bacillus* sp'den elde edilen serin proteazların aktivitesinin, Triton X-100 ile %14-39 oranında arttığını ancak %0,1 SDS ile %23, %0.5 SDS ile neredeyse tamamen aktivitenin kaybolduğunu bildirmişlerdir.

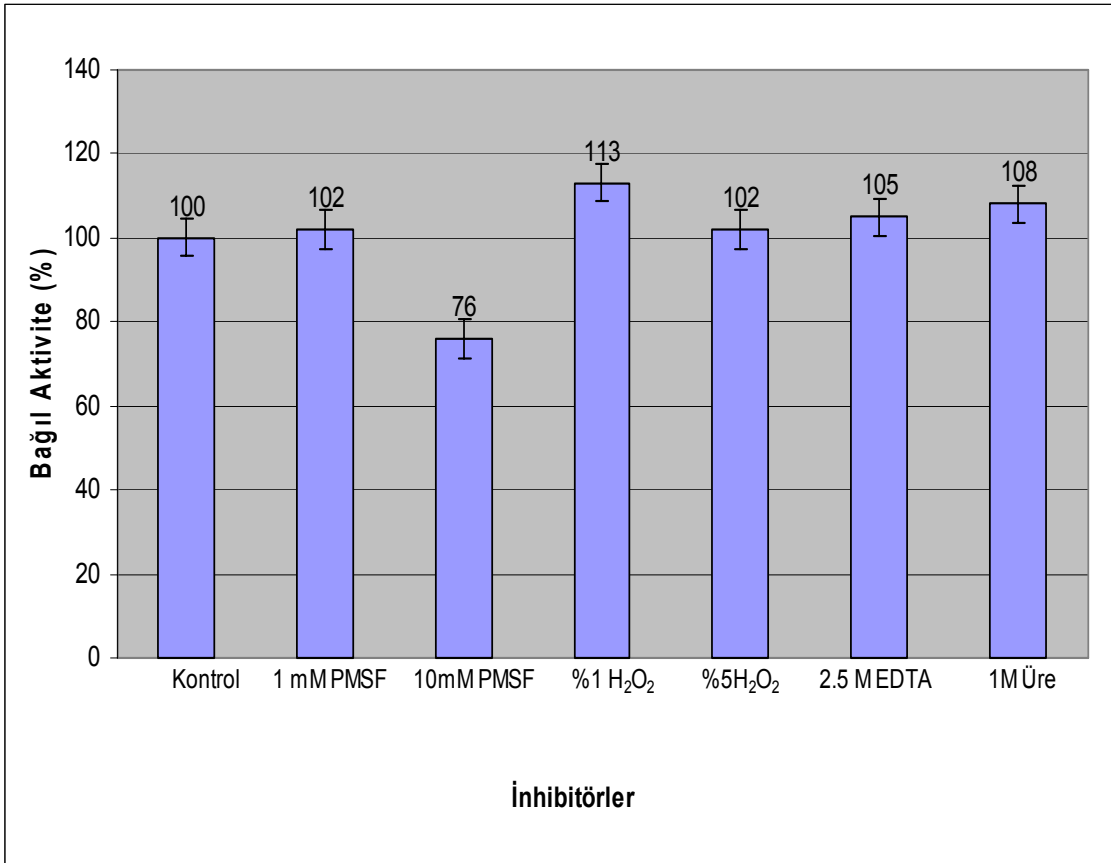
Gupta *et al* (1999) *Bacillus* sp.'den elde edilen ağartıcılara karşı stabil alkale proteaz aktivitesinin iyonik olmayan sürfaktanlardan Tween 20 ve Tween 80 ile %20-50 artarken, SDS gibi kuvvetli anyonik sürfaktanlar ile %20-40 oranında azaldığını yayınlamıştır. Chang *et al* (2003) *Bacillus clausii* I-52'ye ait oksidant ve SDS stabil alkale proteazın, %1 SDS ile muamele edilince aktivitesinin değişmediğini, %5 SDS ile muamele edilince aktivitesini %78 oranında koruduğunu yayınlamışlardır. Erarslan vd. (2004) *Bacillus clausii* GMBAE 42'ye ait serin alkale proteazın iyonik olmayan sürfaktanlar ile daha stabil olduğunu, anyonik sürfaktan olan %0.2'lik SDS'in aktiviteyi değiştirmedeğini açıklamışlardır.

Nasri *et al* (2006) *Bacillus licheniformis* RP1'den elde edilen termostabil alkale proteazın %0.1 ve %0.5 SDS ile sırasıyla %91 ve %73 oranında aktivite gösterdiğini, iyonik olmayan sürfaktanların aktiviteye etkisinin olmadığını açıklamıştır. Ryu *et al* (2008) *Bacillus* sp. RKY3'ün deterjan-tolerant proteaz aktivitesinin, ortama Triton X-100 ve Tween 80 ilavesi ile APT5 alkale proteazı ile benzer şekilde %17-24 oranında arttığını, %1'lik SDS ilavesi ile aktivitenin %23 oranında azaldığını yayınlamışlardır. Sonuç olarak, APT5 alkale proteazının kuvvetli anyonik sürfaktanlardan olan SDS ile muamele edildikten sonra aktivitesini kaybetmemesi, iyonik olmayan sürfaktanların da enzim stabilitesini etkilememesi, bu enzimin sürfaktanlara karşı, literatüre göre diğere alkale proteazların stabiliteleleri de dikkate alındığında oldukça stabil olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.10 Bazı *Bacillus* cinsi bakterilere ait alkalen proteazlarla APT5' e ait alkalen proteazın aktivitesine sürfaktanların etkisi

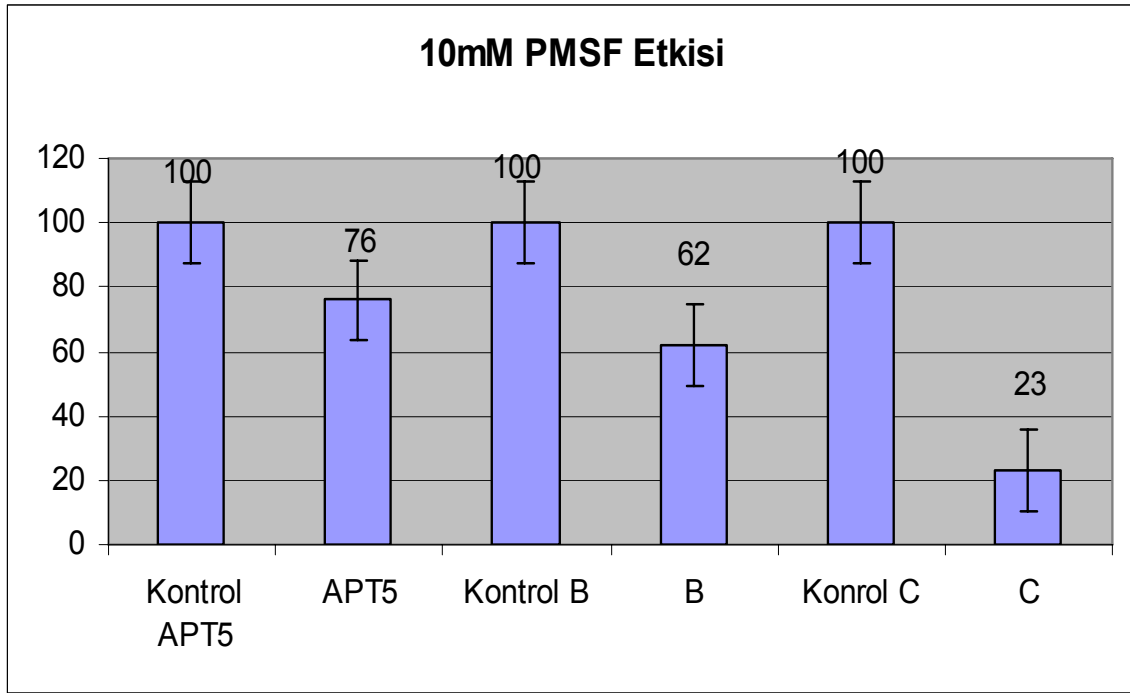
<b>Bakteri</b>	<b>Sürfaktanların etkisi</b>	<b>Kaynak</b>
APT5	Triton X-100 ile %16, Tween 80 ile %8 aktivite artışı, %0.5 ve %1SDS ile stabil	
<i>Bacillus licheniformis</i> MIR 29	3.5mM SDS %22 oranında aktiviteyi azaltıyor	Ferrero <i>et al</i> 1996
<i>Bacillus</i> sp.	Triton X-100 ile %14-39 aktivite artışı %0,1 SDS ile %23, %0.5 SDS ile inhibisyon	Kumar <i>et al</i> 1998
<i>Bacillus</i> sp.	Tween 20 ve Tween 80 ile %20-50 aktivite artışı, SDS ile %20-40 inhibisyon	Gupta <i>et al</i> 1999
<i>Bacillus clausii</i> I-52	%1 SDS ile %100 aktivite, %5 SDS ile %78'lik aktivite	Chang <i>et al</i> 2003
<i>Bacillus clausii</i> GMBAE 42	iyonik olmayan sürfaktanlar ve %0.2'lik SDS ile stabil	Erarslan vd. 2004
<i>Bacillus licheniformis</i> RP1	%0.1SDS ile %91, %0.5 SDS %73 aktivite	Nasri <i>et. al</i> 2006
<i>Bacillus</i> sp. RKY3	Triton X-100 ve Tween 80 ile %17-24 oranında aktivite artışı, %1 SDS ile %23 inhibisyon	Ryu <i>et al</i> 2008

