

28254

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROKARYOTLARDA PROTEOLİTİK AKTİVİTE



Fikret UYAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

(BİYOLOJİ ANABİLİM DALI)

EYLÜL - 1993 — DİYARBAKIR

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROKARYOTLARDA PROTEOLİTİK AKTİVİTE

Fikret UYAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

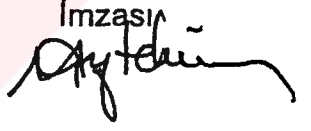


(BİYOLOJİ ANABİLİM DALI)

DİYARBAKIR

EYLÜL-1993

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne
DİYARBAKIR

Bu çalışma, jürimiz tarafından BİYOLOJİ Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

	Jüri üyesinin ünvanı ,	Adı Soyadı	İmzası
Başkan	:Doç.Dr.	M.Çetin AYTEKİN	
Üye	:Yrd.Doç.Dr.	N.Yavuz ENSARİ	
Üye	:Yrd.Doç.Dr.	Kadri BALCI	

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

7.1.9/1993


İmza

Prof.Dr.Zeki TEZ
Ünvanı Adı Soyadı
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bana bu araştırma konusunu veren, çalışmalarım sırasında desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, sağladığı olanaklar ve yakın ilgilerinden dolayı sayın hocam Yrd.Doç.Dr. Yavuz ENSARİ'ye sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamda yol gösterici fikirlerinden yararlandığım Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı sayın Doç.Dr. M.Çetin AYTEKİN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmamda, elektroforez bant profillerinin fotoğraflarını çeken sayın Yrd.Doç.Dr. Erhan ÜNLÜ'ye teşekkür ederim.

Bilgisayarını kullanmam inceliğini gösteren sayın Yrd.Doç.Dr. Kadri BALCI ve bilgisayar dizgisini gerçekleştiren Elektronik Mühendisi Ömer TURSUN'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Biyokimya Araştırma Laboratuvarında, birlikte çalıştığımız ve birlikteliğe güzel bir örnek oluşturduğumuza inandığım Arş.Gör.Zübeyde KAYA, Arş.Gör. Göksel UYSAN, Arş.Gör. Işıl GÜLSÜN ve Arş.Gör. Birol OTLUDİL'e teşekkür etmek isterim

İÇİNDEKİLER

1.	GİRİŞ	1
2.	ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	10
3.	MATERYAL VE METOD	11
3.1.	Biyolojik Materyal	11
3.2.	Kimyasal Maddeler	11
3.3.	Besiyeri ve Tampon Çözeltiler	11
3.3.1	Fosfat Tamponu	11
3.3.2	Proteaz Aktivite Tamponu	12
3.3.3	Dializ İşlemi	12
3.3.4	Dializ Hortumunun Hazırlanması	12
3.4.	Elektroforez İşlemi	12
3.5.	Protein Miktar Tayini	12
3.6.	Proteaz aktivite Tayini	12
3.7.	Bakteri Ölçümü	12
3.8.	Bakterilerin Üretimi	13
3.9.	Kültürden Bakteri İzolasyonu	13
3.10	Amonyum Sülfat Çökeltmesi	13
3.11	Enzim Saflaştırma İşlemi	13
3.12	Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi (AAS) ile Çinko Tayini	14
4.	BULGULAR	15
4.1.	Nötral Proteaz Saflaştırılması	15
4.2.	AAS'de Çinko Tayini	20
4.3.	Kazein Sindirim Metodu ile Kazein İçin Km Değerinin Saptanması	21
4.4.	N.B. Sıvı Besi Yerinde B. subtilis'in Üreme Evrelerinin İncelenmesi	21
4.5.	Nötral Proteazın Sentez Koşullarının Belirlenmesi	22
5.	TARTIŞMA VE SONUÇLAR	24
6.	KAYNAKLAR	27
7.	ÖZGEÇMİŞ	30

Son yıllarda özellikle Biyoteknoloji biliminin gelişmesi ile çeşitli enzim ve proteinlerin üretiminde mikroorganizmalara yönelinmiştir. Bu yolla gelişmiş bir çok ülke ekonomilerine büyük katkılar sağlamaktadırlar.

Çalışma materyali olarak seçtiğimiz Çermik Termal Kaplıcalarından izole edilen *Bacillus subtilis* gerek kolay üretilmesi gerekse bir çok eksoenzim salgılaması nedeniyle uygun bir materyal olarak tesbit edilmiştir. Üretim ve saflaştırma aşamalarından sonra elde edilen Nötral Proteazın uygun aktivitede olması ve ortamda çinko varlığında Nötral Proteaz aktivitesinin artış göstermesi biyoteknolojide yeni gelişmelere neden olacağı sanılmaktadır.

Bu enzimin deterjan ve deri sanayisinde kullanılması nedeninden dolayı ülkemiz ekonomisi için önemli bir yer tutmaktadır. *B.subtilis*ten elde edilip saflaştırılan Nötral Proteazın biyokimyasal özellikleri incelenmeye çalışılmıştır.

Bu çalışmada Çermik Termal kaplıcalarından izole edilerek tür teşhisi yapılan termotoleran *Bacillus subtilis* kullanıldı.

B.subtilis'in hangi besi ortamında daha iyi Nötral proteaz ürettiği saptanarak bu ortamdan nötral proteazın saflaştırılmasına gidildi. Yapılan deneylerde 10^{-5} M Zn^{2+} içeren nutrient broth besiyerinde üretilen *B. subtilis*'in salgıladığı nötral proteazın hem aktivite yönünden, hem de salgılanan enzim miktarı bakımından en uygun besi ortamı olduğu saptandı.Saf olarak elde edilen Nötral proteaz için molekül ağırlığı 29.000 Dalton, Km değeri de 0.952 olarak belirlendi.

In this study , thermotoleran *Bacillus subtilis* which isolated from Çermik thermal hot spring and identified has been used.

The most appropriate growth medium in producing of the neutral protease was determined and the neutral protease was purified from this medium.

With the experiments have been done, neutral protease of *B.subtilis* that produced in nutrient broth which contains 10^{-5} M Zn^{2+} , both activity and amount of secreted enzyme has been obtained as the best growth medium.

It was counted that molecular weight of the purified neutral protease was 29.000 Dalton and for K_m was 0.952.

1. GİRİŞ

Canlılar evrimine bir göz attığımızda, mikroorganizmaların dünyamızda ilk oluşan canlılardan olduklarını görürüz. Mikroorganizmaların bazıları yer yüzünde yaşam koşullarının çok değişmesine rağmen, değişen durumlara karşı uyum yetenekleri sayesinde varlıklarını zamanımıza dek sürdürmüşlerdir.

Yüksek sıcaklıklarda yaşayan mikroorganizmaların doğal çevreleri kaplıcalardır. Yeryüzünde ender bulunan arsenik, florür ve altın gibi elementlerin çoğu, kaplıcalarda düşük ve farklı konsantrasyonlarda bulunurlar. Bir çok kaplıcanın içerdiği radyoaktivite yeryüzü sularındakinden pek fazla değildir. Bazı kaplıcalar silikat, bazıları CaCO_3 , elementel sülfür, hepsi olmazsa bile bir çok kaplıca H_2S ihtiva eder. Mikroorganizmaları sıcaklığa bağlı olarak yapılan en genel sınıflandırmaya göre üç sınıfta toplayabiliriz (1).

1-Psikrofil Bakteriler: Bu gruptaki bakteriler 0°C ile 25°C arasında iyi büyürler. 30°C 'ın üzerindeki sıcaklıklarda ölmeye başlarlar.

2-Mezofil Bakteriler: Bu gruptaki bakteriler 20°C ile 45°C arasında yaşamlarını sürdürürler.

3-Termofil Bakteriler: Büyümeleri için yüksek sıcaklığa gereksinim gösteren bakterilerdir. 45° ile 60°C arasında yaşamsal faaliyetlerini sürdürürler. Fakültatif termofiller olarak adlandırılan bazı bakteri türlerinin büyüme sınırları mezofil organizmaların sıcaklık sınırlarına yaklaşabilir. Bu gruba giren ancak mutlak termofil olan *Thermus aquaticus* bakterisi 79°C 'ta normal büyüme gösterir. Fakültatif termofil bakteriler kullandıkları enerji kaynaklarına göre de farklılık gösterir. Örneğin enerji kaynağı olarak güneş enerjisini kullanan

"Fotosentetik termofil bakteriler" ve enerjilerini bazı organik ve inorganik bileşiklerin redoks potansiyelleri reaksiyonlarıyla karşılayan "Kemosentetik termofil bakteriler" gibi (2).

