

**T.C.**  
**GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BACILLUS SP. P22 SOYU ALKALEN PROTEAZININ ÜRETİM**  
**KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU, ENZİMİN**  
**SAFLAŞTIRILMASI VE NİTELENDİRİLMESİ**

**LEVENT TEMEL**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GEBZE**  
**2015**

**T.C.  
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Bacillus* sp. P22 SOYU ALKALEN  
PROTEAZININ ÜRETİM KOŞULLARININ  
OPTİMİZASYONU, ENZİMİN  
SAFLAŞTIRILMASI VE  
NİTELENDİRİLMESİ**

**LEVENT TEMEL  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANI  
YRD. DOÇ. DR. SALİHA İŞSEVER ÖZTÜRK**

**GEBZE  
2015**

**T.R.**  
**GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY**  
**GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

**OPTIMIZATION OF THE CONDITIONS  
FOR THE PRODUCTION OF ALKALINE  
PROTEASE BY *Bacillus* sp. P22 AND  
PURIFICATION AND  
CHARACTERIZATION OF THE ENZYME**

**LEVENT TEMEL**  
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE**  
**DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS**

**THESIS SUPERVISOR**  
**ASSIST. PROF. DR. SALİHA İŞSEVER ÖZTÜRK**

**GEBZE**  
**2015**

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 29/06/2015 tarih ve 2015/41 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 14/07/2015 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Levent TEMEL'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

**JÜRİ**

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Yrd. Doç. Dr. Saliha İŞSEVER ÖZTÜRK

ÜYE

: Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

ÜYE

: Prof. Dr. Melek ÖZKAN

**ONAY**

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

## ÖZET

Alkalen proteazlar proteinleri oluşturan amino asitler arasındaki peptid bağlarının hidrolizini alkali koşullarda katalizleyen önemli endüstriyel enzimlerdir. Dünya enzim pazarında yaklaşık % 60 pay sahibi olan alkalen proteazlar başta deterjan, süt ürünleri, gıda ve deri endüstrilerinde olmak üzere pek çok endüstriyel süreçte kullanılmaktadır. Bu çalışmada, yerel bir izolat olan *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının üretim koşullarının optimize edilmesi, enzimin saflaştırılması ve nitelendirilmesi amaçlandı. Bu amaçla, çeşitli karbon ve azot kaynakları ile metal tuzları gibi besi yeri bileşenleri ve sıcaklık, pH, aşılama miktarı, çalkalama hızı, havalandırma oranı gibi inkübasyon koşulları test edilerek, enzim üretiminin en iyi olduğu fermentasyon şartları belirlendi. Enzim amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değiştirici kromatografi ve moleküler elek kromatografisi yöntemleri ile üç basamakta % 21 verimle 13 kez saflaştırıldı. Kısmen saflaştırılan enzim ile gerçekleştirilen nitelendirme çalışmaları sonucunda; *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının optimal çalışma sıcaklığının 40 °C ve optimal çalışma pH değerinin 10.5 olduğu belirlendi. Enzimin 15-50 °C ve pH 8-11 aralıklarında kararlı olduğu, 10 mM CaCl<sub>2</sub>'ün 50 ve 60 °C'ta enzimin sıcaklık kararlılığını önemli ölçüde artırdığı görüldü. 10 mM EDTA ve PMSF varlığında proteolitik aktivitenin inhibe olduğu, enzimin SDS, Triton X-100, Tween 80, Tween 20 gibi deterjanlar ve aseton, etanol, metanol, izopropanol ve etilen glikol gibi organik çözücüler varlığında aktivitesini önemli ölçüde koruduğu gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Alkalen Proteaz, Endüstriyel Enzim, Saflaştırma, Biyokimyasal Nitelendirme, *Bacillus*.

## SUMMARY

Because of their capability of cleaving peptide bonds between amino acids at alkaline conditions, alkaline proteases have broad applications in detergent, food, dairy and leather industries where stability and activity are required in tough conditions. Constituting 60 % of the global enzyme market alkaline proteases are significant industrial enzymes. In this study, production of alkaline protease of the local isolate *Bacillus* sp. P22 was optimized, the enzyme was purified and its characteristics were determined. The optimum media composition that is promoting enzyme production was defined by testing different carbon and nitrogen sources and metal salts as well as varied incubation temperature, pH, inoculum rate, agitation speed and aeration ratio. The enzyme was purified for 13 times with 21 % yield in three steps employing ammonium sulphate precipitation, ion exchange and gel filtration chromatographies. In following characterization studies the optimal reaction temperature and pH of *Bacillus* sp. P22 alkaline protease were found to be 40 °C and 10.5 respectively. The enzyme was found to be stable in 15-50 °C and pH 8-11 ranges whereas its temperature stability was increased in the presence 10 mM CaCl<sub>2</sub> at 50 and 60 °C. Enzymatic activity was inhibited in the presence of 10 mM EDTA and PMSF. Proteolytic activity of *Bacillus* sp. P22 alkaline protease retained to a great extent in the presence of detergents SDS, Triton X-100, Tween 80, Tween 20 and organic solvents acetone, ethanol, methanol, isopropanol and ethylene glycol, thus proving the potential of *Bacillus* sp. P22 alkaline protease as a detergent additive.

**Keywords: Alkaline Protease, Industrial Enzymes, Purification, Biochemical Characterization, *Bacillus*.**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sűresince, konu seçimi, deney ve yazım aşamalarında çok değerli katkı ve yardımları ile sabrını benden esirgemeyen, danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Saliha İşsever Öztürk'e en içten teőekkűrlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. PROTEAZLAR	3
2.1. Proteaz Terimi	3
2.2. Proteazların Katalitik Mekanizmaları	4
2.3. Aktif Merkez	5
2.4. Proteazların Sınıflandırılması	6
2.4.1. Katalizin Kimyasal Mekanizmasına Göre Proteazlar	6
2.4.2. Polipeptit Zincirini Kırdıkları Noktaya Göre Proteazlar	7
2.4.3. Optimal Çalışma pH'sına Göre Proteazlar	9
2.5. Proteaz Kaynakları	9
2.5.1. Bitkisel Proteazlar	9
2.5.2. Hayvansal Proteazlar	10
2.5.3. Mikrobiyal Proteazlar	11
2.5.3.1. Bakteriyel Proteazlar	11
2.5.3.2. Fungal Proteazlar	12
2.5.3.3. Viral Proteazlar	12
2.6. Mikrobiyal Alkalen Proteazların Özellikleri	13
2.6.1. Optimum pH ve Sıcaklık	13
2.6.2. Moleküler Ağırlık	13
2.6.3. Metal İyonu Gereksinimi ve İnhibitörler	14
2.6.4. Substrat Özgüllüğü	14



2.7. Proteazların Endüstriyel Kullanımları	15
2.7.1. Deterjan Endüstrisi	15
2.7.2. Süt Ürünleri Endüstrisi	16
2.7.3. Unlu Mamüllerin Üretimi	18
2.7.4. Deri Endüstrisi	19
2.7.5. Hayvan Yemi Üretimi	20
2.7.6. Diğer Kullanım Alanları	20
3. MİKROBİYAL ÜRETİM YÖNTEMLERİ	21
3.1. Mikrobiyal Beslenme	21
3.1.1. Makronütrientler	22
3.1.2. Minör Elementler	22
3.1.3. İz Elementler	23
3.2. Mikrobiyal Büyüme	24
3.2.1. Çevresel Şartların Hücre Büyümesine Etkileri	25
3.3. Fermentasyon Ortamı	27
3.4. Fermentasyon Koşullarının Optimizasyonu	28
3.4.1. Açık ve Kapalı Uçlu Optimizasyon Sistemleri	29
3.4.2. Fermentasyon Ortamı ve Koşullarının Optimizasyonunda Kullanılan Yöntemler	29
4. PROTEİN SAFLAŞTIRMA YÖNTEMLERİ	32
4.1. Çöktürme	32
4.2. Diyaliz	33
4.3. Kromatografik Yöntemler	33
5. GEREÇ ve YÖNTEM	35
5.1. Gereç	35
5.1.1. Kullanılan Kimyasallar	35
5.1.2. Kullanılan Cihazlar	37
5.2. Yöntem	39
5.2.1. Biyolojik Materyal	39
5.2.2. Enzim Üretim Koşullarının Optimizasyonu	40
5.2.2.1. <i>Bacillus</i> sp. P22 Hücrelerinin Büyütülmesi ve Enzim Üretimi için Uygun Besi Yerinin Seçilmesi	40
5.2.2.2. İnkübasyon Koşulları ve Besi Yeri İçeriğinin	42