İnhibitörlerden 1mM ve 10mM PMSF, 1M Üre ve 2.5mM EDTA ile oksitleyici ajanlardan %1 ve %5 oranında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in alkalen proteaz aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Alkalen proteazının aktivitesini düşürmesi beklenen oksitleyici ajanlardan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, %5 oranında enzimle muamele edilince aktiviteyi %2 artırırken, %1 oranında muamele edildiğinde ise alkalen proteaz aktivitesini %13 oranında artırmıştır. EDTA ve üre alkalen proteaz aktivitesini sırasıyla %5 ve %8 oranında artırmıştır. 1mM PMSF aktiviteyi %2 oranında artırırken, 10mM PMSF aktiviteyi %24 oranında azaltmıştır. Serin proteazlarda PMSF enzimin aktif bölgesinde serin, lizin, arjinin, triptofan ve histidin köklerini modifiye ederek enzim aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir. Enzim 10mM PMSF varlığında tamamen inhibe olmamış, hatta %76 oranında aktivitenin korumuştur. PMSF, Üre, EDTA ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' in alkalen proteaz aktivitesine etkisi Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11 İnhibitörlerin alkalen proteaz aktivitesine etkisi

Ekonomik öneme sahip olan serin proteazların alt grubu olan subtilisin Carlsberg *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii* ve *Bacillus* sp. tarafından üretilmektedir. Birer subtilisin olan standart *Bacillus licheniformis* proteazı ile *Bacillus* sp.'ye ait proteaz (protease from *Bacillus licheniformis*-P4860 ve protease from *Bacillus* sp.- P5985) APT5 alkalen proteazı aynı deney koşullarında 1mM ve 10mM PMSF ile muamele edilmiştir. 1mM PMSF'in her üç enzimin de aktivitesine etki etmemiş, ancak 10mM PMSF ile muamele sonucunda *B. licheniformis*'e ait enzim %38, *Bacillus* sp.'ye ait enzim ise %77 oranında aktivitelerini kaybetmiştir. APT5 enzimi ise bu iki enzime göre %24'lük aktivite kaybıyla daha az etki görmüştür. Bu sonuçlara göre APT5 alkalen proteazının serin proteazların subtilisinler familyasıyla benzerlik gösterebileceği düşünülmüştür. Şekil 4.12'de 10mM PMSF'in APT5, *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus* sp. proteazına etkisi verilmiştir.



**Şekil 4.12** 10mM PMSF'in APT5, *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus* sp. proteazına etkisi (B= *Bacillus licheniformis*, C= *Bacillus* sp.)

EDTA'nın metalloproteazların, PMSF'in ise serin proteazların spesifik inhibitörü olduğu bildirilmiştir (Erarslan vd. 2004, Sarnaik *et al* 2007). Çizelge 4.11'de *Bacillus* cinsi bakterilerin alkalen proteazlarına PMSF ve EDTA'nın inhibitör etkisi APT5 alkalen proteazıyla karşılaştırılarak özetlenmiştir. Horikoshi *et al* (1990) *Bacillus* sp. no. AH-101'den elde edilen alkalen proteazın 1mM PMSF ile tamamen inhibe olduğunu, EDTA ve ürenin aktiviteyi değiştirmediğini, Kumar *et al* (1998) *Bacillus* spp.'den izole edilen serin proteazlarla ilgili çalışmalarında enzimlerin 1mM PMSF ile neredeyse aktivitelerinin tamamını kaybettiğini, Ferrero *et al* (1996) *Bacillus licheniformis* MIR 29'dan elde edilen termostabil alkalen proteazın 2.5mM PMSF ile %60 oranında inhibe olduğunu, EDTA'nın ise aktiviteyi değiştirmediği, Zhang *et al* (2003) *Bacillus pumilus*'dan elde edilen hücre dışı serin proteazın 1mM PMSF ile tamamen inhibe olduğunu, 1mM EDTA ile %16, 10mM EDTA ile %51 oranında aktivitenin düştüğünü, Chang *et al* (2003) *Bacillus clausii* I-52'den elde ettikleri oksidant ve SDS-stabil alkalen proteazın 1mM PMSF ile tamamen inhibe olduğunu, 1mM EDTA'nın aktiviteyi etkilemediğini, Erarslan vd. (2004) *Bacillus clausii* GMBAE 42'den elde edilen serin alkalen proteazın aktivitesinin 1mM PMSF ile %80 oranında, 10mM PMSF ile tamamının inhibe olduğunu, EDTA'nın ise inhibitör etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Nasri *et al* (2006) *Bacillus licheniformis* RP1'den elde ettikleri termostabil alkalen proteazın 5mM PMSF ile tamamen inhibe olduğunu, 5mM EDTA'nın ise aktiviteyi %70 oranında azalttığını yayınlamıştır. Ryu *et al* (2008) *Bacillus* sp. RKY3'den elde ettikleri deterjan-tolerant proteazın 2mM EDTA ile %35.7 oranında, 1mM PMSF ile tamamen inhibe olduğunu, Gupta *et al* (2001) *Bacillus* sp.'den izole edilen SDS\_stabil alkalen proteazın 1mM EDTA ile %60 oranında inaktive olduğunu ve de Sarnaik *et al* (2006) bir metalloproteaz olduğu tahmin edilen *Bacillus cereus* MCM B-326'dan elde ettikleri proteazın EDTA ile tamamen inhibe olduğunu ancak 1mM PMSF ile aktivitesini yaklaşık %84 oranında koruduğunu açıklamışlardır. APT5 alkalen proteazının 1mM PMSF ile aktivitesini koruması ve de 10mM PMSF varlığında %76 oranında aktivite göstermesi nedeni ile, genellikle 1mM PMSF ile tamamen inhibe olan serin alkalen proteazlara dahil olmadığını ancak serin proteazların bir diğer alt grubu olan ekonomik önemi fazla olan subtilisinlere dahil olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca 2.5mM EDTA varlığında da aktivitesini kaybetmemesi enzimimizin metalloproteazlara da dahil olmadığını göstermiştir.