Bir bakterinin özgül özellikleri (Bir karbohidratı kullanma, amino asitleri sentezleyebilme v.b) belirli bir enzim yada enzimleri sentezleme yeteneğine sahip olmasına bağlıdır. Bir bakteri türünü diğer bir türden farklı yapan nedenlerden biri belirli enzimleri sentezleme yeteneklerindeki farktan kaynaklanmaktadır (3).

Farrell ve Campbell termofilik kaynaklardan elde edilen enzimleri üç ana sınıfa ayırmışlardır. İlki, 55-65°C'ta sentezleri gerçekleşen ve kararlı olan enzimleri kapsar. Bu enzimler sentezin gerçekleştiği sıcaklığın biraz üzerinde inaktif olan enzimlerdir. İkincisi, sadece substrat varlığında sentezin gerçekleştiği sıcaklıkta aktif olan enzimleri ihtiva eder. Üçüncüsü ise, yüksek derecede ısıya dayanıklı olan ve sentezin gerçekleştiği sıcaklığın yukarısındaki sıcaklıklarda da dayanıklı olan enzimleri kapsar (4).

Diğer yaşam formlarının ölümüne yol açan yüksek sıcaklıklarda termofil bakterilerin nasıl yaşadıkları sorusuna bu bakterilerin biyomoleküllerinin dayanıklılığı temel alınarak cevap verilebilir.

Termofil bakterilerde önemli biyomoleküllerin analizi yapıldığında proteinlerinde, nükleik asitlerinde ve lipitlerinde detaya inildiğinde yapısal farklılıklar belirlenmiştir. Mutlak termofil bakterilerin membran lipitleri, mezofillerinkinden daha fazla doymuş düz zincirli yağ asitleri ihtiva eder. Bu olgu yüksek sıcaklıkta membranın akışkanlığını sağlayıp termofil bakterilerin daha yüksek sıcaklıklarda yaşamasına yardımcı olur (2.5.6). Böylece membranın akışkanlığını koruması için gerekli, sıvı kristal \Leftrightarrow katı jel dengesi yüksek sıcaklıkta kurulmasını olası kılmaktadır.

Mezofil ve Termofil bakterilerden elde edilen nükleik asitlerin Guanin, Sitozin kapsamı önemli bir şekilde farklılık gösterir (7.8). Ayrıca termofillerin t-RNA'ları termal dayanıklılığa sahip olmak için ilginç bir yapı kazanmışlardır. Örneğin *Thermus* türlerindeki t-RNA'nın termofilik koşullara adaptasyonundan sorumlu özgün baz çiftleri daha fazla miktarda Guanin Sitozin bazları ihtiva eder. Guanin Sitozin oranının fazlalığı hidrojen bağlarının da fazlalaşmasına ve dolayısıyla artan sıcaklıklara daha dayanıklı bir yapı kazanmalarına neden olur (8.9).

Termofil bakterilerin dayanıklı enzimleri detaylı bir şekilde incelenmiştir. *Clostridium*'dan elde edilen saf ferrodoksinlerin yapısı incelendiğinde, çok sayıda bazik amino asitlere rastlanmıştır. Bu durum protein içerisinde daha fazla iyonik bağların oluşmasını sağlamakta ve bu sayede protein sıcaklığa dayanıklı hale gelmektedir. Ayrıca mezofil ve termofil türlerden saflaştırılan Laktat dehidrojenaz enziminin aktif bölgesinde Arginin ve Lizin gibi polar amino asitlerin sayısı karşılaştırıldığında, termofil bakterilerde bu amino asitlerin sayısında bir fazlalık olduğu görülmüştür. Bu da moleküllerin iç tarafında hidrojen ve iyonik bağların etkileşiminin fazla olmasına ve dolayısıyla aktif merkezin kararlılığının artmasına neden olur (9). Yine mezofillerden elde edilen DNA polimeraz enzimi yüksek sıcaklıklarda yeterince işlev görmeyişi nedeniyle, *Thermus aquaticus*'tan saflaştırılan sıcaklığa dayanıklı DNA polimeraz enzimi kullanılarak daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir (8). Bir proteinin yapısındaki tek veya daha fazla belli amino asit artıklarının değişmesi proteinin sıcaklığa dayanıklılığını değiştirebilir.

Genel olarak termofiller tarafından meydana getirilen bir tek amino asit değişimi:

a- Protein molekülünün dış kısımları üzerinde olabilir.

b- Bunun sonucu sarmal yapıda bir amino asidin karbonil grubu ile ondan sonra gelen 3. amino asidin amino grubu arasında Hidrojen bağlarının kurulduğu (Beta-turn) kararlı yapıya ulaşır.

Proteinlerin ısı toleransının arttığı durumlarda genellikle aşağıda verilen bazı amino asitlerin yerine değişik amino asitlerin bulunduğu gözlenmiştir (Tablo 1) (10).

Mezofil	Termofil proteinler
Glutamik asit	Aspartik asit
Glutamin	Lizin
Treonin	Valin
Asparajin	Serin
Treonin	İzolösin
Aspartik asit	Asparajin

TABLO-1 Mezofil ve Termofil Proteinlerdeki amino asitlerin karşılaştırılması

Argos ve arkadaşları mezofil ve termofillerden saflaştırdıkları Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz enziminin amino asit sırasını karşılaştırmışlar ve amino asitlerdeki bu değişiklikler nedeniyle incelenen bu proteinlerin daha sıkı bir şekilde paketlenildiği sonucuna varmışlardır (11).

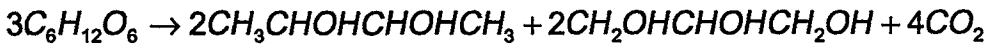
Clostridium thermosaccharolyticum ve *Clostridium tartarivorum*'da ferrodoksinin amino asit sırası temel olarak aynıdır. Sadece birincisinin 31. ve 44. amino asit artıkları glutamin diğzerinin ise glutamik asittir. Perutz ve Raidt, yaptıkları çalışmada bu proteinin 31. amino asidi olan Glutamik asit ve 29. amino asidi olan Lizin arasındaki iki ekstra tuz köprülerinin olabilmesi buna ek olarak 44. amino asit olan Glutamik asidi, bu iki enzimin termostabilite farkı için yeterli bulmuşlardır. *Clostridium tartarivorum*'dan elde edilen ferrodoksinin 70°C'ta 2 saat sonra aktivitesinin %50 sini, fakat diğzer bakteriden elde edilen protein aynı sıcaklık ve zamandaki aktivitesini ise %10 olarak belirlemişlerdir (12).



1.1 Mikroorganizmaların ekonomik önemi:

Bilindiği gibi bir çok mikroorganizma doğadaki organik maddelerden yararlanmak suretiyle yaşamlarını sürdürmektedirler. Aldıkları besin maddelerini kendi bünyelerinde kullandıktan sonra değerlendiremedikleri bazı organik bileşikleri dışarı atarlarki bunlara son rün denir. Bu biyodönüşüm reaksiyonlarının son ürünleri çok çeşitli yerlerde kullanılmaktadır. Bu biyodönüşüm reaksiyonlarından yararlanan bir bakteri türü de *Bacillus subtilis*'tir.

B.subtilis'in ürettiği ortama karbon kaynağı olarak sakkaroz veya rafinoz ilavesiyle bir polifruktozan olan Levan'ı üretebilir. Levansakkaraz enzimi sakkaroz molekülünden fruktoz kısmını levanın büyüyen zincirine doğru ekler. Ortamda levan miktarının oluşmasıyla beraber, glukoz ve az miktarda fruktoz da birikmektedir (13.14). *B.subtilis*, D-(-) ve mezo-2,3-Bütandiol oluştururken gliserin, etanol ve laktik asit yan ürün olarak ortaya çıkar (15).



Bütandiol

Gliserin



Etanol



Laktik asit

Neish teknik gliserin üretimi için *B.subtilis* tartışmıştır (16). L-İzolösin (15), D-Riboz (17), Kristal halde B12 (18), Urocan asidi (19), Natto (20), L-Glutamik asit (21) üretimi için *B.subtilis* kullanılmıştır. Buğday proteininden %75 D-Glutamik asitten ve %25 L-Glutamik asitten oluşan bir polipeptit

oluşturan *B.subtilis* ilgi çekmiştir (22). Önemli polipeptit antibiyotiklerden, Mycobacillin (23), Bacitrasin A (24), Subtilin (25) *B.subtilis*'ten elde edilmiştir.