Otimizasyonu Çalışmaları	
5.2.3. <i>Bacillus</i> sp. P22'nin Zamana Bağlı Hücre Büyümesi ve Alkalen proteaz aktivitesinin belirlenmesi	55
5.2.4. <i>Bacillus</i> sp. P22 Alkalen Proteazının Büyük Ölçekte Üretimi ve Saflaştırılması	55
5.2.4.1. <i>Bacillus</i> sp. P22 Hücre Kültürünün Hazırlanması ve Kültür Üst Sıvısının Toplanması	55
5.2.4.2. <i>Bacillus</i> sp. P22 Alkalen Proteazının Saflaştırılması	55
5.2.4.3. Alkalen Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi	59
5.2.4.4. Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi	61
5.2.4.5. Sodyum Dodesil Sülfat Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)	62
5.2.4.6. Alkalen Proteaz Zimogram Analizi	64
5.2.5. <i>Bacillus</i> sp. P22 Alkalen Proteazının Nitelendirilmesi	65
5.2.5.1. Optimal Reaksiyon Sıcaklığı ve Sıcaklık Kararlılığının Belirlenmesi	65
5.2.5.2. Optimal Reaksiyon pH'sı ve pH Kararlılığının Belirlenmesi	66
5.2.5.3. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkilerinin Belirlenmesi	67
5.2.5.4. Deterjanların Enzim Aktivitesine Etkilerinin Belirlenmesi	68
5.2.5.5. Organik Çözücülerin Enzim Aktivitesine Etkilerinin Belirlenmesi	68
5.2.5.6. Çeşitli Kimyasalların Enzim Aktivitesine Etkilerinin Belirlenmesi	68
5.2.5.7. Çeşitli Stabilizörlerin Enzimin Sıcaklık Kararlılığına Etkilerinin Belirlenmesi	69
6. BULGULAR	70
6.1. <i>Bacillus</i> sp. P22 Alkalen Proteazının Üretilmesi için Uygun Besi Yerin Seçilmesi	70
6.2. İnkübasyon Koşulları ve Besi Yeri Bileşenlerinin Otimizasyonu Çalışmaları	76
6.2.1. İnkübasyon Sıcaklığının Alkalen Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi	80

6.2.2. Besi Yeri pH'sının Alkalen Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi	83
6.2.3. Havalandırma Oranı ve Çalkalama Hızının Alkalen Proteaz Üretimi Üzerine Etkileri	86
6.2.4. Aşılama Oranının Alkalen Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi	92
6.2.5. Çeşitli Karbon Kaynaklarının Alkalen Proteaz Üretimi Üzerine Etkileri	95
6.2.6. Çeşitli Organik Azot Kaynaklarının Alkalen Proteaz Üretimi Üzerine Etkileri	99
6.2.7. Çeşitli İnorganik Azot Kaynaklarının Alkalen Proteaz Üretimi Üzerine Etkileri	103
6.2.8. Çeşitli Metal Tuzlarının Alkalen Proteaz Üretimi Üzerine Etkileri	107
6.2.9. <i>Bacillus</i> sp. P22 Alkalen Proteaz Üretim Besi Yeri Bileşen Kompozisyonunun Belirlenmesi	111
6.2.10. <i>Bacillus</i> sp. P22 Alkalen Proteaz Üretim Besi Yeri Bileşen Derişimlerinin Belirlenmesi	115
6.3. <i>Bacillus</i> sp. P22'nin Zamana Bağlı Hücre Büyümesi ve Alkalen Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi	120
6.4. <i>Bacillus</i> sp. P22 Alkalen Proteazının Büyük Ölçekte Üretimi ve Saflaştırılması	121
6.4.1. <i>Bacillus</i> sp. P22 Hücre Kültürünün Hazırlanması ve Kültür Üst Sıvısının Toplanması	121
6.4.2. <i>Bacillus</i> sp. P22 Alkalen Proteazının Saflaştırılması	121
6.5. <i>Bacillus</i> sp. P22 Alkalen Proteazının Nitelendirilmesi	129
6.5.1. Optimal Reaksiyon Sıcaklığı ve Sıcaklık Kararlılığının Belirlenmesi	129
6.5.2. Optimal Reaksiyon pH'sı ve pH Kararlılığının Belirlenmesi	131
6.5.3. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkileri	134
6.5.4. Deterjanların Enzim Aktivitesine Etkileri	136
6.5.5. Organik Çözücülerin Enzim Aktivitesine Etkileri	137
6.5.6. Çeşitli Kimyasal Maddelerin Enzim Aktivitesine Etkileri	139
6.5.7. Stabilizörlerin Enzimin Sıcaklık Kararlılığına Etkileri	140
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	145

KAYNAKLAR

163

ÖZGEÇMİŞ

172

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b><u>Simgeler ve</u></b>	<b><u>Açıklamalar</u></b>
<b><u>Kısaltmalar</u></b>	
$\alpha$	: Alfa
$\beta$	: Beta
$\beta$ -ME	: $\beta$ -merkaptoetanol
$^{\circ}\text{C}$	: Derece santigrat
$\mu\text{l}$	: Mikrolitre
$\mu\text{m}$	: Mikrometre
$\mu\text{M}$	: Mikromolar
g	: Gram
kDa	: (Kilo) dalton
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
U	: Ünite
V	: Volt
APS	: Amonyum persülfat
$\text{BaCl}_2$	: Baryum klorür
BSA	: Sığır serum albümin
$\text{CaCl}_2$	: Kalsiyum klorür
$\text{CoCl}_2$	: Kobalt klorür
$\text{CuCl}_2$	: Bakır klorür
CTAB	: Setiltrimetilamonyum bromür
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DTT	: Ditiyotreitol
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
$\text{FeCl}_2$	: Demir (II) klorür
$\text{FeCl}_3$	: Demir (III) klorür
$\text{FeSO}_4$	: Demir Sülfat
HCl	: Hidroklorik asit

KCl	: Potasyum klorür
LiCl	: Lityum klorür
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum klorür
MnCl <sub>2</sub>	: Mangan klorür
NaCl	: Sodyum klorür
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	: Sodyum dihidrojen fosfat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	: Di sodyum hidrojen fosfat
NH <sub>4</sub> Ac	: Amonyum asetat
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	: Amonyum sülfat
NiCl <sub>2</sub>	: Nikel klorür
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florür
rpm	: Dakika başına rotasyon
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
ZnCl <sub>2</sub>	: Çinko klorür
ZnSO <sub>4</sub>	: Çinko sülfat

# ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>Sekil No:</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1: Subtilisinlerin katalitik mekanizması.	4
2.2: Proteazların polipeptit zincirini kestikleri yere göre sınıflandırılması.	8
3.1: Mikrobiyal büyüme fazları.	24
5.1: Tirozin standart eğrisi.	61
6.1: Farklı besi yerlerinde (Besi yeri 1-12) kültüre alınan <i>Bacillus</i> sp. P22 soyunun 72 saatlik hücre büyümesi grafiği.	74
6.2: Farklı besi yerlerinde (Besi yeri 1-12) kültüre alınan <i>Bacillus</i> sp. P22 soyunun 72 saatlik enzimatik aktivite grafiği.	75
6.3: Farklı şekillerde hazırlanan ön kültürlerle aşıl原因anan <i>Bacillus</i> sp. P22 kültürlerinin 48 saatlik hücre büyümesi grafiği.	78
6.4: Farklı şekillerde hazırlanan ön kültürlerle aşıl原因anan <i>Bacillus</i> sp. P22 kültürlerinin 48 saatlik enzimatik aktivite grafiği.	79
6.5: Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen <i>Bacillus</i> sp. P22 kültürlerinin 48. saatlik hücre büyümesi grafiği.	81
6.6: Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen <i>Bacillus</i> sp. P22 kültürlerinin 48. saatlik alkalin proteaz aktivitesi grafiği.	82
6.7: <i>Bacillus</i> sp. P22 soyunun başlangıç pH değeri 7 ve 10 olan % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yerindeki 79 saatlik hücre büyümesi grafiği.	84
6.8: <i>Bacillus</i> sp. P22 soyunun başlangıç pH değeri 7 ve 10 olan % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yerindeki 79 saatlik enzimatik aktivite grafiği.	85
6.9: Farklı havalandırma oranına sahip kültürlerde büyütülen <i>Bacillus</i> sp. P22 soyunun 48 saatlik hücre büyümesi grafiği.	87
6.10: Farklı havalandırma oranına sahip kültürlerde büyütülen <i>Bacillus</i> sp. P22 soyunun 48 saatlik enzim aktivitesi grafiği.	88
6.11: Farklı çalkalama hızlarında büyütülen <i>Bacillus</i> sp. P22 kültürlerinde 48 saatlik hücre büyümesi grafiği.	90
6.12: Farklı çalkalama hızlarında büyütülen <i>Bacillus</i> sp. P22 kültürlerinde 48 saatlik enzim aktivitesi grafiği.	91