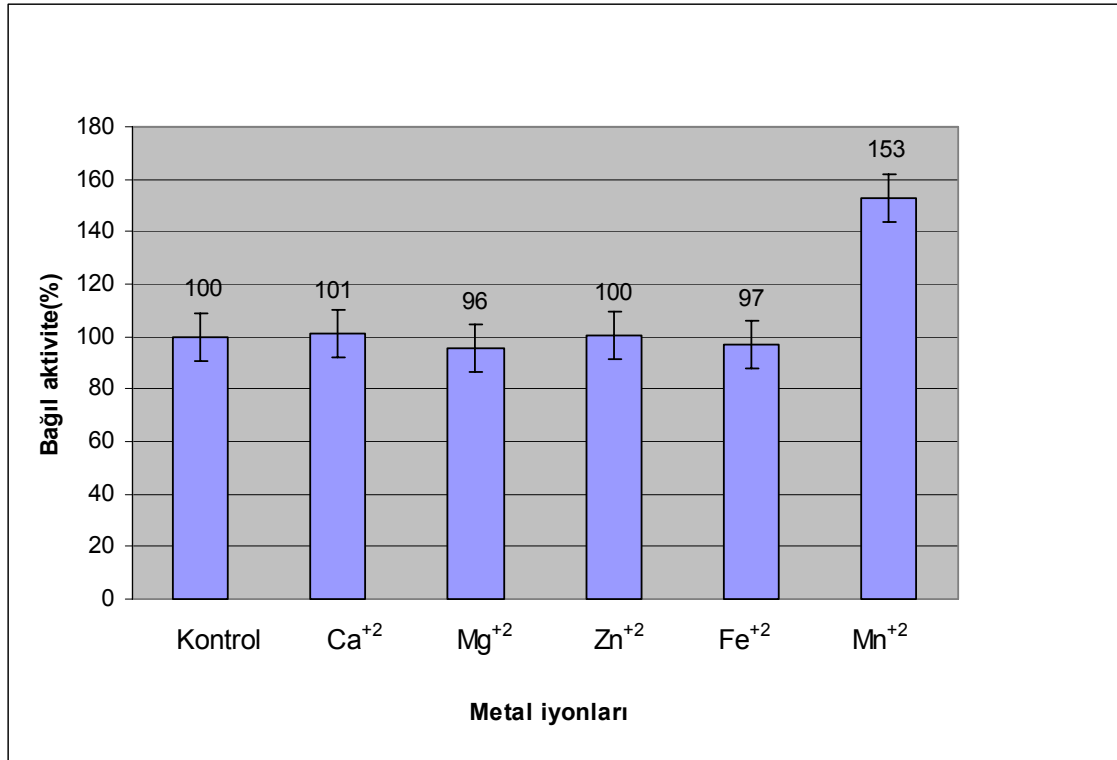
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi okside edici ajanlara karşı alkalen proteazların stabil olması bu enzimlerin ağartıcı içerikli deterjan formüller için uygun olduğu bildirilmiştir (Sarnaik *et al* 2006). Bu nedenle deterjan endüstrisinde kullanılmak üzere araştırılan alkalen proteazların H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında stabil olması istenilen bir özelliktir. Erarslan vd. (2004) *Bacillus clausii* GMBAE 42'den elde ettikleri serin alkalen proteazı 40°C'de 30 dakika %5'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele ettiklerinde %10, 60 dakika muamele ettikleri zaman %30 oranında aktivitenin düştüğünü gözlemişlerdir. Sarnaik *et al* (2006) *Bacillus cereus* MCM B-326'dan elde ettikleri proteazı %5 ve %10 oranındaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 30 dakika muamele ettikleri zaman aktivitenin stabil kaldığını bu nedenle enzimin oksidant stabil olduğunu yayınlamışlardır. Chang *et al* (2003) *Bacillus clausii* I-52'den elde ettikleri oksidant ve SDS stabil alkalen proteazı 72 saat boyunca oda koşulunda %1 ve %5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele ettikten sonra aktivitenin değişmediğini bildirmişlerdir.

%1 ve %5 oranında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 30°C'de 2 saat muamele edilen APT5 alkalen proteazının aktivitesinin stabil kalması enzimimizin oksidant stabil olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.11 Bazı *Bacillus* cinsi bakterilerin alkalen proteazları ile APT5 alkalen proteazına PMSF ve EDTA'nın inhibitör etkisi

Bakteri	PMSF ve EDTA'nın Alkalen Proteaz Aktivitesine Etkisi	Kaynak
APT5	1mM PMSF ile %100, 10mM PMSF ile %76 aktivite, 2.5mM EDTA ile aktivite değişmiyor	
<i>Bacillus</i> sp. no. AH-101	1mM PMSF ile tamamen inhibisyon, EDTA ve üre aktiviteyi değiştirmiyor	Horikoshi <i>et al</i> 1990
<i>Bacillus</i> spp.	1mM PMSF ile tamamen inhibisyon	Kumar <i>et al</i> 1998
<i>Bacillus licheniformis</i> MIR 29	2.5mM PMSF ile %60 inhibisyon, EDTA aktiviteyi değiştirmiyor	Ferrero <i>et al</i> 1996
<i>Bacillus pumilus</i>	1mM PMSF ile tamamen inhibisyon, 1mM EDTA ile %16, 10mM EDTA ile %51 inhibisyon	Zhang <i>et al</i> 2003
<i>Bacillus clausii</i> I-52	1mM PMSF ile tamamen inhibisyon, 1mM EDTA aktiviteyi değiştirmiyor	Chang <i>et al</i> 2003
<i>Bacillus clausii</i> GMBAE 42	1mM PMSF ile %80 oranında, 10mM PMSF ile tamamen inhibisyon, EDTA aktiviteyi değiştirmiyor	Erarslan vd. 2005
<i>Bacillus licheniformis</i> RP1	5mM PMSF ile tamamen inhibisyon, 5mM EDTA ile aktiviteyi %70 inhibisyon	Nasri <i>et al</i> 2006
<i>Bacillus</i> sp. RKY3	2mM EDTA ile %35.7, 1mM PMSF ile tamamen inhibisyon	Ryu <i>et al</i> 2008
<i>Bacillus</i> sp.	1mM EDTA ile %60 inhibisyon	Gupta <i>et al</i> 2001
<i>Bacillus cereus</i> MCM B-326	EDTA ile tamamen inhibisyon, 1mM PMSF ile %84 aktivite	Sarnaik <i>et al</i> 2006

Divalent katyonik metal iyonlarından  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  ve  $\text{Mn}^{+2}$ 'nin alkalin proteaz aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Aktiviteyi artırarak enzim stabilizasyonunda ana rolü oynadığı bilinen  $\text{Ca}^{2+}$ 'nin APT5'e ait alkalin proteaz aktivitesini sadece %1 oranında arttırdığı görülmüştür. Proteazların stabilitesini koruduğu bilinen, enzimin aktif bölgesinin konformasyonunu yüksek sıcaklıklarda korunmasında önemli işlevi olan ve termal denatürasyona karşı enzimi koruyan diğer metal iyonlarından,  $\text{Mg}^{+2}$  ve  $\text{Fe}^{+2}$  iyonlarının sırasıyla aktiviteyi %4 ve %3 oranında azalttığı,  $\text{Zn}^{+2}$  iyonunun enzim aktivitesini etkilemediği görülmüştür. Diğer metal iyonlarıyla aynı özelliğe sahip olduğu bilinen  $\text{Mn}^{+2}$  iyonu ise APT5 alkalin proteazının aktivitesini %153 oranında artırmıştır. Bu sonuçlara göre APT5 alkalin proteazı test edilen metal iyonlarının hepsine karşı dirençli olup, bunlardan  $\text{Mn}^{+2}$ 'nin enzim aktivitesini arttırarak, enzime bir kofaktör olarak etki ettiği düşünülebilir. Şekil 4.13'de metal iyonlarının alkalin proteaz aktivitesine etkisi sunulmuştur.



Şekil 4.13 Metal iyonlarının alkalin proteaz aktivitesine etkisi

Metal iyonların etkisi ele alındığında birçok araştırıcı  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  iyonlarının çeşitli *Bacillus* sp.'den saflaştırılan alkalen proteazların aktivitesini artırdığını açıklamıştır. Metal iyonların *Bacillus* cinsi bakterilerin alkalen proteazlarına ve APT5 alkalen proteazına etkisi izelge 4.12'de özetlenmiştir. Zhang *et al* (2003) *Bacillus pumilis*'e ait hücre dışı alkalen proteazının aktivitesini 10mM  $Ca^{2+}$ 'nın yaklaşık %20 oranında artırdığını, 10mM  $Mg^{2+}$ 'nin aktiviteyi %15 oranında artırdığını,  $Cu^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$ 'nin ise %15-20 oranında azalttığını açıklamıştır.

Erarslan vd. (2004) *Bacillus clausii* GMBAE 42'den elde edilen serin alkalen proteazın aktivitesini 5mM  $Cu^{2+}$ 'nin %40,  $Mn^{2+}$ 'nin %16 oranında artırdığını,  $Ca^{2+}$ 'un %12 oranında inhibe ettiğini,  $Zn^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$ 'un aktiviteyi etkilemediğini belirtmiştir. Kumar *et al* (1998) *Bacillus* spp.'den saflaştırılan alkalen serin proteazların aktivitesini  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$ 'nin tamamen inhibe ettiğini,  $Mg^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$ 'nin artırdığını, Ryu *et al* (2008) *Bacillus* sp. RKY3'den elde ettikleri deterjan-tolerant proteazın aktivitesini ağır metal iyonlarından  $Co^{2+}$ 'ın %10 oranında inhibe ettiğini,  $Ca^{2+}$ 'nın %10 oranında artırdığını,  $Mg^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$ 'nin ise aktiviteye etki etmediğini yayınlamıştır.