1.2 Mikroorganizmalarda büyüme:

Büyüme, bir organizmanın yapısı ve hücresel içeriklerinde dolayısıyla boyutlarında ve ağırlığında bir artış olarak tanımlanır. Mikroorganizmaların boyutlarının çok küçük olması nedeniyle hücre büyümesinin ölçümü yerine populasyon büyümesi üzerinde durulur. Bir mikroorganizma populasyonunun büyümesi esnasında başlıca dört faz "evre" ayırt edilir.

Lag faz (Gizli evre) : Bir mikrobiyal populasyon taze bir ortama inoküle edildiğinde süresi şartlara bağlı olarak değişen bir Lag fazdan sonra büyüme görülür.

Eksponansiyel faz (Logaritmik evre) : Lag fazı takip eden bu fazda büyüme oranı maksimuma ulaşır.

Stationer faz (Sabit evre) : Çoğalma ile oluşan hücre sayısı otoliz yoluyla kaybolan hücre sayısına dengelendiği evre.

Ölüm fazı : Canlı hücre sayısının gittikçe azaldığı bu evrede büyüme oranı gibi ölüm oranıda sabittir.

1.3 Bakteriyel Eksoenzimler

Bir çok bakteri ürettiği ortama salgıladıkları, bu enzimlerin temel fonksiyonlarından biri mikroorganizmaya kullanılabilir besin sağlamaktır. Diğer bir fonksiyonu ise enfeksiyon işlemlerinde saldırgan mekanizma olarak iş görmektedir.

Son yıllarda bakterilerin eksoenzimleri üzerinde çalışmalar oldukça yoğunlaşmıştır. Bu eksoenzimlerden salgılayan ve üzerinde çokça çalışılan bir bakteride *Bacillus subtilis*'tir. *B.subtilis*'in eksoenzimlerinden biri olan α -amilaz ortamdaki karbon kaynağı ve inorganik tuzlar varlığında üretilip izole edilmiştir (26.27). Deschereider α -amilazın varlığını poliakrilamid jel elektroforezinde göstermiş ve izolasyonu ile ilgili çalışmalar yapmıştır (28).

B.subtilis'in çeşitli nesillerinden izole edilen ekstraselluler proteazların iki tipinden biri olan Metallo enzimler nötral pH'da (29), diğeri olan Serin enzimler ise bazik pH değerlerinde aktiftirler (30). Schaeffer çalışmasıyla proteolitik aktivitenin sporlaşmaya bağlı olduğunu göstermiştir (31). Gerald eksponansiyel fazın sonunda, sporlaşmanın başlangıç ve paralelinde proteaz sekresyonu ve üretiminde artış olduğunu göstermiştir (32).

Bacillerin bir çok soyu tarafından üretilen subtilisin olarakta bilinen alkalın proteazın sporlaşma için önemli olduğu rapor edilmiştir (33).

Metallo enzim olan Nötral proteazın bir Çinko atomu içerdiği ve EDTA ile inaktif hale getirilebileceği gösterilmiştir (29). Nötral proteaz sırasıyla kazein, hemoglobin, albumin, jelatini daha iyi bir şekilde hidrolizlediği

bildirilmiştir. Aynı çalışmada bu enzimin papain, chymopapain, trypsin ve chymotrypsinden 5 ile 16 kez daha aktif olduğu, enzimin yağ asitleri veya amino asit esterlerini hidrolizlemediği, enzimin Ca ve diğer toprak alkali metaller varlığında stabil ve otolizinin en az olduğu ve saflaştırma esnasında enzimin spesifik aktifliği ile çinko bileşenleri arasında direkt orantı olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada enzimin her bir molünde 1 atom gram çinko içerdiği ve molekül ağırlığının 30.000 ile 40.000 Dalton arasında olduğu bildirilmiştir (29).

Yapılan çalışmalarda bu enzimin prostetik grubunun çinko olduğu saptanmıştır (34). Yine bu araştırmacı tarafından yüksek esterolitik aktiviteli ve düşük proteolitik aktivite gösteren esteraz olarak tanımlanan enzim bu araştırmacı tarafından saflaştırılmıştır. Sporlaşmanın başlangıç ve paralelinde üretilmeye başlanan alkalın serin proteaz (subtilisin) ve nötral (metalo) proteaz kültür süpernatant sıvısındaki total proteaz aktivitesinin %96-98'ine sahip olduklarından bunlara major ekstrasellular proteaz denmiştir (34.35.36.37). Minör ekstraselluler proteaz olarak adlandırılan metaloproteaz (38) ve bacillopeptidaz (39) saflaştırılıp izole edilmişlerdir (40).

B.subtilis'in nötral proteazı, *Bacillus thermoproteoliticus*'tan saflaştırılan termolizinle %56 homoloji gösterdiği saptanmıştır (41). Thomas yaptığı çalışmada poliakrilamid jel elektroforezi ile esteraz A ve esteraz B olarak adlandırdığı iki proteinin molekül ağırlıklarını sırasıyla 160.000 ve 51.000 Dalton olarak saptamıştır (42). Son yıllarda *B.subtilis*'in proteaz genlerinin klonlanması ve haritalanması üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Alkalın ve nötral proteazın sırasıyla apr ve npr genleri tarafından kodlandığı gösterilmiştir (43.44.45).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

B.subtilis'in çeşitli nesillerinden izole edilen ekstraselluler proteazların iki tipinden biri olan Metallo enzimler nötral pH'da (29), diğeri olan Serin enzimler ise bazik pH değerlerinde aktiftirler (30).

Schaeffer çalışmasıyla proteolitik aktivitenin sporlaşmaya bağlı olduğunu göstermiştir (31). Gerald eksponansiyel fazın sonunda, sporlaşmanın başlangıç ve paralelinde proteaz sekresyonu ve üretiminde artış olduğunu göstermiştir (32).

Bacillerin bir çok soyu tarafından üretilen subtilisin olarakta bilinen alkalın proteazın sporlaşma için önemli olduğu rapor edilmiştir (33).

Metal enzim olan Nötral proteazın bir Çinko atomu içerdiği ve EDTA ile inaktif hale getirilebileceği gösterilmiştir (29). Nötral proteaz sırasıyla kazein, hemoglobin, albumin,jelatini daha iyi bir şekilde hidrolizlediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada bu enzimin papain,chymopapain, trypsin ve chymotrypsinden 5 ile 16 kez daha aktif olduğu, enzimin yağ asitleri veya amino asit esterlerini hidrolizlemediği, enzimin Ca ve diğer toprak alkali metaller varlığında stabil ve otolizinin en az olduğu ve saflaştırma esnasında enzimin spesifik aktifliği ile çinko bileşenleri arasında direkt orantı olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada enzimin her bir molünde 1 atom gram çinko içerdiği ve molekül ağırlığının 30.000 ile 40.000 Dalton arasında olduğu bildirilmiştir (29).

Yapılan çalışmalarda bu enzimin prostetik grubunun çinko olduğu saptanmıştır (34).

3. MATERYAL VE METOD

3.1- Biyolojik Materyal: Çermik termal kaplıcalarından izole edilerek tür teşhisi yapılan termotoleran *Bacillus subtilis* kullanıldı.

3.2- Kimyasal maddeler:

Elektroforetik malzemeler: Acrylamide, N-N'bis-acrylamide, MET (2-Mercaptoetanol), SDS (sodyum dodesil sülfat), TEMED, Riboflavin, Glicine, Coomassie brilland blue R-250, standart proteinler (Albumine bovine, albumine egg, tripsin inhibitör, carbonic anhidrase) Sigma, St. Louis'ten Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, Na_2CO_3 , Na-K-tartarat, CuSO_4 , Na_3 -Citrate, D-glukoz, K_2HPO_4 , Na_2WO_4 , Na_2MoO_4 , H_3PO_4 , HCl, Li_2SO_4 , Br_2 , FeSO_4 , ZnCl_2 , CaCl_2 , MnCl_2 , Tris Base, Tris HCl, TCA (Trichloroacetic acid), $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, NaOH, KOH, KH_2PO_4 , CH_3OH , CH_3COOH , Gliserin, MgSO_4 , KCl, K-EDTA, Kazein, Merck Darmstag'tan.

N.B. (Nutrient Broth) ve Agar ise Bacto'dan temin edilmiştir.

3.3-Besi yeri ve tampon çözeltileri:

Amaca uygun olarak hazırlanan N.B.sıvı besi yeri (KCl , 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.125 g/L, MnCl_2 , 10^{-5}M , CaCl_2 , 10^{-3}M , FeSO_4 , 10^{-6}M , ZnCl_2 , 10^{-5}M , N.B. 8g/L) NaOH ile pH 7.2'ye ayarlandıktan sonra otoklavlanarak steril hale getirildi. Ayrıca Spinzer'in glukoz-mineral besi yeri (46) 14 gr K_2HPO_4 , 6 gr KH_2PO_4 , 2 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 gr Na_3 -Citrate, 0.2 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 L. saf suda çözülerek otoklavlandı. Otoklavlamadan sonra 5 gr D-glukoz steril şartlarda ilave edildi.