6.13:	Farklı aşılama oranlarının kullanıldığı <i>Bacillus</i> sp. P22 kültürlerinde 48 saatlik hücre büyümesi grafiği.	93
6.14:	Farklı aşılama oranlarının kullanıldığı <i>Bacillus</i> sp. P22 kültürlerinde 48 saatlik enzim aktivitesi grafiği.	94
6.15:	Farklı karbon kaynaklarının <i>Bacillus</i> sp. P22 soyunun büyümesi üzerine etkisi.	97
6.16:	Farklı karbon kaynaklarının <i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazı üretimi üzerine etkisi.	98
6.17:	Farklı organik azot kaynaklarının <i>Bacillus</i> sp. P22 soyunun büyümesi üzerine etkisi.	101
6.18:	Farklı organik azot kaynaklarının <i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazı üretimi üzerine etkisi.	102
6.19:	Farklı inorganik azot kaynaklarının <i>Bacillus</i> sp. P22 soyunun büyümesi üzerine etkisi.	105
6.20:	Farklı inorganik azot kaynaklarının <i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazı üretimi üzerine etkisi.	106
6.21:	Farklı metal tuzlarının <i>Bacillus</i> sp. P22 soyunun büyümesi üzerine etkisi.	109
6.22:	Farklı metal tuzlarının <i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazı üretimi üzerine etkisi.	110
6.23:	<i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteaz üretim besi yeri bileşen kompozisyonunun belirlendiği çalışmada gözlenen 72 saatlik hücre büyümesi grafiği.	113
6.24:	<i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteaz üretim besi yeri bileşen kompozisyonunun belirlendiği çalışmada gözlenen 72 saatlik alkalen proteaz aktivitesi grafiği.	114
6.25:	<i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteaz üretim besi yeri bileşen derişimlerinin belirlendiği çalışmada gözlenen 72 saatlik hücre büyümesi grafiği.	118
6.26:	<i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteaz üretim besi yeri bileşen derişimlerinin belirlendiği çalışmada gözlenen 72 saatlik alkalen proteaz aktivitesi grafiği.	119
6.27:	<i>Bacillus</i> sp. P22 soyunun % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yerinde	121



	zamana bağlı hücre büyümesi ve alkalen proteaz aktivitesi grafiği.	
6.28:	<i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının % 80 amonyum sülfat ile çöktürülmesinden sonra farklı tamponlara karşı geceboyu gerçekleştirilen diyalizi sonrasında kalan alkalen proteaz aktiviteleri.	123
6.29:	DEAE Sefaroz iyon değiştirici kromatografi ile elde edilen fraksiyonların A <sub>280</sub> ve alkalen proteaz aktivitesi grafiği.	124
6.30:	DEAE Sefaroz iyon değiştirici kromatografi ile elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE profilleri.	125
6.31:	Sefakril S-100 jel filtrasyon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların A <sub>280</sub> ve alkalen proteaz aktivitesi grafiği.	126
6.32:	Sefakril S-100 jel filtrasyon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE profilleri.	127
6.33:	İyon değiştirici ve moleküler elek kromatografileri öncesi protein örnekleri ile sonrasında oluşturulan havuzların SDS-PAGE profilleri.	128
6.34:	<i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının moleküler elek kromatografisi ile saflaştırılması sonrasında oluşturulan protein havuzunun SDS-PAGE profili ve zimogram analizi.	129
6.35:	<i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının optimal reaksiyon sıcaklığı grafiği.	130
6.36:	<i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının sıcaklık kararlılığı grafiği.	130
6.37:	<i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının 30 °C'taki inaktivasyon eğrisi.	131
6.38:	<i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının optimal reaksiyon pH grafiği.	132
6.39:	<i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının +4 °C'ta 18 saatlik pH kararlılığı grafiği.	133
6.40:	<i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının +4 °C'ta bir haftalık pH kararlılığı grafiği.	134
6.41:	Çeşitli metal tuzlarının <i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının aktivitesi üzerine etkileri.	135
6.42:	Çeşitli deterjanların <i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının aktivitesi üzerine etkileri.	136
6.43:	Çeşitli Organik çözücülerin <i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının aktivitesi üzerine etkileri.	138

6.44:	Çeşitli kimyasal maddelerin <i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının aktivitesi üzerine etkileri.	139
6.45:	Çeşitli stabilizatörlerin 50 °C'ta 15 dakika inkübasyon sonunda <i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının aktivitesi üzerine etkileri.	141
6.46:	Çeşitli stabilizatörlerin 60 °C'ta 15 dakika inkübasyon sonunda <i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının aktivitesi üzerine etkileri.	142
6.47:	<i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının 10 mM CaCl <sub>2</sub> varlığında zamana bağlı sıcaklık kararlılığı grafiği.	143

# TABLÖLAR DİZİNİ

<b><u>Tablo No:</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1: Süt ürünleri endüstrisinde kullanılan koagulanlar.	17
3.1: Mikroorganizmaların besinsel ihtiyaçlarına göre sınıflandırılması.	21
3.2: Tipik bir mikroorganizmanın bileşenleri.	22
5.1: Kullanılan kimyasallar	35
5.2: Kullanılan cihazlar	37
5.3: <i>Bacillus</i> sp. P22 alkale proteaz üretim besi yeri bileşen derişimlerinin optimize edildiği çalışmada kullanılan besi yeri içerikleri.	54
6.1: <i>Bacillus</i> sp. P22 alkale proteazının üretilmesi için kullanılan farklı besi yerlerinde 24. saat sonunda elde edilen hücre büyümesi ve aktivite değerleri.	73
6.2: Farklı şekillerde hazırlanan ön kültürlerle aşılana <i>Bacillus</i> sp. P22 kültürlerinde 24. saat sonunda elde edilen hücre büyümesi, aktivite ve göreceli aktivite değerleri.	77
6.3: Farklı havalandırma oranlarının kullanıldığı <i>Bacillus</i> sp. P22 kültürlerinde 24. saat sonunda elde edilen hücre büyümesi, aktivite ve göreceli aktivite değerleri.	86
6.4: Farklı çalkalama hızlarında büyütölen <i>Bacillus</i> sp. P22 kültürlerinde 24. saat sonunda elde edilen hücre büyümesi, aktivite ve göreceli aktivite değerleri.	89
6.5: Farklı aşılama oranlarının kullanıldığı <i>Bacillus</i> sp. P22 kültürlerinde 24. saat sonunda elde edilen hücre büyümesi, aktivite ve göreceli aktivite değerleri.	92
6.6: Farklı karbon kaynaklarının <i>Bacillus</i> sp. P22 alkale proteazı üretimi üzerine etkisinin irdelendiği çalışmada 24. saat sonunda elde edilen hücre büyümesi, aktivite ve göreceli aktivite değerleri.	96
6.7: Farklı organik azot kaynaklarının <i>Bacillus</i> sp. P22 alkale proteazı üretimi üzerine etkisinin irdelendiği çalışmada 24. saat sonunda elde edilen hücre büyümesi, aktivite ve göreceli aktivite değerleri.	100
6.8: Farklı inorganik azot kaynaklarının <i>Bacillus</i> sp. P22 alkale proteazı	104

	üretimi üzerine etkisinin irdelendiği çalışmada 24. saat sonunda elde edilen hücre büyümesi, aktivite ve göreceli aktivite değerleri.	
6.9:	Farklı inorganik azot kaynaklarının <i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazı üretimi üzerine etkisinin irdelendiği çalışmada 24. saat sonunda elde edilen hücre büyümesi, aktivite ve göreceli aktivite değerleri.	108
6.10:	<i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteaz üretim besi yeri bileşen kompozisyonunun belirlendiği çalışmada inkübasyonun 24. saati sonunda elde edilen hücre büyümesi, aktivite ve göreceli aktivite değerleri.	112
6.11:	<i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteaz üretim besi yeri bileşen derişimlerinin belirlendiği çalışmada inkübasyonun 24. saati sonunda elde edilen hücre büyümesi, aktivite ve göreceli aktivite değerleri.	117
6.12:	<i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının saflaştırma tablosu.	127
6.13:	Çeşitli metal tuzlarının <i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının aktivitesi üzerine etkileri.	135
6.14:	Çeşitli deterjanların <i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının aktivitesi üzerine etkileri.	137
6.15:	Çeşitli organik çözücülerin <i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının aktivitesi üzerine etkileri.	138
6.16:	Çeşitli kimyasal maddelerin <i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının aktivitesi üzerine etkileri.	140
6.17:	Çeşitli stabilizatörlerin <i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazının aktivitesi üzerine etkileri.	142
6.18:	10 mM CaCl <sub>2</sub> 'nin 50 ve 60 °C sıcaklıklarda <i>Bacillus</i> sp. P22 alkalen proteazı üzerine zamana bağlı etkileri.	144