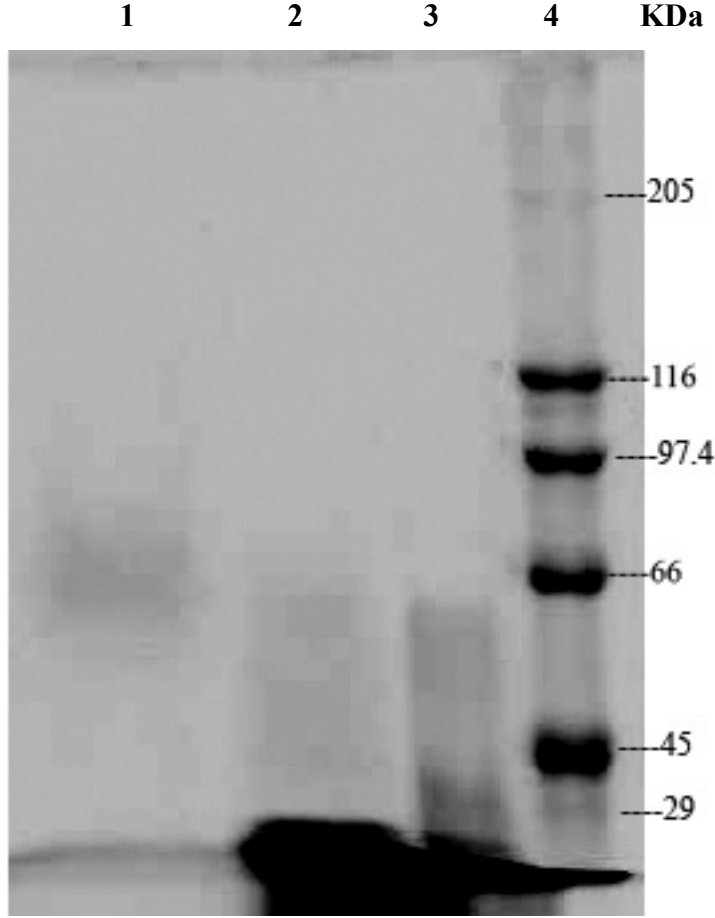
APT5 alkalen proteazının aktivitesini  $Mn^{2+}$  %53 oranında artırırken,  $Ca^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  aktiviteyi değiştirmemiş,  $Fe^{2+}$  ve  $Ca^{2+}$  ise aktiviteye etki etmemiştir.  $Mn^{2+}$  iyonunun aktiviteyi artırıcı etkisi benzer şekilde Gupta *et al* (2001) *Bacillus* sp.'den elde edilen SDS-stabil alkalen proteazın aktivitesini  $Mn^{2+}$  iyonunun yaklaşık iki kat artırdığını (%202) ancak  $Co^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$ 'un aktiviteyi düşürdüğünü yayınlamıştır. Bu sonuçların aksine Sarnaik *et al* (2006) *Bacillus cereus* MCM B-326'dan elde edilen proteazın aktivitesini  $Fe^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$ 'nin sırasıyla %30 ve %60 oranında,  $Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ 'nin ise aktiviteyi tamamen inhibe ettiğini yayınlamıştır.

Çizelge 4.12 Bazı *Bacillus* cinsi bakterilerin alkalen proteazlarına ve APT5 alkalen proteazına metal iyonların etkisi

Bakteri	Metal iyonların etkisi	Kaynak
APT5	Mn <sup>2+</sup> ile %53 aktivasyon, Ca <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> ve Ca <sup>2+</sup> etki etmiyor	
<i>Bacillus pumilis</i>	10mM Ca <sup>2+</sup> ile yaklaşık %20, 10mM Mg <sup>2+</sup> ile %15 aktivasyon, Cu <sup>2+</sup> ve Zn <sup>2+</sup> ile %15-20 inhibisyon	Zhang <i>et al</i> 2003
<i>Bacillus clausii</i> GMBAE 42	5mM Cu <sup>2+</sup> ile %40, Mn <sup>2+</sup> ile %16 aktivasyon, Ca <sup>2+</sup> ile %12inhibisyon, Zn <sup>2+</sup> ve Mg <sup>2+</sup> un aktiviteyi etkilemiyor	Erarslan vd. 2004
<i>Bacillus</i> spp.	Ca <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> ve Fe <sup>3+</sup> ile tamamen inhibisyon, Mg <sup>2+</sup> ve Mn <sup>2+</sup> ile aktivasyon	Kumar <i>et al</i> 1998
<i>Bacillus</i> sp. RKY3	Co <sup>2+</sup> ile %10 inhibisyon, Ca <sup>2+</sup> ile %10 ile aktivasyon, Mg <sup>2+</sup> ve Mn <sup>2+</sup> aktiviteyi etkilemiyor	Ryu <i>et al</i> 2008
<i>Bacillus</i> sp.	Mn <sup>2+</sup> ile %202 aktivasyon, Co <sup>2+</sup> ve Mg <sup>2+</sup> ile inhibisyon	Gupta <i>et al</i> 2001
<i>Bacillus cereus</i> MCM B-326	Fe <sup>2+</sup> ve Mn <sup>2+</sup> ile sırasıyla %30 ve %60, Cu <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> ile tamamen inhibisyon	Sarnaik <i>et al</i> (2006)

#### 4.10 Kolon Fraksiyonlarının Poliakrilamid Jel Elektroforetik Analiz Sonuçları

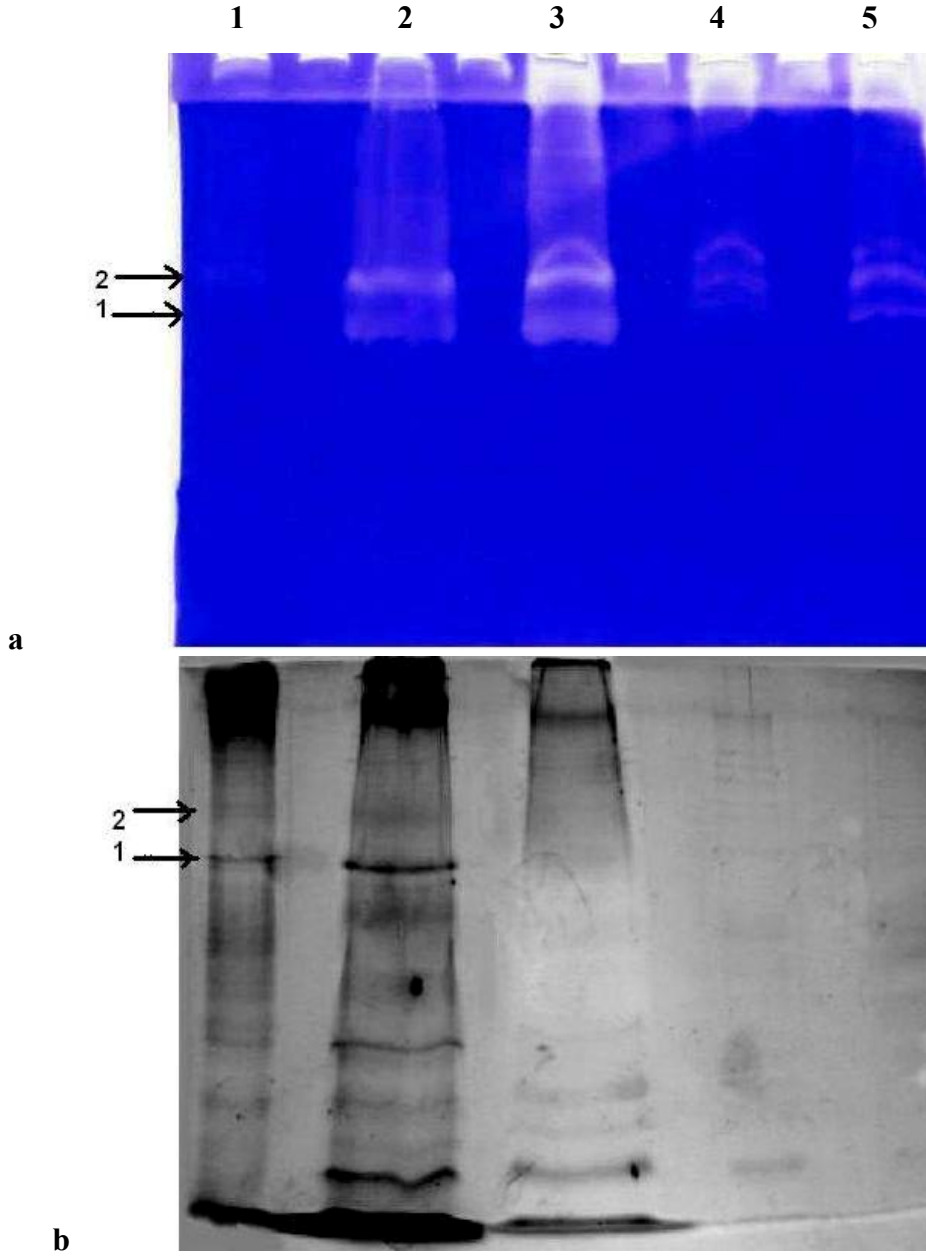
APT5 izolatına ait kültür besiyeri süpernatantının, aseton presipitasyonu ve daha sonra iyon değişimi kolon kromatografisi ile elde edilen A fraksiyonunun SDS-PAGE analizi Şekil 4.14’de verilmiş olup ham ekstraktın belirli oranda saflaştığı görülmektedir.