3.3.1-Fosfat Tamponu: 19 ml 0.2M KOH, 50 ml 0.1 M KH_2PO_4 100 ml'ye seyreltilerek hazırlandı.

3.3.2-Proteaz Aktivite Tamponu: 0.2M Tris tamponu (pH 7.2) hazırlanarak kullanıldı.

3.3.3-Dializ İşlemi: 0.002 M CaCl_2 içeren 0.1 M Tris HCl tamponuna (pH 8.1) karşı yapıldı.

3.3.4-Dializ Hortumunun Hazırlanması: Dializ hortumunun miktarına bağlı olarak (yaklaşık 500 ml) 10 mM K-EDTA (pH 7) su içerisinde 90°C 'ta kaynatılarak dializ hortumu 3 dakika süreyle bu sıvı içinde bekletildi. Üst sıvı dökülüp dializ hortumu bol miktarda saf su ile yıkanarak kullanıldı. Stok olarak saklanıp kullanılincaya kadar 4°C 'ta saf su içerisinde bekletildi.

3.4-Elektroforez İşlemi: Elde edilen enzim çözeltileri Weber - Osborn (47) yöntemine göre elektroforez işlemine tabi tutuldular.

3.5-Protein Miktar Tayini: Lowry (48) ve Warburg Christiyan (49) yöntemine uygun olarak yapıldı.

3.6-Proteaz Aktivite Tayini: Proteaz aktivite tayini Kunitz (50) yöntemine göre yapıldı. Proteolitik aktivite kazein sindirim metodu ile tespit edildi. 0.1 ml enzim çözeltisi, 1.8 ml 0.2 M Tris tamponu (pH 7.2), 0.1 ml 0.06M CaCl_2 ve 1 ml %1'lik denatüre edilmiş kazein çözeltisi (pH 7) içeren ortama ilave edildi. 37°C 'ta 30 dakika inkübasyondan sonra %10'luk TCA çözeltisinden 2 ml ilave edilerek reaksiyonun durması sağlandı. 4°C 'ta 30 dakika bekletildikten sonra filtre edilen çözeltinin absorbansı 275 nm'de okundu.

3.7-Bakteri Ölçümü: Kültürler çalkalayıcıda 37°C'ta inkübe edildi. Büyüme 460 nm'de Absorbans değerleri ölçülerek tespit edildi. Bakterinin lag, logaritmik, stasyonier ve ölüm fazının hangi saatlere denk geldiği tespit edildi.

3.8-Bakterilerin Üretimi: Bakteriler enzim çalışması için N.B. besi yerinde üretildi. Katı besi yerinde 100 ml'lik besi yerine aktarılan bir koloni 37°C'ta 60 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra bu ortamdan homojenliği sağlamak için çalkalandıktan sonra alınan 100 µl'lik kültür örnekleri 100 ml'lik yeni N.B. sıvı besi yerine aktarılarak 60 saat inkübasyona bırakıldı. Bu kültür sıvısının 10 ml'si 2 lt'lik besi yerine ilave edilerek 51 saat süreyle 37°C'ta çalkalamalı olarak inkübasyona bırakıldı.

3.9-Kültürden Bakteri İzolasyonu: Bakteriler inkübasyon süresi sonunda 4°C'ta 5000 g'de 20 dakika santrifüjlemeyle üst sıvı ile çökelti birbirinden ayrıştırılıp üst sıvı enzim çalışması için kullanıldı.

3.10-Amonyum Sülfat Çökeltmesi: Amonyum sülfat havanda iyice ezilerek pudra haline getirilip, etki yüzeyinin genişletilmesi sağlandı. Yukarıda elde edilen üst sıvıya oldukça yavaş bir şekilde Amonyum sülfat ilave edildi. Amonyum sülfat çökeltmesi sonucu elde edilen çökelti 24 saat süre ile dializ tamponuna karşı dializlenerek Amonyum sülfattan kurtarıldı.

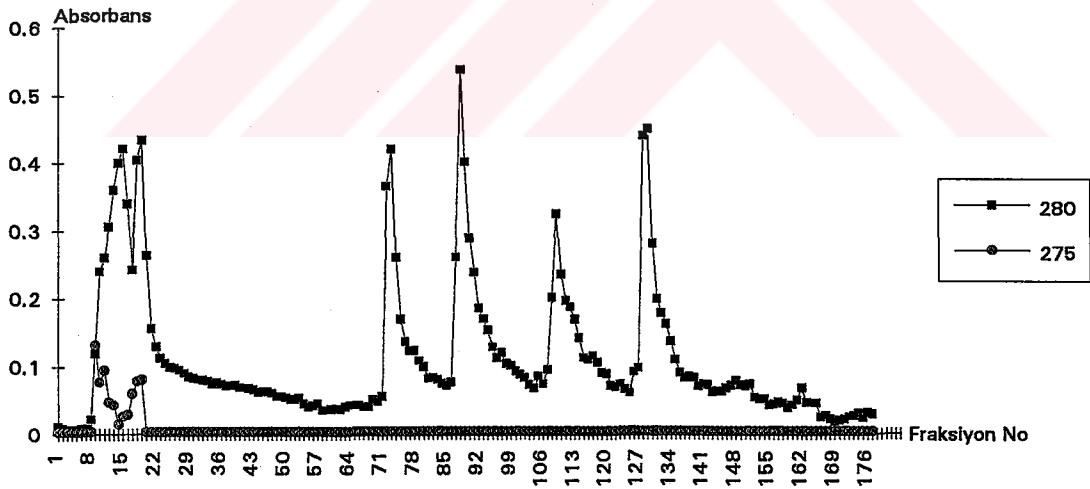
3.11-Enzim Saflaştırma İşlemi : Proteolitik aktivite maksimumda olduğu zaman hücreler 5000 g'de 20 dakika santrifüjleme ile çöktürüldü. Saflaştırma adımlarının tümü 4°C'ta gerçekleştirildi. Çalışma kültür süpernatant sıvısının 2 L'si ile yapıldı. Ham çözeltinin 2 litresine katı amonyum sülfat 0.63 doygunluğa gelinceye kadar oldukça yavaş bir şekilde ilave edildi. Amonyum sülfat ilavesinden sonra karışım 4 saat bekletildi. Daha sonra santrifüjlenen sıvının çökeltisi alındı ve 0.002M CaCl₂ içeren 0.1M Tris tamponunun (pH 8.1) 50

ml'sinde çözünür hale getirildi. Elde edilen karışımın her bir mililitresine katı amonyum sülfat 0.45 gr gelecek şekilde ilave edildi, Amonyum sülfat ilavesinden sonra karışım 30 dakika bekletildi. Santrifüjlenen karışımın çökelti aynı tamponun 2 ml'sinde çözünür hale getirildi. Elde edilen çözelti daha sonra amonyum sülfat ayrılincaya kadar dializ tamponuyla dializlenerek amonyum sülfattan kurtarıldı. Dializlenen çözelti Tris-Ca tamponuyla dengeye getirilmiş DEAE Sephadex A-25 (1x17cm) kolonuna uygulandı. Elüsyon kademeli olarak 100mM'dan 1M'a kadar NaCl ile gerçekleştirildi. Bu kolondan elde edilen fraksiyonların absorbansı 280 nm'de okundu. Proteolitik aktivite tayini yukarıda anlatıldığı gibi 275 nm'de yapılarak Nötral proteazın hangi fraksiyonlarda toplandığı saptandıktan sonra nötral proteaz aktivitesi gösteren fraksiyonlar birleştirildi. Liyofilizasyon ile hacmi küçültülen bu enzim karışımı Sephadex G-75(1x25 cm) kolonuna uygulandı. Fraksiyonların absorbansı 280 nm'de okunarak Nötral proteaz aktivitesi saptanan fraksiyonlar birleştirildi. Birleştirilen bu fraksiyonlar CM-Sephadex C-25 (1x17) kolonuna uygulandı. 100mM'dan 2M'a kadar NaCl çözeltileri ile gerçekleştirilen elüsyon sonucu Nötral proteaz aktivitesi saptanan fraksiyonlar 0.1M fosfat tamponuyla (pH 6) dengelenmiş CM-Sephadex C-50 (1x17) kolonuna uygulanarak Nötral proteaz saf olarak elde edildi. Çalışmanın başlangıç esnasından Nötral proteazı saf elde edinceye kadarki tüm işlemlerden elde edilen ürünlere protein miktar tayini ve proteolitik aktivite tayini yapıldı. Ürünlere eşit miktarda protein verilerek elektroforez bant profilleri incelendi.