# 1. GİRİŞ

Son yıllarda enzimlerin biyokatalizörler olarak kullanımı ekolojik uygunlukları, yüksek özgüllükleri, sergiledikleri kemo-, regio-, enantiyo-seçicilikleri, ve katalizledikleri geniş çeşitlilikteki reaksiyonlar sayesinde büyük ölçüde artış göstermiştir. Enzim üretiminin gerçekleştirilmesi ve optimizasyonunda etkili olan besi yeri bileşenleri, pH, sıcaklık ve havalandırma gibi faktörler biyoreaktörlerde kolaylıkla kontrol edilebilmektedir. Ayrıca mikroorganizmaların genetik olarak manipüle edilebiliyor olması, istenilen özelliklerde enzimlerin geliştirilmesinin önünü açmaktadır. Bunlara ek olarak, kültür ortamlarında sürdürülebilir substratlar kullanılmakta, endüstriyel atıklar değerli ürünlere dönüştürülerek katma değer yaratılmaktadır. Tüm bu nitelikler sürekli büyümekte olan biyokatalitik süreç araştırmalarına hız katmaktadır. Bunun sonucunda ise enzimler gıda, tekstil, deri, ilaç, kozmetik, kimya, enerji, biyomalzeme, kağıt, selüloz ve deterjan endüstrilerinde geniş uygulama alanları kazanmışlardır [Vermelho et al., 2012].

## 1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Tez çalışmasında yerel bir izolat olan *Bacillus* sp. P22 alkalin proteazının üretim koşullarının optimizasyonu, enzimin saflaştırılması ve nitelendirilmesi amaçlanmış, bunun için; enzim üretiminin en yüksek olduğu besi yeri bileşenleri ve inkübasyon koşullarının belirlenmesi, optimize koşullarda üretilen enzimin iyon değiştirici ve moleküler elek kromatografileri kullanılarak saflaştırılması, saflaştırılan enzimin, çeşitli sıcaklık, pH koşulları altında ve çeşitli kimyasallar varlığında biyokimyasal olarak nitelendirilmesi yoluyla endüstriyel kullanıma uygunluğunun belirlenmesi hedeflenmiştir.

Günümüz endüstriyel enzim pazarında oldukça büyük pay sahibi olan alkalin proteazlardan başta deterjan, süt ürünleri ve deri endüstrileri olmak üzere, fırıncılık, kozmetik ve atık su arıtımında sıklıkla faydalanılmaktadır. Endüstriyel süreçlerde kullanılan alkalin proteazların yüksek alkali ortamlarda ve geniş sıcaklık aralıklarında stabil olması, yüzey aktif maddeler ve oksitleyici ajanlar varlığında aktivitelerini koruyabilmeleri gerekmektedir. Tez çalışması kapsamında belirlenen

hedeflere ulaşılması halinde, *Bacillus* sp. P22 alkalin proteazının endüstriyel kullanıma uygunluğu ortaya çıkarılacak ve enzim özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla daha sonra gerçekleştirilecek enzim mühendisliği çalışmalarına katkı sağlanacaktır.

## 2. PROTEAZLAR

Proteazlar proteinleri oluşturan aminoasitlerin arasındaki peptit bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Tüm canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için gereklidirler ve her türden organizmanın genlerinin yaklaşık % 2'si tarafından kodlanmaktadır [Southan, 2001]. Proteazlar, gıdalardaki proteinlerin sindirimi, intraselüler proteinlerin geri dönüşümü, kanın pıhtılaşması, antijen oluşumu ve çeşitli proteinlerin (enzimler, peptit yapılı hormonlar, nörotransmitterler) aktive edilmesi gibi birçok biyolojik süreçte önemli işleve sahiptir. Proteazların endüstride kullanımlarına ilk olarak peynir üretiminde rastlanmaktadır; sütün kesilmesi amacıyla başlarda bitki öz suları (Homeros İlyada'da incir öz suyundan söz etmektedir. İncir öz suyunun bir proteaz olan fikain içerdiği bilinmektedir) ve sonraları memeli midesine özgü bir enzim kompleksi olan "rennet" kullanılmıştır. Proteazlardan etlerin yumuşatılmasında, buraların berraklaştırılmasında, peynir aromalarının zenginleştirilmesinde faydalanılmaktadır. Bundan başka deri, ipek ve deterjan endüstrilerinde geniş kullanım alanı bulunan proteazların tıbbi kullanım alanları arasında ise gastrointestinal parazitlerin yok edilmesi (antelmintikler), yanık vakalarında görülen ölü derinin giderilmesi, kan gruplarının belirlenmesi, fitik oluşumu gözlemlenen intervertebral disklerin kırıldık içeriğinin sindirilmesi yoluyla sırt ağrılarının giderimi (kemonükleoliz) bulunmaktadır.

Biyolojik ve tıbbi araştırmalar ile biyoteknolojik çalışmalarda kullanılabilirlikleri bahsedildiği üzere oldukça yaygın olan proteazlar önemli bir enzim sınıfını oluşturmaktadırlar [Polaina and MacCabe, 2007].

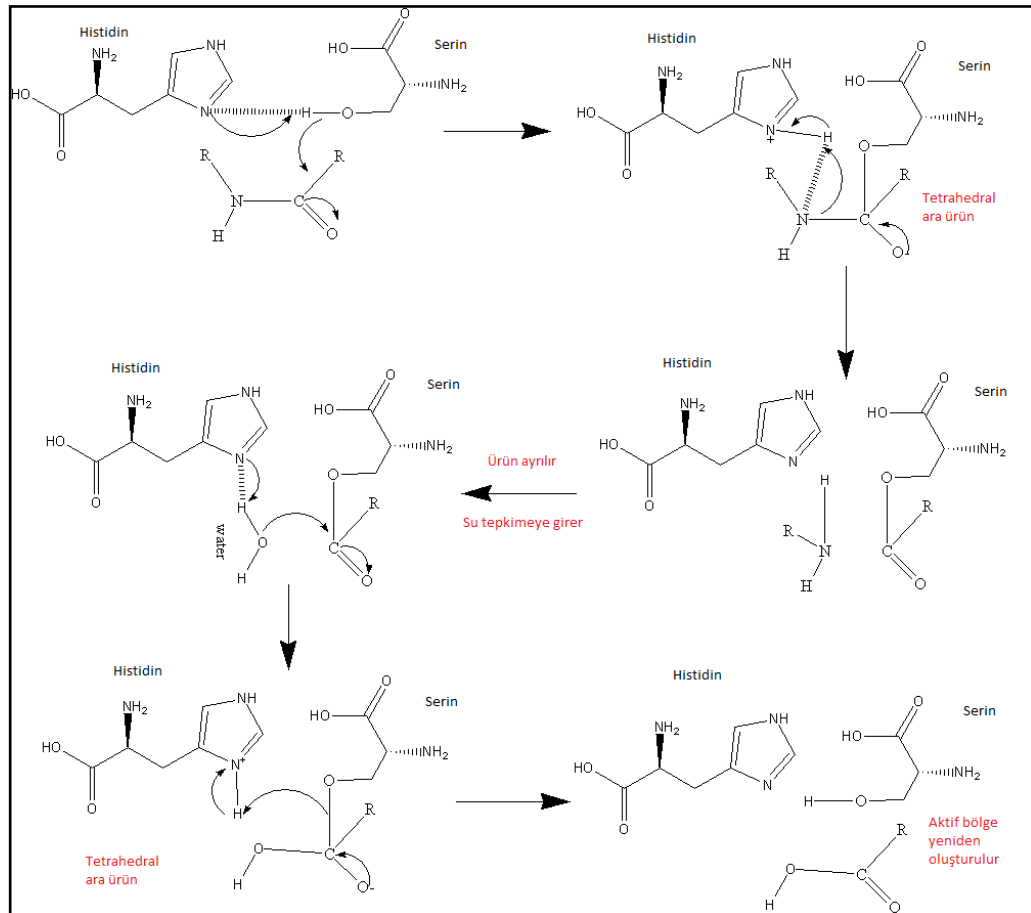
### 2.1. Proteaz Terimi

Proteaz terimi Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Adlandırma Komitesi (NC-IUBMB)'nin Enzim Adlandırması'nda ve İnsan Gen Adlandırma Komitesi tarafından, peptit bağlarının hidrolizini gerçekleştiren proteinler için önerilmiştir. Proteaz terimi, pek çok farklı proteaz alt-tip ismi için de köken teşkil etmektedir: aminoproteazlar, karboksiproteazlar gibi. Bu köken üzerinde kurulan terminoloji, proteinler ve büyük polipeptitlerin iç kısımlarında yer alan bağlara etkiyen endoproteaz, daha küçük substratlara etki eden oligoproteaz ve

ekzoproteazlara da uygulanabilmiştir. Proteazlar ayrıca peptidazlar, proteinazlar ve proteolitik enzimler olarak da adlandırılmaktadır [Polaina and MacCabe, 2007].