Şekil 4.14 APT5 alkalin proteazının Q-kolonu ile saflaştırılması sonucu elde edilen farklı fraksiyonlarının SDS-PAGE’deki protein profili (Hat 1: A fraksiyonu; Hat 2: aseton çöktürmesi sonrası; Hat 3: ham ekstrakt; Hat 4: moleküler ağırlık standardı (Sigma MW-SDS-6H)).

APT5 alkalen proteazına ait SDS-PAGE’de net bir protein bandı elde edilemediği için enzimin molekül ağırlığını hesaplamak doğru bulunmamıştır. Ancak yaklaşık 70kDa ağırlığında olduğu görülen A fraksiyonundaki protein bandının bir izoenzim olabileceği düşünülmüştür. Alkalen proteazların moleküler ağırlıkları bakımından SDS-PAGE sonuçlarına bakıldığında Kumar *et al* (1999) alkalifilik *Bacillus* spp.’den elde edilen AP-1 enziminin 28, AP-2 enziminin 29 kDa olduğunu, Horikoshi *et al* (1996) *Bacillus licheniformis* MIR 29’a ait termostabil alkalen proteazın hem SDS- hem de Native-PAGE’de 2 farklı bant oluşturduğunu ve bu bantların moleküler ağırlıklarının sırasıyla 25 ve 40 kDa olduğunu belirtmiştir. Sarnaik *et al* (2006) *Bacillus cerus* MCM B-326’dan elde edilen proteazın 36 ve 45 kDa olmak üzere 2 farklı bant meydana getirdiğini bildirmiştir. Huang *et al* (2002) *Bacillus pumilus*’a ait alkalen serin proteazın 32 kDa ağırlığında olduğunu yayınlamıştır. Erarslan vd. (2004) *Bacillus clausii* GMBAE 42’ye ait serin alkalen proteazın 26.550 kDa olduğunu belirtmiştir. Ryu *et al* (2008) *Bacillus* sp. RKY3’e ait alkalen proteazın 38kDa ağırlığında olduğunu belirtmiştir. Bu sonuçlara göre yaklaşık 70kDa ağırlığında olması beklenen APT5’e ait enzimin moleküler ağırlığının literatürdeki alkalen proteazlardan farklılık göstereceği düşünülmüştür.

APT5 izolatına ait kültür besiyeri süpernatantı, aseton presipitasyonu, kolon fraksiyonları ve *B. licheniformis* alkalen proteaz enzimi örnekleri Native-PAGE ile ayrılmış, aktivite boyaması (Şekil 4.15.a) ve gümüş nitrat boyaması (Şekil 4.15.b) yapılmış, alkalen proteaz aktivitesi gösteren protein bantları rakamlarla işaretlenmiştir. Buna göre 1 numaralı alkalen proteaz bandı tüm örneklerde aynı mobilitede belirlenmiş olup, kolon fraksiyonlarında buna ek olarak elektroforetik mobilitesi daha düşük ikinci bir alkalen proteaz bandı (2 numara) gözlenmiştir. Bunlara karşılık gelen bantlar da aynı numaralarla işaretlenmiştir (Şekil 4.15.b).



Şekil 4.15.a. APT5 alkalen proteazının Q-kolonu ile saflaştırılması sonucu elde edilen farklı fraksiyonlarının aktivite, b. gümüş boyama sonrası N-PAG'deki protein profili (Hat1: ham ekstrakt (besiyeri üst sıvısı); Hat2: aseton çöktürmesi sonrası; Hat 3: A fraksiyonu; Hat 4: B fraksiyonu; Hat5: C fraksiyonu)

#### 4.11 APT5 İzolatının Fenotipik Özellikleri

APT5 izolatının fenotipik özellikleri *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'* e göre belirlenmiştir (Sneath *et al* 1986) . Fenotipik karakterleri ve karbon kullanımı standart suş *Bacillus licheniformis* DSM13 ile karşılaştırılarak çizelge 4.13'de özetlenmiştir. APT5 izolatu Gram pozitif, aerobik, katalaz ve oksidaz pozitif, hareketli, spor oluşturan (terminal olarak lokalize olan elipsoidal sporlar), çubuk şeklinde bakteridir. Bu nedenle APT5 izolatu fenotipik özellikleri bakımından *Bacillus* cinsine dahil olarak tanımlanmıştır. Hücreler sadece pH 9.0-12.0'de gelişim gösterebildiği için obligat alkalifil olarak tanımlanmıştır. *B. licheniformis* DSM 13 ise pH 6.5-11.0'de gelişim göstererek fakültatif alkalifil olarak belirlenmiştir. Tirozin amino asidini parçalama özelliği, üre kullanımı bakımından her iki bakteri de negatifken jelatinaz ve amilaz pozitifdir. Nitrat kullanımı bakımından her iki bakteri nitratı nitrite indirgemektedir ve NH<sub>3</sub> veya N<sub>2</sub> gazı oluşturmamışlardır. Her iki bakteri de indol ve asetoin üretimi bakımından negatifdir. Farklı olarak sitrat kullanımı bakımından *B. licheniformis* DSM 13 pozitifken APT5 negatifdir.

Her iki bakterinin karbohidratları kullanım özellikleri çizelge 4.14'de özetlenmiştir. Şeker kullanımı bakımından her iki bakteri de D(+)glukoz, D(-)mannitol, D(-)fruktoz, maltoz ve sükrozu kullanmaları bakımından benzerlik göstermiş ve şekerlerin kullanımı sonucunda durham tüplerinde gaz oluşumu gözlenmemiştir. TSI agar besiyerinde her iki bakteri de glukoz ve sükrozu kullandığı, şekerlerin parçalanması sonucu gaz oluşumu ve H<sub>2</sub>S gazı oluşumu belirlenmemiştir.

Çizelge 4.13 AT5 ve *Bacillus licheniformis* DSM13'ün fenotipik özellikleri

Özellik	APT5	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM13
Hücre şekli	Çubuk	Çubuk
Hareket	+	+
Spor	+	+
Gram boyama	+	+
Katalaz	+	+
Oksidaz	+	+
Nitratın nitrite indirgenmesi	+	+
Kazeinin hidrolizi	+	+
Jelatinaz	+	+
Amilaz	+	+
Üreaz	-	-
Sitrat kullanımı	-	+
Indol üretimi	-	-
Tirozinin parçalanması	-	-
<b>pH İsteği</b>		
pH 6.5	-	+
pH 7.0	-	+
pH 8.0	-	+
pH 9.0	+	+
pH 10.0	+	+
pH 11.0	+	+
pH 12.0	+	-
pH 12.5	-	-

Çizelge 4.14 AT5 ve *Bacillus licheniformis* DSM13'ün karbohidrat kullanımı

<b>Karbohidrat</b>	<b>APT5</b>	<b><i>Bacillus licheniformis</i> DSM13</b>
D(+) <b>Glukoz</b>	+	+
D(-) <b>Arabinoz</b>	-	-
D(+) <b>Ksiloz</b>	-	-
D(-) <b>Mannitol</b>	+	+
D(-) <b>Sorbitol</b>	-	-
D(+) <b>Galaktoz</b>	-	-
<b>D-Fruktoz</b>	+	+
<b>Sukroz</b>	+	+
<b>Laktoz</b>	-	-
<b>Maltoz</b>	+	+
<b>Rafinoz</b>	-	-

## 5. SONUÇLAR

Tez kapsamında, 46 adet termofilik *Bacillus* spp., 2 adet halofilik *Bacillus* spp. ve Ankara ilinden izole edilen 9 adet alkalifilik izolat olmak üzere toplam 57 adet izolatın alkalin proteaz üretim kapasitesi belirlenmiştir. Bunlardan 32 tanesinin proteaz ürettiği tespit edilmiştir.

Proteaz aktivitesi gösteren 32 izolattan, Alkalin proteaz aktivitesi gösteren izolatların seçimi pH 9.0 ve 10'luk Skim Milk Agarda zon oluşturabilme yeteneklerine göre belirlenmiştir. Seçilen 14 adet izolatın alkalin proteaz üretim kapasiteleri hücre dışı enzim aktivitelerine bakılarak, hücre yaş ağırlığı başına düşen enzim aktivitesi (U/ml/g) miktarları baz alınarak sıralanmış ve buna göre en yüksek enzim üreticisi izolatlar belirlenmiştir.