3.12-Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi (AAS) İle Çinko Tayini : Saflaştırılan Nötral proteaz enzimini içeren 1 ml çözelti örneği alınıp, AAS (Varian Techtron Model 1200)'de çinko tayini yapıldı.

4. BULGULAR

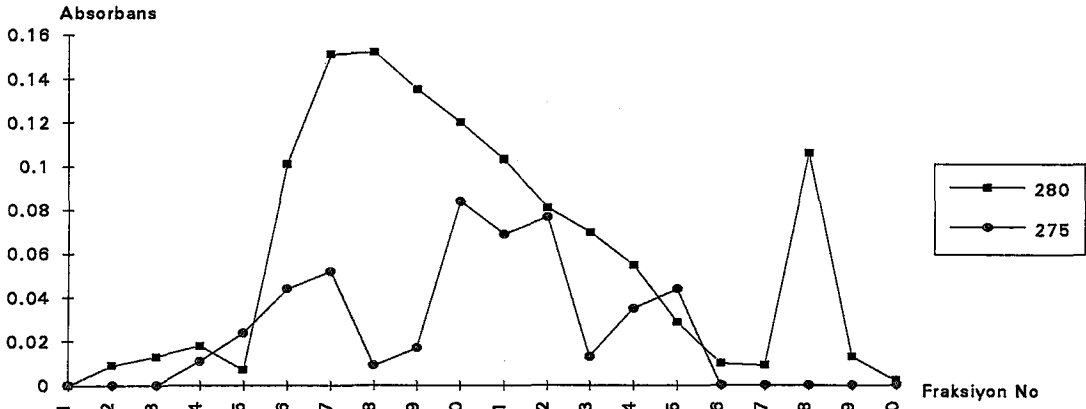
4.1.-Nötral Proteaz Safılaştırması : Bakterileri santrifüj ile çöktürme işleminde sonra yapılan aktivite tayininde nötral proteaz aktivitesi saptanan sıvıya uygulanan protein miktar tayininde 777.190 mg. total protein saptandı. 0.63 doygunluktaki amonyum sülfat ilavesinde aktivite tayini yapılan sıvıda protein miktar tayini sonucu 105 mg. total protein saptandı. Elde edilen çökeltilinin her bir mililitresine 0.45 gr amonyum sülfat ilavesinden sonra proteaz aktivitesi saptanan sıvının dializlenmesinden sonra dializlenen sıvıdaki total protein miktarı 15.525 mg/ml olarak bulundu. Bu enzim çözeltisinin miktarı 12.5 ml olarak ölçüldükten sonra DEAE Sephadex A-25 kolonuna bu miktar uygulandı. 2'şer mililitrelik fraksiyonların absorbansları 280 nm'de okunarak bu Absorbans değerlerinin en yüksek değerleri arasında aktivite tayini yapılarak Nötral proteaz fraksiyonları saptandı.



Tablo 2: Dializ edilen örneğin A-25 kolonundaki 275 ve 280 Absorbansları

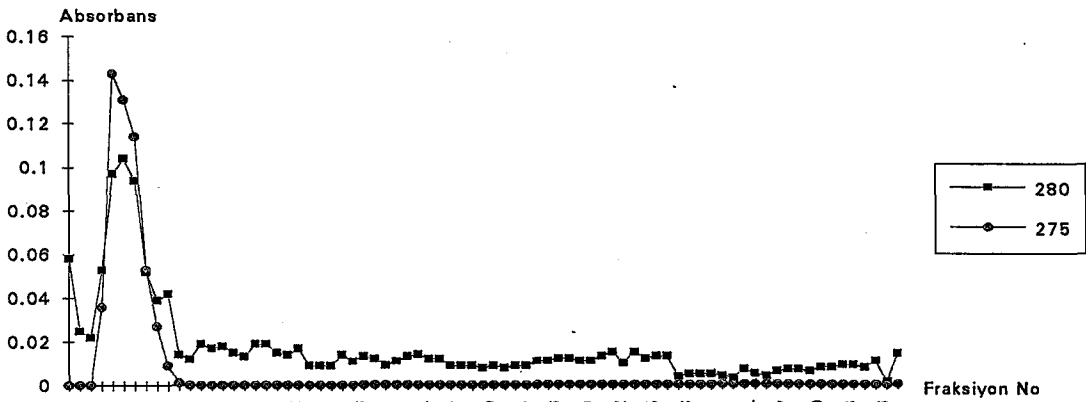
Yapılan aktivite tayinleri sonucu DEAE Sephadex A-25 kolonundan Nötral proteazın 100mM'da tamamen indiği saptandı. Alınan 9-19. tüpler arası DEAE Sephadex A-25 kolon fraksiyonları liyofilize edilerek hacminin 1 ml'ye düşmesi

sağlandı. Bu örnekteki proteaz aktivitesi saptanarak total protein miktarı 0.249 mg/ml olarak saptandı. Buradan elde edilen protein G-75 kolonuna verildi.



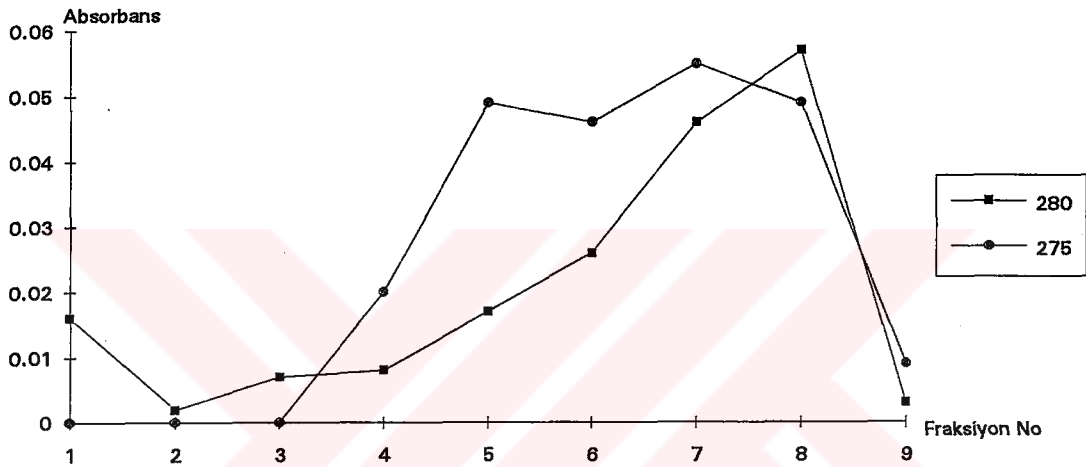
Tablo 3: A-25'ten elde edilen birer mililitrelik fraksiyonların dializ edildikten sonra verildiği G-75 kolonundaki proteinlerin 275 ve 280'deki Absorbansları

Bu kolondaki fraksiyonların 280 nm'deki absorbanslarının okunmasından sonra uygulanan aktivite tayini sonucu uygun fraksiyonlar (9ml) CM Sephadex C-25 kolonuna uygulandı. Bu kolona uygulanan sıvının total protein miktarı 0.084 mg/ml olarak saptandı. Bu kolona uygulanan fraksiyonların toplanması sonucu yapılan aktivite tayininde nötral proteaz saptanan eluatların kolondan 100mM NaCl ile gerçekleştirilen elüsyon sonucu Nötral proteazın 5 ile 8. fraksiyonlar arasında toplandığı görüldü.