## 2.2. Proteazların Katalitik Mekanizmaları

Bir proteazın katalitik tipi, enzimin yapısında bulunan ve peptit bağlarının hidrolizinden sorumlu kimyasal gruplarla ilişkilidir. Buna göre altı özgül katalitik tip tanımlanmıştır: Serin, treonin, sistein, aspartat, glutamat ve metallo-proteazlar. Serin, treonin ve sistein proteazlarda katalitik nükleofil, bir hidroksil grubu veya bir sülfhidril grubu gibi bir amino asit yan zincirinin reaktif grubudur. Aspartat ve metallo-proteazlarda nükleofil genellikle aktive edilmiş bir su molekülüdür; aspartat proteazlarda su molekülü doğrudan aspartat rezidüsünün yan zincirleri tarafından tutulurken, metallo-proteazlarda bir veya iki divalent metal iyonu su molekülünü yerinde tutar.



Şekil 2.1: Subtilislerin katalitik mekanizması.



Metallo-proteazlarda bulunan metal iyonu genellikle çinko olmakla birlikte, kobalt, mangan veya bakır da olabilmektedir. Tek bir metal iyonu çoğu zaman üç amino asit ligandı tarafından bağlanır. Aktive edilmiş su molekülü dördüncü ligandır ve bu durumdaki metal iyonu için “tetrahedral koordinasyon”dan söz edilir. Subtilisinlerin katalitik mekanizması Şekil 2.1’de [Nduwimana et al., 1995] verilmiştir. İki metal iyonu varlığında, iyonlardan her biri için tetrahedral koordinasyon söz konusudur; metal iyonları aktive edilmiş iki su molekülü tarafından bağlanır ve bir amino asit rezidüsü bunların ligandını oluşturur [Polaina and MacCabe, 2007]. 2005 yılında tanımlanan glutamat proteazların katalitik mekanizmaları ise henüz aydınlatılamamış olmakla birlikte, bu enzimlerin aktif merkezlerinde Glutamat/Glutamin katalitik ikilisi bulunduğu düşünülmektedir [Kataoka et al., 2005]. Pek az proteazın katalitik tipi halen çözülmeyi beklemektedir.

### 2.3. Aktif Merkez

Proteazların kristallografik yapılarına bakıldığında, aktif merkezlerinin genellikle enzim molekülünün yüzeyinde, birbirine bitişik yapısal *domain*ler arasında bulunan bir olukta yerleşik olduğu ve enzimin substrat özgüllüğünün, bu oluk boyunca katalitik bölgenin bir veya iki tarafına yerleşmiş bulunan bağlanma bölgelerinin nitelikleri tarafından belirlendiği görülmüştür. Aktif merkezin yapısının korunması ve katalizin gerçekleştirilmesi açısından nükleofil grup ve diğer rezidüer önem taşımaktadır. Aktif merkez rezidüleri, bir proteaz ailesini oluşturan bütün proteazlar arasında yüksek derecede korunmuşlardır [Polaina and MacCabe, 2007].

Serin proteazların aktif merkezlerinde aspartat, serin ve histidin rezidülerinin oluşturduğu katalitik üçlü bulunmaktadır. Aktif merkezdeki serin rezidüsü substrat ile kovalent bağ oluşturan oldukça reaktif bir gruptur. Sistein proteazlarda aktif merkezdeki katalitik üçlüyü sistein, histidin ve aspartat rezidüleri oluştururken bu enzimlerde aktif merkezdeki sistein rezidüsü enzim substrat kompleksinin oluşturulmasında etkilidir. Aspartat proteazlarda ise enzimin aktif merkezi iki aspartat rezidüsü içermektedir [Nduwimana et al., 1995].

Genel anlamda bir peptit bağının kesilmesi, aktif nükleofilin proton vericisi ve baz olarak bilinen bir rezidünün de proton alıcısı olduğunu varsayan asit/baz reaksiyonu örneği ile tarif edilebilir. Serin ve sistein proteazlarda bu proton alıcısı

sıklıkla bir histidin rezidüsü olmakla birlikte kimi zaman bir lizin (sinyal peptidaz I ve endopeptidaz La) rezidüsüdür. Proton alıcısının bir histidin rezidüsü olduğu durumlarda üçüncü bir rezidü histidinin imidazolyum halkasındaki azot atomlarından birinin aktive edilmesini sağlar. Kimotripsin, subtilisin ve karboksipeptidaz Y gibi serin proteazlarda bu katalitik üçlünün üçüncü üyesini bir aspartat rezidüsü oluşturur. Assemblinde üçüncü rezidü ikinci bir histidin, D-Ala-D-Ala karboksipeptidaz A'da ise ikinci bir serindir. İstisna olarak omptin ve ökaryot sinyal peptidaz gibi serin proteazlarda yalnızca bir Ser/His katalitik ikilisi bulunmaktadır. Sistein proteazlarda üçlünün üçüncü üyesi asparajin, aspartat ya da glutamat olabilmektedir. Bununla birlikte yalnızca Cys/His ikilisi içeren pek çok sistein proteaz da bilinmektedir.

Serin ve sistein proteazlarda, katalizin ilk aşamasında enzim ve substrat arasında oluşan ara ürünün stabilizasyonuna yardımcı olan dördüncü bir rezidüden bahsedilir. Bu rezidü, su molekülündeki negatif yüklü oksijen atomu ile bir hidrojen bağı kurmaktadır ve bu katalitik alt bölgeye “oksianyon çukuru” adı verilir. Kimotripsinde bu dördüncü rezidü bir glisin iken, subtilisinde asparajin ve papainde glutamindir.

Bazı proteazlar tek bir katalitik rezidüye sahiptir; N-terminal aminoasit rezidüsü. Bu gruptaki enzimler N-terminal nükleofil (Ntn) hidrolazlar olarak tarif edilir. Bilinen tüm treonin proteazlar Ntn-hidrolazlar grubuna girmektedir. Ntn-hidrolazların N-terminal amino gruplarının proton alıcısı olarak işlev gösterdiği düşünülmektedir.

Aspartat proteazların katalitik aktivitelerinde yalnızca aspartik asit rezidüleri işlevseldir. HEXXH çinko-bağlayıcı motif barındıran tüm metallo-proteazlarda katalitik aktivite için bir glutamat rezidüsü gereklidir. Benzer şekilde iki metal iyonu bağlayan metallo-proteazlarda ise katalitik rezidüler sıklıkla glutamat ve aspartattır [Polaina and MacCabe, 2007].

## **2.4. Proteazların Sınıflandırılması**

### **2.4.1. Katalizin Kimyasal Mekanizmasına Göre Proteazlar**

Hartley'in 1960 yılında yapmış olduğu çalışma, proteaz çalışan araştırmacılarca bugün bilinen anlamda katalitik tip konseptinin geliştirilmesinde son

derece faydalı olmuştur [Barret, 1994]. Buna göre enzimler kataliz tipleri temelinde (yukarıda bahsedildiği üzere) serin, treonin, sistein, aspartat, glutamat ve metallo-proteazlar olarak altı ayrı grupta sınıflandırılmaktadırlar. Katalitik tip sistemi pek çok bakımdan kullanışlı olmakla birlikte bir takım sınırlamaları olduğu da kabul edilmelidir. Örneğin, her serin proteaz katalitik bölgesinin merkezinde nükleofil olarak işlevselleşmiş bir serin rezidüsü taşımaktadır. Bunun bir sonucu olarak da bu tipteki bir çok enzim genel serin proteaz inhibitörlerinden etkilenmektedir. Öte yandan, serin proteazların pek çok farklı moleküler yapı ve katalitik mekanizmaya sahip oldukları da bilinmektedir. Dahası bu enzimler asla birbirinin homoloğu değildirler ve bundan dolayı da “serin proteaz ailesi” gibi bir ifade kullanmak anlamlı bulunmamaktadır [Polaina and MacCabe, 2007].