14 adet izolat içerisinden seçilen APT5, pH 9.0 ve üzerindeki alkali koşullarda gelişebilmesi ve yüksek miktarda alkalin proteaz üretim kapasitesine sahip olması nedeni ile daha sonraki çalışmalarda kullanılmıştır.

Kısmi olarak aseton çöktürmesi ve iyon-değişimi kolon kromatografisi ile saflaştırılan APT5 alkalin proteazı besiyeri sıvısından %29,5 verimle, 1,6 kat ve 500,1 U/mg spesifik aktivite ile saflaştırılmıştır.

APT5'e ait alkalin proteaz enziminin çalıştığı sıcaklık aralığı 50-60°C ve optimum sıcaklık isteği 50°C olup bu sıcaklıktaki 4 saatlik stabilitesi %100'dür. Enzimin çalıştığı pH aralığı ise 10.0-11.50 olup optimum pH isteği 11.0'dir ve bu pH değerinde 3 günlük stabilitesi %100'dür. APT5'e ait alkalin proteaz, test edilen sürfaktanlara, inhibitörlere ve metal iyonlarının tümüne yüksek oranda direnç göstermiştir. Serin proteazların inhibitörü olduğu bilinen PMSF inhibitörü 10mM konsantrasyonunda enzimle muamele edildiğinde enzim aktivitesinin tamamen inhibe olmamış ve hatta %76 oranında aktivite göstermiştir. Ancak 10mM PMSF varlığında subtilisin Carlsberg üreticisi *Bacillus*

*licheniformis* ile benzer aktivite göstermesi nedeni ile serin proteazların bir familyası olan subtilisinlere kesin olmamakla birlikte benzerlik gösterdiği düşünülmüştür. Ayrıca metalloproteazların inhibitörü olan EDTA varlığında, enzim aktivitesini korumuştur. Bu nedenle APT5 alkalin proteazının metalloproteazlara da dahil olmadığı belirlenmiştir. pH ve sıcaklık stabilitesi ile inhibitörlere karşı dirençli olması APT5 alkalin proteazının yüksek konformasyonel stabiliteye sahip olduğunu göstermiştir.

SDS-PAGE’de APT5’e ait enzimin, kolondan elde edilen A fraksiyonu ile besiyeri süpernatantından belirli oranda saflaştığı görülmüştür. Yine Native-PAGE’de kolondan elde edilen A fraksiyonunda alkalin proteaz aktivitesine sahip 2 farklı proteaz protein bandı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile ülkemize ait jeotermal alanlardan, Tuz Gölü’nden ve alkali topraklardan elde edilen 57 adet izolat içerisinde yüksek miktarda alkalin proteaz üreten APT5 izolatı seçilmiştir. Enzimin saflaştırılması, elektroforetik mobilitesi, farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki aktivite ve stabilitesi, deterjanların, inhibitörlerin ve metal iyonların enzim üzerine etkisi belirlenmiştir. Tüm bu araştırma sonuçları ışığında standart enzimden farklılık gösteren, yüksek pH ve sıcaklık değerlerinde aktif ve stabil kalabilen, test edilen inhibitörlere yüksek oranda dirençli olan ve deterjan endüstrisi gibi önemli biyoteknolojik uygulamalarda kullanım potansiyeline sahip olabilecek yeni bir alkalin proteaz enzimi saflaştırılarak karakterize edilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Andersen, L.P. 1998 Method for dehairing of hides or skins by means of enzymes. US Patent 5,834,299
- Anonymous. 2008. Web Sitesi:  
[http://www.brenda-enzymes.org/php/result\\_flat.php4?ecno=3.4.21.62](http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.4.21.62),  
Erişim Tarihi 06.03.2008
- Banerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W., Soni, R. 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochem* 35:213-219
- Barros, R.J., Wehtje, F., Adlercreutz, P. 1999. Enhancement of immobilized protease catalyzed dipeptide synthesis by the presence of insoluble protonated nucleophile. *Enzyme Microb Technol* 24:480-488.
- Bech, I.M., Branner, S., Breddam, K., Groen, H. 1993 Oxidation stable detergent enzymes. US Patent 5,208,158
- Beg, Q.K., Saxena, R.K., Gupta, R. 2002. Kinetic determination for an alkaline protease from *Bacillus mojavensis* using response surface methodology. *Biotechnol Bioeng* 78:289-295
- Bergman, M and Frankel-Conrat, H. 1937. The role of specificity in the enzyme synthesis of proteins: synthesis with intracellular enzymes. *J Biol Chem* 119:707-720
- Castro, G.R. 1999 Enzymatic activities of proteases dissolved in organic solvents. *Enzyme Microb Technol* 25:689-694
- Clapes, P., Pera, E., Torres J.L. 1997. Peptide bond formation by the industrial protease, neutrase, in organic media. *Biotechnol Lett* 19:1023-1026
- Claus, D. and Berkeley, C.W. 1986. The genus *Bacillus* In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2. Sneath pHA (Ed.).
- Chang, C.-S., Joo, H.-S., Kumar, C.G., Park, G.-C., Paik, S.R. 2003 Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties. *Journal of Applied Microbiology* 95:267-272

- Cheng S.W., Hu, M.N., Takagi, H., Asano, M., Tsai, Y.C. 1995. Production and Characterization of a feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Biosci Biotech Biochem* 59: 2239-2243
- Dalev, P.G. 1990. An enzyme –alkaline hydrolysis of feather keratin for obtaining a protein concentrate for fodder. *Biotechnol Lett* 12:71-72
- Dalev, P.G., 1994 Utilization of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. *Bioresour Technol* 48:265-267
- Deshpande, V.V., Rao, M., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 62, No.3, p. 597-635
- Erarslan, A., Denizci, A.A., Kazan, D., Abeln, E.C.A. 2004. Newly isolated *Bacillus clausii* GMBAE 42: an alkaline protease producer capable to grow under highly alkaline conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 96:320-327
- Erarslan, A., Kazan, D., Denizci, A.A., Öztürk, D.C., ve Karahan, N. 2005. Enzim Saflaştırmasında Temel Yöntemler. 8. Uygulamalı Eğitim Kursu Kitabı. TÜBİTAK Fen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Kocaeli.
- Esen, A. 1978. A simple method for quantitative, semi quantitative, and qualitative assay of protein. *Anal Biochem*, 89:264-273
- Estell, D.A., Graycar, T.P., Wells J.A. 1985. Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. *J Biol Chem* 260: 6518-6521
- Ferrero, M.A., Castro, G.R., Abate, C.M., Baigori, M.D., Sineriz, F. 1996. Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR29: isolation, production and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol* 45:327-332
- Fujimaki, M., Yamashita, M., Okazawa, Y., Arai, S. 1970. Applying proteolytic enzymes on soybean. 3. Diffusible bitter peptides and free amino acids in peptic hydrolysate of soybean protein. *J Food Sci* 35:215-218
- Fujiwara, N., Yamamoto, K., Masui, A. 1991. Utilization of a thermostable alkaline protease from an alkaliphilic thermophile for the recovery of silver from used X-ray film. *J Ferment Bioeng* 72:306-308

- Gessesse, A. and Gashe, B. A. 1997. Production of alkaline protease by an alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline soda lake. *Biotechnology Letters*, vol 19, no 5 pp; 479-481
- Gupta, R., Gupta K., Saxena, R.K., Khan, S. 1999. Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. *Biotechnolgy letters* 21:135-138
- Gupta, R., Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., Saxena, R.K. 2001. Characterization and wash performance analysis of an SDS-stable alkaline protease from *Bacillus* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 17:493-497
- Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P. 2002a. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:15-32
- Gupta, R., Beg, Q.K., Khan, S., Chauhan, B. 2002b. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:381-395
- Hameed, A., Keshavarz, T., Evans, C.S. 1999. Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K2, for use in leather processing. *J Chem Technol Biotechnol* 74:5-8
- Horikoshi, K., Takami, H., Akiba, T. 1990. Characterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer-Verlag 1990
- Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 63, No. 4, p. 735-750
- Hutadilok-Towatana, N., Painupong, A., Suntainalert, P. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. PS719. *J Biosci Bioeng* 87:581-587
- Jacobson, J.W., Glick, J.L., Madello, K.L. 1985 Composition for cleaning drains clogged with deptsits containing hairs. US Patent 4,540,506