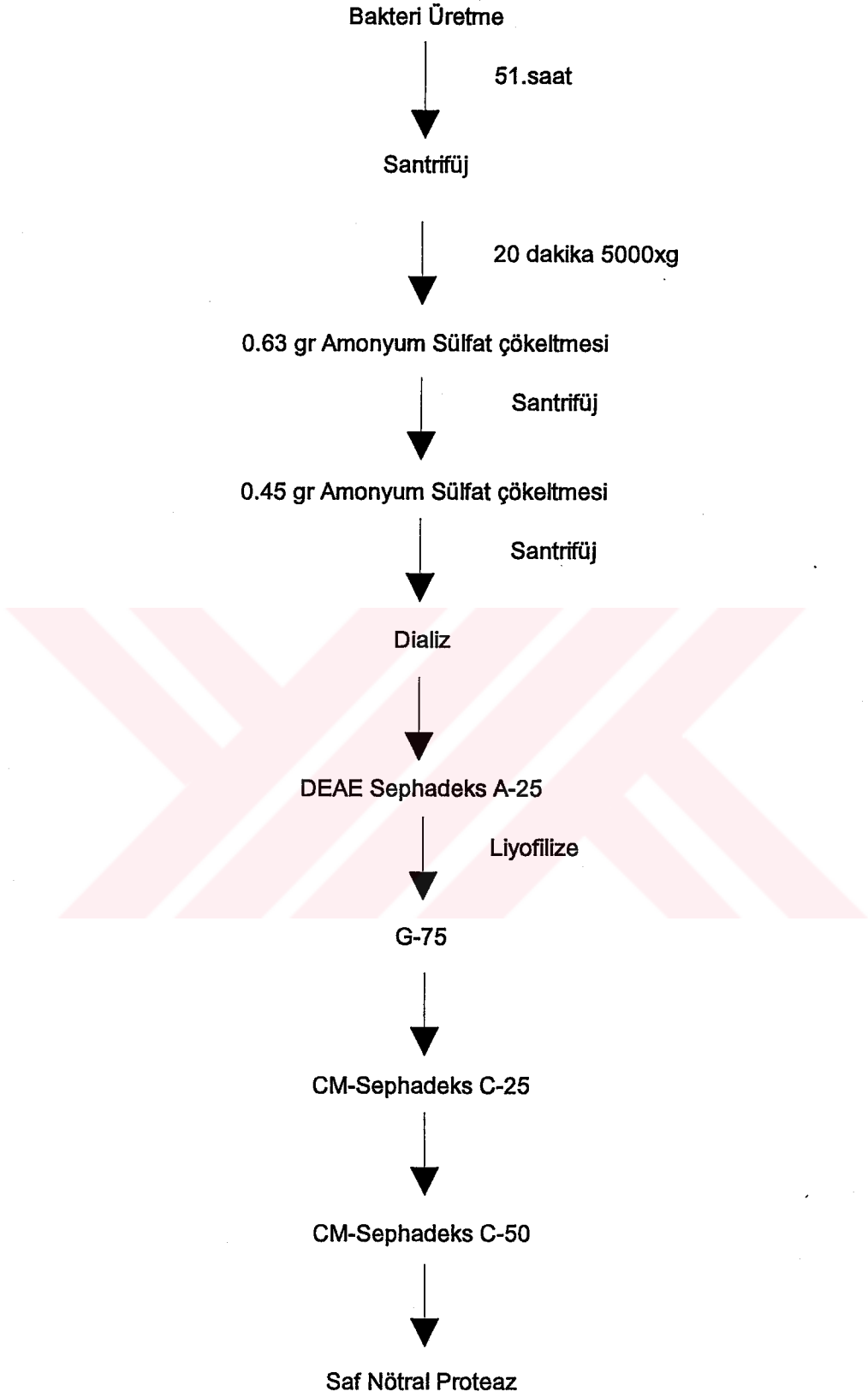
Tablo 4: G-75 kolonundaki protein örneklerinin C-25 kolonuna uygulanmasıyla elde edilen fraksiyonların 275 ve 280'deki Absorbansları

Burada yapılan total protein miktar tayini sonucu 0.051 mg/ml protein saptandı. Bu kolondan elde edilen fraksiyonlar birleştirildikten sonra liyofilize edilerek enzim konsantre hale gelmesi sağlandı. Liyofilize edilen bu enzim çözeltisinin tamamı(2 ml) CM Sephadex C-50 kolonuna uygulandı. Burada 0.1M tuz konsantrasyonunda Nötral proteaz 5 ve 6. fraksiyonlarda saf olarak elde edildi. Saf olarak elde edilen Nötral proteaz yapılan protein miktar tayininde 0.041 mg/ml protein saptandı.



Tablo 5: C-25 kolonundan elde edilen proteinlerin C-50 kolonuna uygulanmasıyla elde edilen fraksiyonların 275 ve 280'deki Absorbansları

Yapılan elektroforetik çalışmalar sonucu Nötral proteazın molekül ağırlığının 29.000 Dalton olduğu saptandı.



Tablo 6: Nötral Proteazın saflaştırılmasında izlenen yöntem

Nötral proteazın protein kesimlerinin çeşitli saflaştırma aşamalarından sonra SDS-poliakrilamit gel elektroforetik analizleri resim 1'de görülmektedir.



Resim 1: Nötral proteaz saflaştırma aşamaları ve bu aşamadan elde edilen elektroforez bant profilleri.

a: Standart proteinler

- | | |
|----------------------|-------------------|
| 1- Sığır Albümini | (66.000 Dalton) |
| 2- Yumurta Albümini | (45.000 Dalton) |
| 3- Karbonik Anhidraz | (29.000 Dalton) |
| 4- Tripsin İnhibitör | (20.100 Dalton) |

b: Besi yeri

c: 51. saat

d: 0.63 Amonyum sülfat

e: Dializlenen 0.45 gr. amonyum sülfat çöktürmesi ve A-25 Kolonu proteinleri

f: G-75 kolonu proteinleri

g: CM sephadex C-25 kolonu proteinleri

h: CM sephadex C-50 kolonundan saflaştırılan nötral proteaz resim (1) de görülmektedir.

	Hacim	280 nm OD/ml	280 nm total OD	Spesifik aktivite birim/mg.protein	Safılaştırma Katsayısı	Verim %
51.saat	1950	0.14	273	$2.75 \cdot 10^{-6}$	1	100
0.63 (NH ₄) ₂ SO ₄	60	2.84	170.4	$2.9 \cdot 10^{-5}$	10.54	66
0.45 (NH ₄) ₂ SO ₄ Dializ	13.5	3.88	52.38	$6.56 \cdot 10^{-4}$	238.5	46
A-25	1	0.33	0.33	$9.7 \cdot 10^{-3}$	3527	42
G-75	2	0.216	0.432	0.066	24000	38
C-25	4	0.09	0.36	0.07	25454	34
C-50	2	0.038	0.076	0.08	29090	8

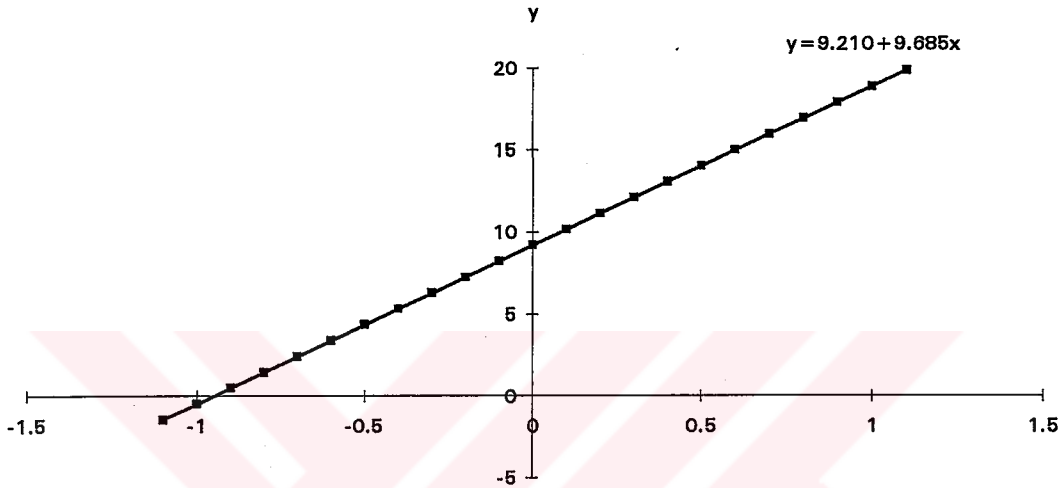
Tablo 7: Nötral proteaz safılaştırılmasından elde edilen sonuçların özeti
(Spesifik aktivite=birim/mg.protein, 1 birim=1 pmol Nötral proteaz)

4.2-AAS'de Çinko Tayini

Nötral proteaz enzimini saf olarak elde ettikten sonra bu çözeltinin 1 ml'si AAS'e çinko tayini için uygulanarak Absorbans 0.018 olarak okundu. Buradan hareketle yapılan hesaplamalar sonucu 0.900126 ppm çinko tespit edildi. Nötral proteazın 1 molekülü 1 atom gram çinko içerdiğine göre tayin için verilen çözeltide $4 \cdot 10^{-4}$ g Nötral proteaz olduğu saptandı.

4.3-Kazein Sindirim Metoduyla Kazein İçin Km Değerinin Saptanması :

Materyal ve metot bölümünde anlatıldığı şekilde yapılan proteaz aktivite tayini ile kazein konsantrasyonuna bağımlılığı şekil (8)'de gösterilmiştir. Elde edilen kazein konantrasyon eğrisinin çift resiprokal ifadesiyle Nötral proteaz varlığında kazein için Km değeri 0.952 mg/ml olarak hesaplandı.