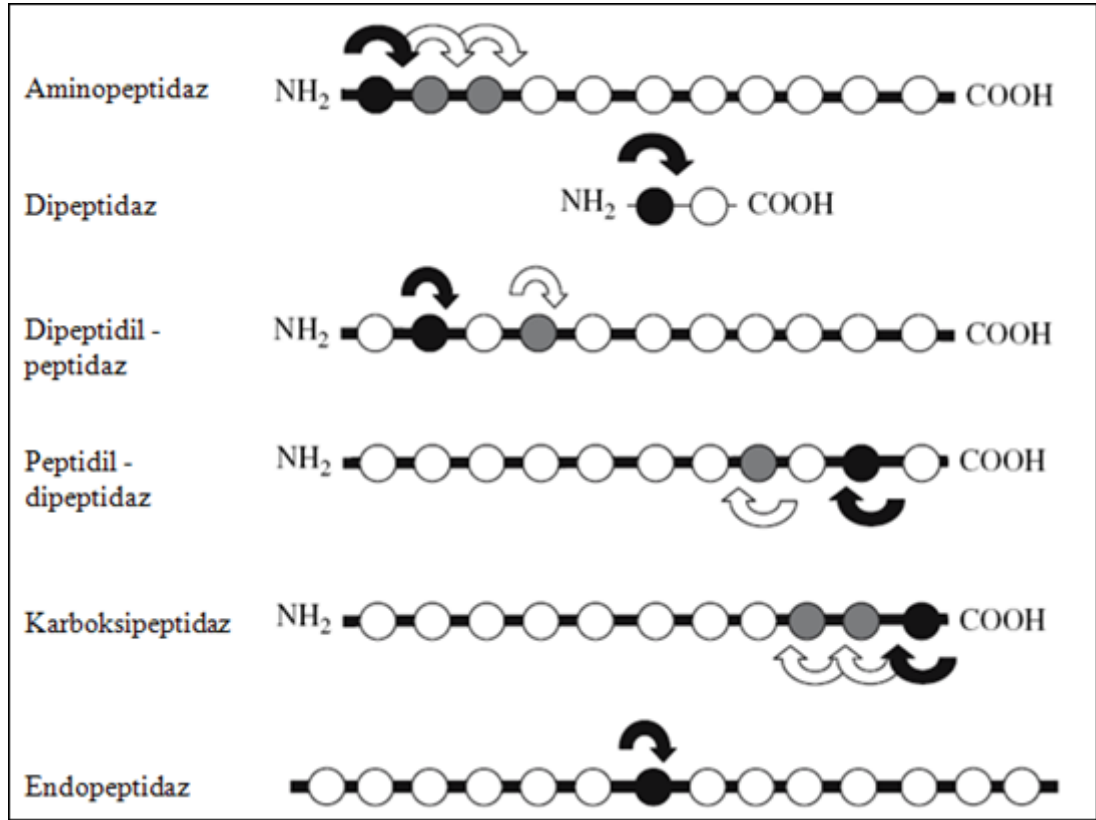
#### **2.4.2. Poliipeptit Zincirini Kırdıkları Noktaya Göre Proteazlar**

Bir peptit bağının hidroliz edilmesi açısından bakıldığında tüm proteazların aynı reaksiyonu katalizledikleri düşünülebilir. Ancak proteazlar peptit bağının substrat içindeki pozisyonuna, kesilen bağın yakınındaki aminoasit rezidülerine ve ilgili substratın henüz tam olarak aydınlatılmamış olan diğer bütün özelliklerine karşı seçicilik gösterir (Şekil 2.2) [Polaina and MacCabe, 2007]. Bundan dolayı proteolitik enzimler kesim gerçekleştirdikleri noktaya göre çeşitli sınıflara ayrılabilir.

- Endoproteazlar

Bir endoproteaz, poliipeptit zincirinin N-terminal veya C-terminal uçlarından uzak kısımlarında konumlanmış bulunan alfa-peptit bağlarını hidroliz eder. Endoproteazlara örnek olarak kimotripsin, pepsin ve papain verilebilir. Oligoproteazlar adı verilen bir grup endoproteaz yalnızca proteinlerden küçük olan substratlara etki ederler. Gıdalardaki proteinlerin sindirimlerini başlatan endoproteazlar, yeni N- ve C-terminal uçları oluşturarak sindirim sürecini tamamlayacak olan ekzoproteazlar için substratlar meydana getirirler. Proteinlerin sınırlı proteolizi de endoproteazların ayrıca sergiledikleri işlevlerdendir. Bu sınırlı proteolize, salgılanan proteinlerden sinyal peptitlerinin uzaklaştırılması (sinyal peptidaz I), öncül proteinlerin olgunlaştırılması (enteropeptidaz ve furin) örnek olarak gösterilebilir. Pek az endoproteaz substratın bir ucundan belirli mesafedeki bir

bölgeye etki eder; Mitokondriyal *intermediate* proteaz, N-terminal bölgeden bir oktapeptit keser [Polaina and MacCabe, 2007].



Şekil 2.2: Proteazların polipeptit zincirini kestikleri yere göre sınıflandırılması.

- Omega-proteazlar

Omega proteazlar substratlarında serbest N- veya C-terminal bölgeye ihtiyaç duymayan ikinci proteaz grubunu oluşturmaktadır. Yüklü bir terminal gruba ihtiyaç duymamalarına karşın, polipeptit zincirlerinin uç bölgelerine yakın etki gösterirler ve bu özellikleriyle endoproteazlardan tamamen ayrı bir grup oluştururlar. Ubikitinil hidrolazlar, piroglutamil proteazlar ve gama-glutamil hidrolaz bu gruba girmektedir [Polaina and MacCabe, 2007].

- Ekzoproteazlar

Ekzoproteazlar serbest bir N-terminal amino grubuna, bir C-terminal karboksil grubuna veya bu grupların her ikisine birden gereksinim duyan ve terminal bölgeden en fazla üç rezidü uzaklaştıran enzimlerdir. Bu enzimler aminoproteazlar, karboksiproteazlar, dipeptidil proteazlar, peptidil dipeptidazlar, tripeptidil proteazlar

ve dipeptidazlar olarak sınıflandırılmaktadırlar. Aspartat veya glutamat proteaz sınıfına giren ekzoproteaz tanımlanmamıştır.

Aminoproteazlar, substratlarındaki N-terminal bölgeden tek bir aminoasit kesen enzimlerdir. Dipeptidazlar dipeptidleri hidroliz etmektedir ve bu enzimler her iki ucun da serbest olmasına gereksinim duymaktadırlar. Dipeptidil proteazlar substratlarında N-terminal bölgeden bir dipeptit ayırmaktalarken, tripeptidil proteazlar N-terminal bölgeden bir tripeptit, peptidil dipeptidazlar C-terminal bölgeden bir dipeptit uzaklaştırmaktadırlar. Serbest C-terminal bölgeden tek bir rezidü hidroliz eden enzimler ise karboksiproteazlar olarak adlandırılmaktadırlar [Polaina and MacCabe, 2007].

### **2.4.3. Optimal Çalışma pH'sına Göre Proteazlar**

Proteazlar ayrıca aktif oldukları optimal pH değerine göre asidik, nötral veya alkalin proteazlar olarak da sınıflandırılabilirler.

## **2.5. Proteaz Kaynakları**

Proteazlar fizyolojik olarak gerekli enzimler olduklarından yaşayan organizmalarda bol miktarda bulunur ve bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi geniş çeşitlilikteki canlılar bu enzimlerin kaynağını oluşturur [Rao et al., 1998].

### **2.5.1. Bitkisel Proteazlar**

Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanılmalarının önünde, ziraat için uygun alanların gerekliliği ve bitki yetiştirilmesine elverişli iklimsel şartlara ihtiyaç duyulması gibi bir takım engeller bulunmaktadır. Bundan başka bitkilerden proteaz elde edilmesi zaman alıcı bir süreçtir. Papain, bromelain, keratinaz ve fisin iyi bilinen bitkisel kökenli proteazlara örnek olarak verilebilir [Rao et al., 1998].

Papain, kullanımı çok eskilere dayanan bir bitkisel proteazdır [Schechler and Berger, 1967]. Batı ve Orta Afrika ile Hindistan'ın tropik altı bölgelerinde yetişen *Carica papaya* meyvelerinin lateksinden elde edilmektedir [Rao et al., 1998]. pH 5-9 aralığında aktivite göstermekte ve 80-90 °C'a kadar kararlılığını korumaktadır. İlk

kez 1879 yılında izole edilmiş olup, kristallografik yapısı belirlenen ilk enzimdir [Drenth et al., 1968], [Kamphuis et al., 1984]. Bir sistein proteaz olan bromelain, ananas bitkisinden elde edilmekte ve pH 5-9 aralığında aktivite göstermektedir. Papainden daha düşük bir sıcaklıkta (70 °C) inaktive olmaktadır. Bitkisel proteazlara bir diğer örnek olan keratinaz, kıl ve yün gideriminde kullanılmaktadır. Bir esansiyel aminoasit olan lizin üretiminin yanı sıra atık su giderlerinin tıkanmasını önlemek amacıyla da ilgili endüstrilerde uygulama alanına sahiptir [Rao et al., 1998].