- 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 Biochem* 37:139-144
- Kalisz, H.M. 1988. Microbial proteinases. *Advance Biochem Eng Biotechnol* 36:1-65
- Kang, B.S., Jeon, S.J., Kim, Y.M. 1999. Purification and chracterization of two extracellular proteases from *Oligotropha carboxydovorans* DSM 1227. *J Microbiol* 37:14-20
- 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 J Microbiol Biotechnol* 17:125-129
- Kim, W., Choi, K. Kim, Y., Park, H., Chol, J., Lee, Y., Oh, H., Kwon, I., Lee, S. 1996 Purification and characterization of a fibriynolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from chungkook-jangs. *App Environ Microbiol* 62:2482-2488
- Kudrya, V.A. and Simonenko I.A. 1994 Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 41: 505-509
- Kumar, C.G., Tiwari, M.P., Jany, K.D. 1998. Novel alkaline proteases from alkalophilic *Bacillus* spp.: purification and some properties. *Process Biochemistry* 34: 441-449
- Kumar, C.G., Takagi, H., 1999. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Advances* 17: 561-594
- Kumar, C.G. 2002. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. *Lett Appl Microbiol* 34:441-449
- Laemmli, U.K.1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*,227;680-685.
- Lee, S., Jang, D.J. 2001. Progressive rearrangement of subtilisin Carlsberg into orderly and inflexible conformation with Ca<sup>2+</sup> binding. *Biophys. J.* 81,2972-2978

- Longo, M.A., Novella, I.S., Garcia, L.A., Diaz, M. 1999. Comparison of *Bacillus subtilis* and *Serratia marcescens* as protease producers under different operating conditions. *J Biosci Bioeng* 88:35-40
- Mabrouk, S.S., Hashem, A.M., El-Shayeb, N.M.A., Ismail, A.M.S., Fattah, A.F.A. 1999. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresour Technol* 69:155-159
- Matsui, T., Matsufuji, H., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M., Osajima, Y. 1993. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolysates derived from sardine muscles. *Biosci Biotechnol Biochem* 57:922-925
- Nasri, M., Selami-Kamoun, A., Haddar, A., El-Hadj Ali, N., Ghorbel-Frikha, B., Kanoun, S. 2006. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiological Research*.
- Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., Saxena, R.K., Gupta, R. 2001. Characterization and wash performance analysis of an SDS-resistant alkaline protease from a *Bacillus* sp. *World J Microbiol Biotechnol* 17:493-497
- Ogino, H., Watanabe, F., Yamada, M., Nakagawa, S., Hirose, T., Noguchi, A., Yasuda, M., Ishikawa, H. 1999. Purification and characterization of organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PST-01. *J Biosci Bioeng* 87:61-68
- O'Mera, G.M., Munro, P.A. 1984. Selection of a proteolytic enzyme to solubilize lean beef tissue. *Enzyme Microb Technol* 6: 181-185
- Oyama, H., Kinjoh, M., Watari, M., Murao, S. 1997. Purification and characterization of an alkaline protease produced by *Pimelobacter* sp. Z-483. *J Ferment Bioeng* 84:351-353
- Puri, S. 2001 An alkaline protease from a *Bacillus* sp.: Production and potential applications in detergent formulations and degumming of silk. MSc thesis, University of Delhi, New Delhi
- Purva, S.K., Gupta, L.K., Gupta, J.K. 1998. Thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus* sp. IS-3. *Indian J Microbiol* 38:149-152

- Rebeca, B.D., Pena-Vera, M.T., Diaz-Castaneda, M. 1991. Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases; yield and nutritional value. *J Food Sci* 56:309-314
- Romero, F.J., Garcia, L.A., Salas, J.A., Diaz, M., Quiros, L.M. 2001. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown on whey. *Process Biochem* 36:507-515
- Ryu, H-W., Reddy, L.V.A., Wee, Y.-J. 2008. Purification and characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus* sp. RKY3. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*.
- Saeki, K., Hitomi, J., Okuda, M., Hatada, Y., Kageyama, H., Takajwa, M., Kubota, H., Hagihara, H., Kobayashi, T., Kawai, S., Ito, S. 2002. A novel species of alkaliphilic *Bacillus* that produces an oxidatively stable alkaline serine protease. *Extremophiles* 6:65-72
- Sarnaik, S.S., Nilegaonkar, S.S., Zambare, V.P., Kanekar, P.P., Dhakephalkar, P.K. 2006. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresource Technology* 98: 1238-1245
- Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C. 2001. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochem* 36:781-785
- Smacchi, E., Fox, P.F., Gobbetti, M. 1999. Purification and characterization of two extracellular proteinases from *Arthrobacter nicotianae* 9458. *FEMS Microbiol Lett* 170:327-333
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. 1986. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Vol 2, Baltimore: Willams and Wilkins.
- So, J.E., Shin, J.S., Kim, B.G. 2000. Protease-catalysed tripeptide (RGD) synthesis. *Enzyme Microb Technol* 26:108-114
- Sumandeep, B., Bhushan, B., Beg, Q.K., Hoodal, G.S. 1999. Partial purification and characterization of a thermostable alkaline protease of an alkalophilic *Bacillus* sp. NG-27. *Indian J Microbiol* 39:185-187

- Takami, H., Akiba, T., Horikoshi, K. 1989. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* 30:120-124
- Thangam, E.B. and Rajkumar, G.S. 2002. Purification and characterization of an alkaline protease from *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnol Appl Biochem* 35:149-154
- Woese, C.R and Wolfe, R.S., 1985. The bacteria, Volume VII, Academic Press, USA, 1985, ISBN: 0-12-307208-5
- Woese, C.R. 1999. Prokaryote Systematics. The evolution of a science In: The prokaryotes. A handbook on the biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications, 3rd. Edt., (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. and Stackebrandt, E., Eds). Springer-Verlag, New York (electronic publication)
- Wolff, A.M., Showell M.S, Venegas, M.G., Barnett, B.L., Wertz, W.C. 1996. Laundry performance of subtilisin proteases. In: Bott R, Betzel C (eds) subtilisin enzymes: practical protein engineering. Plenum Press, New York, pp 113-120
- Zhang, Y., Huang, Q., Peng, Y., Li, X., Wang, H. 2003. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. *Current Microbiology* Vol 46, pp.169-173

## **EKLER**

EK 1 Enzim aktivitesi'nde kullanılan kimyasalların hazırlanışları ve içerikleri

EK 2 Fenotipik testlerde kullanılan besiyerlerinin içerikleri

EK 3 SDS-PAGE'inde kullanılan stoklar ve hazırlanışları

EK 4 Native-PAGE'inde kullanılan stoklar ve hazırlanışları

## **EK 1 Enzim aktivitesinde kullanılan kimyasalların hazırlanışları ve içerikleri**

### **TCA (Trichloro asetic asit)**

0.1 M TCA                      1.633g/100ml

0.22 M Sodyum Asetat      2.993g/100ml

0.33 M Asetik Asit            1.891ml/100ml

0.1 M TCA, 0.22 M sodyum asetat 98ml dH<sub>2</sub>O'da çözülmüş ve 0.33M asetik asit ile hacim 100ml'ye tamamlanmıştır.

### **50mM Glisin-NaOH Tamponu**

50mM Glisin                    0.375/100ml

1N NaOH                        8.4g/20ml

50mM Glisin öncelikle 90ml dH<sub>2</sub>O'da çözülmüştür. Hazırlanan 1N'lik NaOH çözeltisi ile istenilen pH değeri ayarlandıktan sonra son hacim 100ml olacak şekilde dH<sub>2</sub>O eklenmiştir. Tampon süzülerek steril edilmiştir.

### **0.5M Sodyum Karbonat**

0.5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>            5.3g/100ml

0.5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 ml dH<sub>2</sub>O'da çözülmüştür.

### **2N Folin Reaktifi**

1:1 oranında dH<sub>2</sub>O ve Folin Reaktifi karıştırılarak hazırlanmıştır.

## **EK 2 Fenotipik testlerde kullanılan besiyerleri**

### **pH İsteği**

Nutrient Broth besiyerlerinin pH'sı %10'luk Sodyum karbonat çözeltisi ile pH 6.5-12.5'e ayarlanıp sterilize edilir. Bakteri ekiminden sonra 48-72 saat inkübasyona bırakılır.

### **Nişasta Hidrolizi**

%1 nişasta içeren Nutrient Agar besiyeri hazırlanıp sterilize edilir. 48-72 saatlik inkübasyondan sonra lugol ayracı damlatılarak amilaz zonu gözlenir.

### **Tirozinin Parçalanması**

0.5g L-tirozin 10ml dH<sub>2</sub>O'da homojenize edilir. Ayrıca 100ml Nutrient Agar hazırlanıp 121°C'de 20 dakika steril edilir. Sterilizasyondan sonra tirozin karışımının ve nutrient agar besiyerinin sıcaklığı 50°C olunca tirozin karışımı besiyerine eklendikten sonra petrilere dökülür. 48-72 saatlik inkübasyon sonunda besiyeri yüzeyinde zon oluşması pozitif sonuçtur.