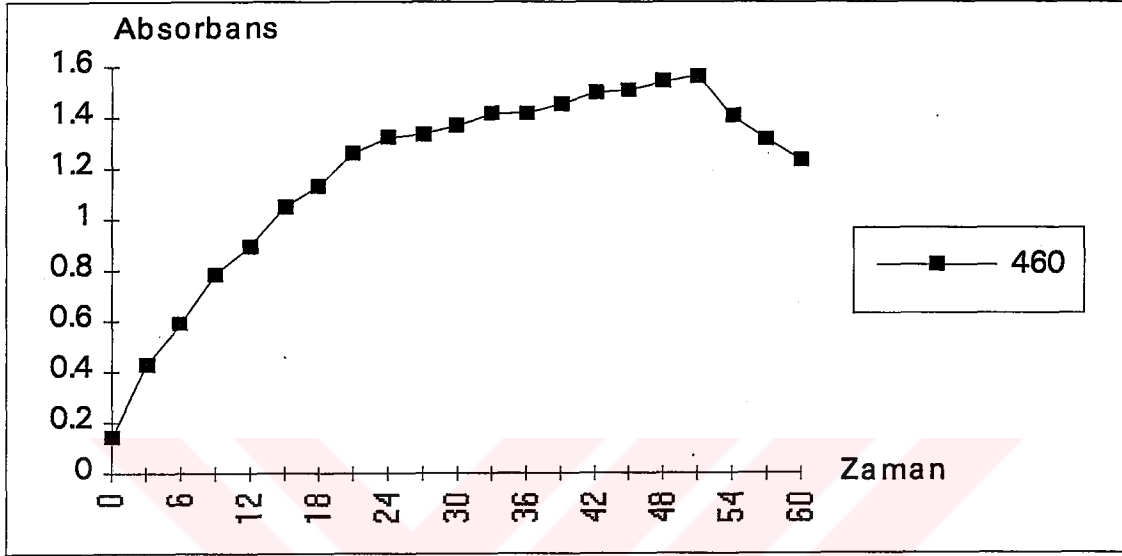


Tablo 8: Safaştırılan Nötral Proteazın Km Değerinin Gösterimi

4.4-N.B. Sıvı Besi Yerinde B.Subtilis'in Üreme Evrelerinin İncelenmesi :

Bakteriler katı besi yerinde üretildikten sonra 100ml'lik N.B sıvı besi yerine aktarılan bir koloni 37°C'ta 60 saat süreyle inkübe edildi. Bu ortamdan alınan 100 µl'lik örnek 100ml'lik yeni bir N.B.sıvı besi yerine aktararak 37°C'ta 60 saat inkübasyona bırakıldı.İnkübasyon süresi sonunda 1ml'lik kültür örneği 1000ml'lik besi yerine aktararak 37°C'ta inkübasyona bırakıldı.Bunu takiben her 3 saatte bir örnek alınarak 460 nm'de Absorbans okuyarak bakterinin üreme evreleri incelendi (Tablo 9). Alınan ölçümlerin pozitif Logaritmasına göre Lag fazın üçüncü saatten sonra bittiği ve başlayan Logaritmik fazın 24. saatten sonra bittiği bunu takiben başlayan Stationer

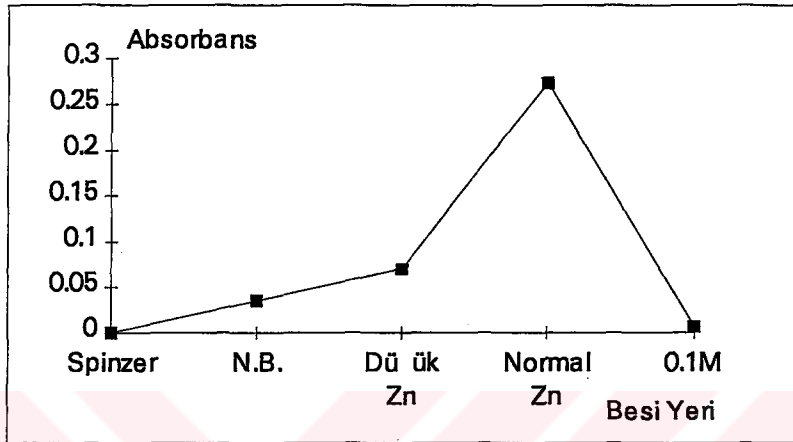
fazın 51. saatte bittiği ve bu saatten sonra ölüm evresinin başladığı Tablo 5'te görülmektedir. Bu örneklerin her birine proteaz aktivite tayini uygulayarak bakterinin hangi üreme evresinde proteaz sekresyonunun maksimumda olduğu saptandı.



Tablo 9: *Bacillus subtilis*'in N.B. sıvı besi yerinde zamana bağlı olarak üreme evreleri.

4.5-Nötral Proteazın Sentez Koşullarının Belirlenmesi :

Nötral proteazın aktivitesinde besi yerinde Zn^{++} iyonlarının belirli konsantrasyonda bulunması gerektiği tespit edildi. 10^{-5} M Zn içeren N.B. besi yerinde üretilen *B. subtilis*'in salgıladığı nötral proteazın aktivitesinin en yüksek olduğu, bu derişimin altında ve üstündeki Zn^{++} değerlerinin enzim aktivitesini olumsuz etkilediği saptandı. Zn^{++} içermeyen N.B.besi yerinde üretilen bakterinin salgıladığı nötral proteazın ise Zn^{++} 'lu ortamda salgılanana içerene oranla daha düşük bir aktivite gösterdiği saptandı. Yaptığımız deneyler sonucunda Zn^{++} içermeyen Spinzer glukoz-mineral besi yerinde yapılan proteaz aktivite tayininde aktivite görülmemesi Nötral proteazın bu besi yerinde Zn^{++} 'ya gereksinim duyduğunu göstermektedir.



Tablo 10: Spinzer, N.B.sıvı besi yeri , 10^{-8} M $ZnCl_2$ içeren N.B., 10^{-5} M $ZnCl_2$ içeren N.B. ve 0.1 M $ZnCl_2$ içeren N.B. sıvı besi yerlerinde yapılan proteaz aktivite tayini karşılaştırmaları.

5.TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Amonyum sülfat ilavesiyle dializ öncesi ve sonrası sıvıda yapılan proteaz aktivite tayininde proteolitik aktivitenin dializ sonrası artması amonyum sülfatın, Nötral proteaz aktivitesini inhibe ettiğini göstermektedir.

DEAE sephadex A-25 kolonunda 100, 200, 300, 400 ve 500 mM NaCl konsantrasyonuyla yıkama sonucu toplam beş pikin olduğu ve bu piklerden Nötral proteaza ait olanın 100 mM' da olduğu saptandı. 100 mM dışında kalan diğer piklerin Nötral proteaz içermediği yapılan aktivite testinden anlaşıldı. Millet (34) yaptığı çalışmada aynı kolonda dört pik elde etmiştir. Bizim çalışmamızda ortaya çıkan beşinci pik kullanılan bakterinin suş farkından kaynaklandığı veya aynı protein ise bu proteinin yapı farklılığından kaynaklandığını düşündürmektedir. A-25 kolonundan yapılan yıkama sonucu Nötral proteazın 100 mM NaCl konsantrasyonunda tamamen inmesi Nötral proteaz için lineer gradienti gerektirmediğini göstermiştir. Daha sonra yapılabilecek çalışmalarda saptanacak iki tuz kesimi konsantrasyonuyla, protein birinci kesim ile bazı proteinlerden kurtularak, ikinci kesim ile daha saf indirilebileceği, belki de saflaştırma aşamalarından bir tanesine ihtiyaç duyulamayabilecektir. Böylece ideal enzim saflaştırma şekli olan en kısa sürede saflaştırma için bir adım atılarak enzimin daha aktif elde edilmesi sağlanacaktır.

CM sephadex C-25 ve CM sephadex C-50 kolonlarında da Nötral proteazın 100 mM'da tamamen indiği görülmüştür.