### **2.5.2. Hayvansal Proteazlar**

Renninler, pepsin, kimotripsin ve tripsin iyi bilinen hayvan kökenli proteazlardandır ve bu enzimler büyük miktarda saf halde üretilebilmektedir. Ancak üretimleri çiftlik hayvanlarının kesimine bağlı bulunmakta ve bu durum da bir takım politik ve zirai engeller ortaya çıkarmaktadır.

Temel intestinal sindirim enzimi olan tripsin, gıdalardaki proteinlerin hidrolizinden sorumludur ve bir serin proteazdır. Gıda endüstrisindeki kullanımı, aktivitesi sonucu oluşan protein hidrolizatlarında oluşturduğu acı tat dolayısıyla sınırlıdır. Bakteriyel besiyerlerinin üretiminde, bazı özel tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır.

Hayvan pankreas ekstraktında bulunan kimotripsinin saf hali oldukça pahalıdır ve yalnızca diyagnostik ve analitik çalışmalarda kullanılmaktadır. Öncül formunda (kimotripsinojen) hayvan pankreasında bulunmakta, tripsin tarafından aktive edilmektedir. Karboksi terminal bölgelerde bulunan aromatik aminoasitlerden kesim gerçekleştirmektedir. Süt proteini hidrolizatlarının allerjen özelliklerinin giderilmesinde yoğun olarak kullanılmaktadır.

Bir diğer hayvan kaynaklı proteaz olan pepsin ise, neredeyse tüm omurgalıların midelerinde bulunan asidik bir proteazdır. Hidroklorik asit varlığında otokataliz ile zimojen formundan aktif enzim oluşmaktadır. Pepsin iki hidrofobik amino asit arasındaki peptit bağının hidrolizini katalizlemektedir. pH 1 ve pH 2 aralığında optimal aktivite sergilemekte ve pH 6 üzerindeki değerlerde aktivitesini yitirdiği bilinmektedir [Rao et al., 1998].

### 2.5.3. Mikrobiyal Proteazlar

Hayvansal ve bitkisel proteazların günümüz enzim pazarının taleplerini karşılamada yetersiz kalması, mikrobiyal proteazlara olan ilgiyi giderek artırmaktadır. Mikroorganizmaların genetik müdahaleye uygun olmaları ve geniş biyokimyasal çeşitlilik sergilemeleri de mikrobiyal proteazların tercih edilmelerinin diğer sebepleri arasındadır [Rao et al., 1998]. Bu elverişliliğin bir sonucu olarak da dünya enzim satışlarında yaklaşık % 65 paya sahiptirler [Oskouie et al., 2007].

Mikrobiyal proteazlar çoğunlukla hücre dışı enzimlerdir ve üreticileri tarafından doğrudan fermentasyon ortamına salınmaktadırlar. Bu durum üretim sürecinin takip eden aşamalarında hayvansal ve bitkisel proteaz üretimi ile kıyaslandığında kolaylıklar sunmaktadır [Lageiro et al., 2007].

#### 2.5.3.1. Bakteriyel Proteazlar

Proteaz ürettiği bilinen pek çok mikroorganizma olmasına rağmen bunlardan ancak çok azı ticari kullanıma uygun bulunmuştur. Bakteriler, *Bacillus* cinsi ile en baskın proteaz üreticileridirler. Pek çok farklı ortamdan izole edilen sayısız *Bacillus* türünün alkalen proteaz üretimi çalışılmıştır. *Bacillus* cinsi içerisinde *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquifaciens* ve *B. mojavensis* proteazları endüstriyel uygunlukları ile öne çıkmaktadır. Farklı enzim kaynakları bulmaya yönelik ilgiye karşın, literatüre bakıldığında *Bacillus* sp. en uygun ticari alkalen proteaz kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadır [Lageiro et al., 2007].

Ticari bakteriyel proteazların çoğu nötral ve alkalen proteazlardır. Bakteriyel nötral proteazlar dar bir pH aralığında (pH 5-8) aktiftirler ve sıcaklık toleransları düşüktür. Tepkime hızları orta seviyede olduğundan nötral proteazlar hayvansal proteazlara oranla hidrolize gıda proteinlerinde daha az acılık meydana getirmekte ve bu nedenle gıda endüstrisinde tercih edilmektedirler. Bir nötral proteaz olan nötraz, doğal bitkisel proteaz inhibitörlerine karşı duyarsız olduğundan bira endüstrisi için önemli bir enzimdir. Bakteriyel nötral proteazlar hidrofobik aminoasit çiftlerine yüksek ilginlik göstermektedirler. Nötral proteazların düşük termotoleransları gıda hidrolizatlarının üretimi sırasında hidrolizin derecesini kontrol etmekte kolaylık sağlamaktadır. Bazı nötral proteazlar metallo-proteaz sınıfına girer ve aktivite için

divalent metal iyonlarına gereksinim duyarlılarken, bazıları serin proteazlar olarak sınıflandırılırlar ve şelatlayıcı ajanlardan etkilenmezler.

Bakteriyel alkalen proteazlar geniş substrat özgüllüğüne sahiptirler ve pH 10 gibi alkali pH'larda yüksek aktivite göstermektedirler. Optimal çalışma sıcaklıkları yaklaşık 60 °C'tır. Bu özellikleri alkalen proteazları deterjan endüstrisinde kullanıma uygun kılmaktadır [Rao et al., 1998].

### **2.5.3.2. Fungal Proteazlar**

Funguslar bakterilerle kıyaslandıklarında daha geniş çeşitlilikte enzimler sunmaktadır. Örneğin *Aspergillus oryzae* asidik, nötral ve alkalen proteazlar üretebilmektedir. Fungal proteazlar daha geniş bir pH aralığında (pH 4-11) aktiflerdir ve substrat özgüllükleri geniştir. Ancak sıcaklık toleransları ve reaksiyon hızları bakteriyel enzimlerden daha düşüktür. Fungal asidik proteazlar pH 4-4.5 arasında optimum aktivite sergilemektedirler ve pH 2.5-6 arasında kararlılıklarını korumaktadırlar. Dar pH ve sıcaklık özgüllüklerinden dolayı peynir endüstrisinde sıklıkla fungal proteazlardan faydalanılmaktadır. Fungal nötral proteazlar ise pH 7'de aktiflerdir ve şelatlayıcı ajanlarca inhibe edilebilmektedir [Rao et al., 1998].

### **2.5.3.3. Viral Proteazlar**

Viral proteazlar, AIDS ve kanser gibi ölümcül hastalıklara neden olan virüs proteinlerinin işlenmesinde fonksiyonel olduklarından dolayı önem kazanmıştır. Çeşitli virüslerde serin, aspartat ve sistein proteazlar bulunduğu bilinmektedir. Viral proteazların tümü endoproteazlar sınıfına girmektedir. Viral gelişim ve replikasyonda işlevsel olan retroviral aspartik proteazlar, poliprotein öncülünün bir parçası olarak ifade edilen homodimerlerdir. Öncülün otolizi ile olgunlaşmış proteaz oluşmaktadır. Viral proteazların üç boyutlu yapılarının ve bunların sentetik inhibitörlerle olan etkileşimlerinin aydınlatılması amacıyla kapsamlı çalışmalar sürdürülmektedir [Rao et al., 1998].



## 2.6. Mikrobiyal Alkalen Proteazların Özellikleri

Çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen alkalen proteazların enzimatik ve fizikokimyasal nitelikleri yoğun şekilde çalışılmıştır.

### 2.6.1. Optimum pH ve Sıcaklık

Alkalen proteazlar çoğunlukla pH 9-11 aralığında optimal aktivite sergilemekteyken, daha yüksek değerlerde çalışabilen enzimlerin de varlığı bilinmektedir. Yüksek izoelektrik noktalara sahiptirler ve pH 6-12 aralığında kararlıdırlar. Alkalen proteazların optimum çalışma sıcaklıkları ise 50-70 °C arasında değişmektedir. Bununla birlikte 85 °C gibi yüksek sıcaklıklarda aktivitesini yitirmeyen alkalen proteazlar da tanımlanmıştır. *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Thermus* sp. alkalen proteazları yüksek sıcaklıklarda oldukça kararlıdırlar ve ortama eklenen Ca<sup>2+</sup> enzimlerin sıcaklık kararlılığını artırmaktadır [Kumar and Takagi, 1999].