## Üre Hidrolizi

Besiyeri İçeriği;

A		B	
Pepton	1g	Agar	15g
NaCl	5g	dH <sub>2</sub> O	900ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2g		
D-glukoz	1g		
Üre	20g		
Fenol Kırmızısı	0.012g		
dH <sub>2</sub> O	100ml		

A ve B homojenize edildikten sonra karıştırılır ve 7ml olacak şekilde tüplere paylaştırıldıktan sonra steril edilerek yatık besiyerleri hazırlanır. İğne uçlu öze kullanılarak ekim yapılır. Kırmızı renkli besiyerinin renginin mora dönüşmesi pozitif sonuçtur.

## Nitrat Kullanımı

Nitrat Broth;

Pepton	5g
Beef extract	3g
KNO <sub>3</sub>	1g
dH <sub>2</sub> O	1000ml

Besiyeri homojenize edildikten sonra 5'er ml olacak şekilde tüplere paylaştırılır. Dürham tüpü eklenir. Bakteri ekiminden sonra 24-48 saat inkübasyon gerçekleştirilir.

### I. Solüsyon

Sulfanik asit	8g
5N Asetik asit	1000ml

(1birim asetik asit, 2.5 birim dH<sub>2</sub>O)

### II. Solüsyon

$\alpha$ -naphtylamine	5g
5N asetik asit	1000ml

Deney sonucunu yorumlanması;

- a) İnkübasyon sonunda durham tüpünde gaz oluşumu da varsa sonuç pozitifdir yani nitrat nitrite indirgenmiştir. Nitratin parçalanması ileri boyutlara gitmiş ve  $\text{NH}_3$  ile  $\text{N}_2$  gazı oluşmuştur.
- b) İnkübasyon sonunda 5 damla I. Solüsyon ve 5 damla II. Solüsyon damlatılır. 30 saniye içerisinde kırmızı renk oluşumu gözlenirse nitrat nitrite indirgenmiştir.
- c) Kırmızı renk oluşumu gözlenmezse nitrit oluşmamıştır yani sonuç negatiftir.
- d) 30 saniyede kırmızı renk oluşumu gözlenmediği zaman yani sonuç negatif görünürken 4-5 mg Çinko tozu eklenir. Renk değişimi gözlenmezse nitrati nitrite indirgenmiştir ve parçalanma ileri boyutlara gitmiştir.
- e) Çinko tozu eklendiği zaman renk kırmızı olursa sonuç negatiftir yani nitrat nitrite indirgenmemiştir.

## IMVIC Testleri (İndol üretimi, Sitrat kullanımı, Metil Kırmızısı, Voges-Proskaver)

### İndol üretimi

Besiyeri içeriği;

Pepton	3g
Beef extract	3g
Femous ammonium sulphate	0.2g
Sodium thiosulphate	0.025g
dH <sub>2</sub> O	1000ml

Kovad's ayıracı;

p-dimethylaminobenzaldehyde	5g
izoamil alkol	75ml
6N HCl	25ml

18-24 saat inkübasyondan sonra 10 damla Kovak's ayıracı damlatılır. Besiyeri yüzeyinde kırmızı renkli halka oluşumu indol üretimi pozitifdir. Yeşil renkli halka oluşumu negatif sonuçtur.

### Sitrat kullanımı

Simmon's sitrat agar besiyeri sterilize edilir. 48-72 saat inkübasyon sonucundan yeşil renkli besiyerinin rengi prusya mavisine dönüşmesi pozitif sonuçtur.

### **Methyl Red testi (Asit belirlenmesi için)**

Clark-Lubs besiyeri;

Polypeptone	7g
Glukoz	5g
dH <sub>2</sub> O	1000ml

Metil Red ayıracı;

Metil kırmızısı	0.05g
%95 Etanol	150ml
dH <sub>2</sub> O	100ml

Besiyeri karışımı homojenize edildikten sonra 6ml olacak şekilde tüplere paylaşılır. 115°C' de 20 dakika steril edilir. 48-72 saat inkübasyondan sonra besiyerinin 2ml'si alınır ve 5-6 damla metil red ayıracı damlatılır.

### **Voges Proskaver testi**

1. ayıraç		2. ayıraç	
$\alpha$ -naphtol	5g	KOH	10g
%100 etanol	100ml	dH <sub>2</sub> O	100ml

Clark-Lubs besiyerinde 24 saat inkübasyonun ardından besiyeri karışımının 1ml'si tüpe alınır. 0.6 ml 1. ayıraç hemen ardından da 0.2ml 2.ayıraç damlatılır. 10-15dakika sonra kırmızı renk oluşumu asetoin pozitif demektir.

## **Karbohidratların kullanımı (Karbohidratlardan asit üretimi)**

### **Temel besiyeri**

Diammonium hydrogen phosphate	1g
Potassium Chloride	0.2g
Magnesium Sulphate	0.2g
Yeast extract	0.2g
dH <sub>2</sub> O	1000ml

15ml besiyerine %0.04 bromcresol purple eklenir. Durham tüpü içeren tüplere besiyeri 5ml olacak şekilde paylaştırıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika steril edilir.

%10'luk şeker çözeltileri filtre sterilasyonu ile steril edildikten sonra %0.5 son konsantrasyon olacak şekilde besiyerlerine eklenir. 24-48 ve 72 saatlik inkübasyonlar sonucunda mor renkli besiyerinin renginin sarıya dönüşmesi ve durham tüplerinde gaz oluşması pozitif sonuçtur.

### **EK 3 SDS-PAGE’inde kullanılan stoklar ve hazırlanışları**

#### **Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi**

Akrilamid	29.2 g
Bisakrilamid	0.8 g
dH <sub>2</sub> O	100 ml

#### **Yığıma Jeli (%4)**

Akrilamid/Bisakrilamid	0.82 ml
dH <sub>2</sub> O	2.93 ml
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25 ml
APS	30 µl
TEMED	5 µl

#### **Ayırma Jeli (%10)**

Akrilamid/Bisakrilamid	5.78 ml
dH <sub>2</sub> O	7.13 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.6)	4.33 ml
APS	86.7 µl
TEMED	8.16 µl

#### **Yükleme Tamponu Stoğu (pH 8.3)**

Trizma base	1.65 g
Glisin	8 g
SDS	1.4 g
dH <sub>2</sub> O	1100 ml

### **Örnek Tamponu (4X)**

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	5.12 ml
Gliserol	8 ml
SDS	2 g
dH <sub>2</sub> O	3 ml
Merkaptoetanol	4 ml
Bromofenol blue	2.10 <sup>-4</sup> g

### **Coomassie Brilliant Blue boya çözeltisi**

Coomassie Brilliant Blue R250	1.5 g
İzopropil alkol	250 ml
Glasiyel asetik asit	100 ml
dH <sub>2</sub> O	650 ml

### **Boya Giderme Çözeltisi**

İzopropil alkol	250 ml
Glasiyel asetik asit	100 ml
dH <sub>2</sub> O	650 ml

#### **EK 4 Native-PAGE’inde kullanılan stoklar ve hazırlanışları**

##### **Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi**

Akrilamid	29.2 g
Bisakrilamid	0.8 g
dH <sub>2</sub> O	100 ml

##### **Yığıma Jeli (%4)**

Akrilamid/Bisakrilamid	0.82 ml
dH <sub>2</sub> O	2.93 ml
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25 ml
APS	30 µl
TEMED	5 µl

##### **Ayrırma Jeli (%10)**

Akrilamid/Bisakrilamid	5.78 ml
dH <sub>2</sub> O	7.13 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.6)	4.33 ml
APS	86.7 µl
TEMED	8.16 µl

##### **Yükleme Tamponu Stoğu (pH 8.3)**

Trizma base	1.65 g
Glisin	8 g
dH <sub>2</sub> O	1100 ml

### **Örnek Tamponu (4X)**

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	5.12 ml
Gliserol	8 ml
dH <sub>2</sub> O	3 ml
Bromofenol blue	2.10 <sup>-4</sup> g

### **Coomassie Brilliant Blue boya çözeltisi**

Coomassie Brilliant Blue R250	1.5 g
İzopropil alkol	250 ml
Glasiyel asetik asit	100 ml
dH <sub>2</sub> O	650 ml

### **Boya Giderme Çözeltisi**

İzopropil alkol	250 ml
Glasiyel asetik asit	100 ml
dH <sub>2</sub> O	650 ml

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nilgün TEKİN  
Doğum Yeri : Finike  
Doğum Tarihi : 04.05.1983  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Özel Mahmut Celal Ünal Fen Lisesi (2001)  
Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2001-2005)  
Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim  
Dalı (Eylül 2005-Haziran 2008)

### Çalıştığı Kurum ve Yıl:

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı (Ağustos 2006-)