Yapılan çinko tespiti sonucu Nötral proteaz miktarı saptanmıştır. Bu sonuç Nötral proteazın her aşamada ne kadar saflaştırıldığını saptayabilmek için ideal bir yöntem olarak düşünülebilir. Bu saptamayla Nötral proteaz tüm

miktârı saptanabilmektedir. Diğer saptama yöntemiyle sadece aktif nötral proteaz saptanabilmekte bu yöntemle ise aktif ve inaktif nötral proteaz saptanabilmektedir. Bu elde edilen nötral proteaz aktivitesinin ne şekilde kaybolduğu ve yeniden nasıl geriye dönüştürülebileceği konusunda yapılacak çalışmalar açısından önemlidir. N.B. sıvı besi yerinde çinkolu ortamda, aynı besi yerinin çinkosuz ortamında ve spinzer besi yerinde yapılan Nötral proteaz aktivite tayininde, spinzer besi yerinde aktiviteye rastlanmaması, N.B. çinkosuz ortamında aktivitenin düşük olması, buna karşılık N.B. çinko içeren ortamda yeterli aktivitenin tespiti karşılaştırıldığında; Nötral proteazın çinkoya ihtiyaç duyduğu, çinkosuz N.B. sıvı besi yerinde aktivitenin olması, besi yerinin eser miktarda çinko içerdiğini düşündürmektedir. Bunlar Millet'in yaptığı çalışmalarda besi ve test ortamında çinko bulunmaması daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda (51) aktivite tayin ortamına çinko eklenmesi ve çinkonun Nötral proteaza kovalent bağla bağlı olmuş olması (29) oldukça düşündürücüdür ve yeni çalışmalar yapılması gerektiğini düşündürmektedir. Bu çinkonun sentez esnasında veya sentez öncesi proteine bağlanması, çinko varlığının veya yokluğunun proteinin yapılabilmesi için gerek gerekmediğinin aydınlatılması, bunun içinde besi yerlerinde kullanılan tüm maddelerin AAS yolu ile tespit edilip daha sonra kurulacak test sistemi ile tespit edilmesi gerektiğini düşündürmektedir.

460 nm'de alınan ölçümlerin pozitif logaritmasına göre bakteride Logaritmik fazın 21. saatten sonra bittiğini, 21. saatten sonra başlayan Stationer fazın ise 51. saate kadar devam ettiği ve bu saatten sonra ölüm evresinin başladığı görülmektedir. Stationer faz ile başlayan proteolitik aktivitenin maksimuma ulaşması Schaeffer (31) ve Gerald (32) çalışmasını desteklemektedir.

McConn 1964 yılında yaptığı çalışmada Nötral proteazın molekül ağırlığının 30.000-40.000 Dalton arasında olduğunu bildirmiştir (29). Araştırmamızda enzimin molekül ağırlığı 29.000 Dalton olarak bulundu.



KAYNAKLAR

1. Pelczar, M.S.and R.D.Reid, 1958. Microbiology, Mc Graw-Hill Books Company Inc.N.Y.
2. J.G.Zeikus, Enzyme Microb.Technol., 1; 249-252 (1979).
3. Akman,M: Bakteri Genetiği,Teorik-Pratik. 2.Baskı.Cumhuriyet Üniv.Tıp Fakültesi Yayını No: 8; 79-83 (1983).
4. Farrell,J., and Campell,L.L.Advan. Microbial. Physiol. 3: 83-109 (1969).
5. T.D.Brock, "Thermophiles, General, Molecular and Applied Microbiology " New York (1985).
6. Sinesky. Proc. Nat. Acad. Sci., 71-522 (1974).
7. J.P.Jerome, Advances in Aquatic Microbi. 3;109-139 (1985).
8. O.P.Ward and M.Moo-Young,Biotech,Adv.,6. 39-69 (1988).
9. J.G.Zeikus and R.S.Wolfe, Journal of Bacteriology., 109(2): 707-713 (1972)
- 10.Querol,E.and Parrilla,A, Enz.Microb.Technol., 9: 238-244 (1987).
- 11.Argos, P., Rossmann, M.G., Graw, U.M., Zuber, H., Frank, G.and Tratschin, J.D., Jour. of Biochem. 18: 5698-6703 (1979).
- 12.Perutz.M.R.and Raidt,H. Nature 255-256 (1975).
- 13.Ribbons,D.W.,E.A.Dawes,and D.A.Rees. Biochem.J.45-82(1962)
- 14.Tannenberger, S., U. U. Behrens: Z. Allgen. Microbiol., 3-289(1963).
- 15.Rehm. H. J :Industrielle Micro. 115 (1967).
- 16.Neish, A.C.a.o.:Canad.J.Res.23B,290 (1945).
- 17.Saito,N.,I.Koshiyama ,and S.Sugiyama:Jap.Pat.9:439 (1964).
- 18.Smyh,E.L.:Nature (London) 162; 144 (1948).
- 19.Imanaca,H.:Agric.Biol.Chem.26:49(1962).
- 20.Hayashi,U.:J. Ferm. Tech. 37: 233, 272., 327, 360 (1959) ; 38: 210, 255 (1960).
- 21.Kinoshita,S,:Appl.Microbiol.1,201(1959).
- 22.Ward,R.M.,R.F.Anderson, and F.K.Dean: Biotechnol.Bioeng. 5, 41(1963).

23. Majumdar, S.K., and S.K. Bose Nature 181: 134 (1958).
24. Lockhart, I.M., E.P. Abraham, and G.G.F. Newton: Biochem. J. 61:534 (1955).
25. Jansen, E.F., and D.J. Hirrschmann: Arch. Biochem. 4:297 (1944).
26. J.E. Anderson, D.M. Adams AND W.M. Walter Jr: J. Food. Sci. 48: 1622-1626 (1983).
27. N.G. Thomas and W.R. Kenerly: Industrial applications of thermostable enzymes. In Brocks Thermophiles New York 1986.
28. A.R. Deschreider: Fette Seifen Anstrichm 74(1):33-35 (1972).
29. McConn, J.W., Tsuru. D and Yasunobu, K.T (1964) J. Biol. Chem. 239: 3706-3715.
30. Guntelberg, a.v. and Ottesen, M. (1954) C.r. Trav. Lab., Carlsberg 29:36
31. Schaeffer, P.; (1969) Bact. Rev. 33:48.
32. Gerld. A., Rufo. JR. Barbara. J., Sullivan, Alan, Sloma and Janice Pero. J. of. Bacteriology Feb:1019-1023 (1990).
33. Leighton. T. J., P. K. Freese, R. H. Doi. R. A. J. Warren and R. A. Kelln. American Society for Microbiology. Washington D.C. 238-248 (1972).
34. Millet. J. (1970) J. Appl. Bact. 33:207-219.
35. Tsuru. D., H. Kira, T. Yamamoto, and J. Fukumoto. Agric. Biol. Chem: 30:856-862. (1966).
36. Tsuru. D. H. Kira, T. Yamamoto, and j. Fukomoto. Agric. Biol. Chem: 31:718-723 (1967).
37. Vehara, H., K. Yamane, and B. Marvo. J. Bacteriol. 139:583-590 (1979)
38. Sloma, A., A. Ally, D. Ally, and J. Pero. J. Bactteriol. 170: 5557-5563 (1988).
39. Sloma, A., G. A. Rufo. Jr., C. f. Rudolph. B. J. Sullivan, K. A. Theriaut, and J. Pero. J. Bacteriol. 172:1470-1477 (1990).
40. Wu, X. C., S. Nathoo, A. S.-H. Pang. T. Carne and S-L. Wong. J. Biol. Chem. 265:6845-6850 (1990).
41. Endo. S. J. Ferment. Technol. 40:346-353. (1962)

42. Thomas.B.Higerd,and John Spizizen. Jour.of.Bacteriology. 114:1184-1192 (1973).
43. Yang,M.Y.,E.Ferrari,and D.J.Henner.J.Bac.160:15-21(1984).
44. Stahl,M.L., andE.Ferrari.J.Bacteriol. 158:411-418 (1984).
45. Kawamura,F.,and R.h.DoI. J.Bacteriol. 16:442-444 (1984).
46. P.Sidney,O.N. Kaplan: Methods in Enzymology Experimental Methods for B.subtilis. Volume XVII Part A 1970.
47. Weber,O., and Osborn,M.:J.Biol.Chem.244:4406-4412(1969).
48. Lowry, O.H., N.J.Rosebrough, A.L.Farr, and R.J.Randall. J.Biol.Chem. 193:265-275.(1951).
49. Warburg,O., and Christian,W.:Biochem.Z. 310:384-421(1942).
50. Kunitz,M.:J.Gen.Physiol.30:291-320 (1947).
51. Louise TRAN, XU-CHU WU, AND SHU-LAM WONG: American Society for Microbiyology. Vol. 173, No.20 (1991).

7.ÖZGEÇMİŞ

FİKRET UYAR

- 1964 Diyarbakır'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini aynı kentte tamamladı.
- 1988 Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü bitirdi.
- 1991 Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak görev aldı.
- 1993 Halen aynı bölümde Araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.