### 2.6.2. Moleküler Ağırlık

Mikrobiyal alkalen proteazların moleküler ağırlıkları 15-30 kDa arasında değişmektedir. Ancak 31.6 kDa [Freeman et al., 1993], 33 kDa [Larcher et al., 1996], [Samal et al., 1991], 36 kDa [Tsuji et al., 1990] ve 45 kDa [Kwon et al., 1994] ağırlıklarında enzimler de olduğu gösterilmiştir. *Kurthia spiroforme*'den izole edilen bir proteolitik enzimin 8 kDa gibi çok düşük bir moleküler ağırlığa sahip olduğu bildirilmiştir [Steele et al., 1992]. Bazı *Bacillus* sp. alkalen proteazlarının çoklu elektroforetik formları olduğu gözlemlenmiştir; bu durumun protein molekülündeki glutamin veya asparajin rezidülerinin non-enzimatik, geri dönüşümsüz deaminasyonu veya otoproteoliz sonucu olduğu bilinmektedir [Kumar and Takagi, 1999].

### 2.6.3. Metal İyonu Gereksinimi ve İnhibitörler

Maksimum aktivite için  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ve  $\text{Mn}^{2+}$  gibi divalent katyonlara veya bunların kombinasyonuna gereksinim duyan alkalen proteazlar için bu katyonlar ayrıca termal kararlılığı artırıcı etki gösterebilmektedir. Bu katyonların enzimi termal denatürasyon karşısında koruduğu ve yüksek sıcaklıklarda enzimin aktif konformasyonunun sürdürülmesinde hayati önem taşıdığı düşünülmektedir. Bundan başka, Proteinaz K'da protein aktivitesi ile kararlılığını etkileyen ve katalitik bölge dışında bulunan  $\text{Ca}^{2+}$  bağlama bölgeleri olduğu gösterilmiştir.

İnhibisyon çalışmaları ile enzimin kofaktör gereksinimleri ve aktif merkezinin yapısı aydınlatılmaktadır. Yapılan çalışmalarda  $\text{Hg}^{2+}$  iyonlarının enzim aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Alkalen proteazların fenilmetilsülfonil florür (PMSF) ve diizopropilflorofosfat (DFP) varlığında tamamen inhibe oldukları bilinmektedir. PMSF enzimin katalitik bölgesindeki serin rezidüsünü sülfonatlayarak aktivitenin bütünüyle yitirilmesine yol açmaktadır. Bu tip inhibisyon profili ilgili enzimlerin serin hidrolaz olduklarını göstermektedir. Bazı alkalen proteazların EDTA gibi metal şelatlayıcı ajanlara karşı hassasiyetlerinin metal iyonu bağımlı olduğu bulunmuştur. Tiyol inhibitörleri *Bacillus* spp. alkalen proteazları üzerine çok az etki gösterebilirken, *Streptomyces* sp. tarafından üretilen enzimleri daha çok etkilemektedir [Kumar and Takagi, 1999].

### 2.6.4. Substrat Özgüllüğü

Alkalen proteazlar doğal proteinlere olduğu kadar pek çok sentetik protein üzerinde de etkili olduğu halde, reaksiyon hızları değişmektedir; alkalen proteazlar kazeine karşı, hemoglobün veya sığır serum albümine olduklarından daha fazla aktiftirler.

Kesim bölgesinin karboksil bölümünde bulunan tirozin, fenilalanin veya lösin gibi aromatik veya hidrofobik amino asit rezidülerine karşı özgüllükleri bulunmaktadır. Substrat olarak insülin  $\beta$ -zinciri kullanıldığında, çeşitli alkalen proteazlar tarafından kesim gerçekleştirilen bağlar sıklıkla  $\text{Glu}^4\text{-His}^5$ ,  $\text{Ser}^9\text{-His}^{10}$ ,  $\text{Leu}^{15}\text{-Tyr}^{16}$ ,  $\text{Tyr}^{16}\text{-Leu}^{17}$ ,  $\text{Phe}^{25}\text{-Tyr}^{26}$ ,  $\text{Tyr}^{26}\text{-Thr}^{27}$  ve  $\text{Lys}^{29}\text{-Ala}^{30}$  olarak gözlemlenmiştir. Bir *Bacillus* sp. alkalen elastazı olan Ya-B'nin oksitlenmiş insülin

$\alpha$ - ve  $\beta$ - zincirlerini blok halinde kestiği Tsai ve arkadaşları tarafından tarif edilmiştir [Tsai et al, 1988].

*Bacillus* sp. Ya-B'nin elastin ve süksinil-Ala<sub>3</sub>-*p*-nitroanilid ve süksinil-Ala-Pro-Ala-*p*-nitroanilid gibi elastaz-özgül substratları daha hızlı hidroliz ettiği gözlemlenmiştir. Bu enzimin elastin içerisinde bulunan alanin gibi alifatik amino asit rezidülerine karşı seçici olduğu gösterilmiştir. Elastoliz sürecinin pH 10.6'dan düşük değerlerde, elastazdaki pozitif yüklü rezidüer ve elastin molekülündeki negatif yüklü rezidüer arasında kurulan elektrostatik etkileşimler sonucu meydana gelen enzim substrat kompleksi ile başlatıldığı düşünülmektedir [Kumar and Takagi, 1999].

## 2.7. Proteazların Endüstriyel Kullanımları

Başta çamaşır ve bulaşık deterjanı endüstrisi olmak üzere pek çok endüstriyel alanda kullanım sahası bulunan proteazlara yönelik birçok çalışma yürütülmekte, istenilen özelliklere sahip ve sert koşullarda aktivite gösterebilen, endüstriyel süreçlerde kullanıma uygun enzimler geliştirilmektedir [Kirk et al., 2002].

### 2.7.1. Deterjan Endüstrisi

Deterjan endüstrisi, pazar hacmi ve üretim miktarı göz önüne alındığında alkalen proteazların en çok öne çıkan kullanım alanıdır. 1913 yılında Otto Roehm tarafından pankreatik ekstraktların temizlik malzemelerinde kullanımı proteazların deterjan endüstrisine girişi olarak kabul edilmektedir. 1960'lı yıllarda *Bacillus licheniformis*'ten izole edilen alkalen proteaz Carlsberg'in ilk kez deterjanlara bir katkı maddesi olarak eklenmesinden sonra, *Bacillus* kaynaklı çok sayıda alkalen proteaz saflaştırılmış ve karakterize edilmiş, dikkate değer proteolitik aktivite, kararlılık, geniş substrat özgüllüğü, kısa fermentasyon süreleri ve düşük maliyetli üretim yöntemleri geliştirilmiştir [Aehle, 2007].

Deterjanlara katkı maddesi olarak eklenen proteazlar sıklıkla *Bacillus subtilis*inleridir. 1980'li yıllarda yüksek alkalen subtilisinler tanımlanmış ve kısa zaman sonra sıvı olanlar dışında tüm deterjanlardaki standart subtilisinlerin yerlerini almışlardır. Yine 1980'li yılların ortasında subtilisinlerin genetik mühendisliği uygulamalarına son derece elverişli oldukları gösterilmiş ve on yılın sonunda

rekombinant soylar kullanılarak üretilen ilk teknik enzimler arasında yer almışlardır. Rekombinant enzimler 1990'ların başından itibaren pazara girmiştir. 2002 yılında Avrupa Birliği'nde 900 ton saf enzim üretilmiş olması subtilisin kullanımının önemini açıkça ortaya koymaktadır.

Subtilisinlerin bu denli başarılı olması, hücre dışı proteazların genel özellikleri olan yüksek kararlılıkları ve düşük substrat özgüllükleri gibi niteliklerine dayandırılabilir. Hücre dışı enzimler biyokütleden kolayca ayrıldıkları için üretimin devam eden aşamalarında önemli kolaylıklar sunarlar. *Bacillus* soylarının kısa zamanda fermentasyon ortamına enzim salgılayabilme kabiliyetleri ise bir diğer önemli noktadır [Maurer, 2004].

Çamaşır ve bulaşık deterjanlarına eklenen proteazlar, kumaş (çamaşır) veya sert yüzeyler (bulaşık) üzerindeki protein lekelerini degrade ederek, yıkama sıvısının içerisindeki diğer çözücüler tarafından temizlenmelerini veya çözümlerini sağlamaktadır. Proteazlar kan ve çimen lekelerini çözmekte etkilidir. Bu nedenle evsel kullanıma sunulan ticari deterjanların pek çoğunun içeriğine katılmaktadırlar.

Satışa sunulmuş ticari deterjanların içeriğine katılan proteazlar genellikle birbirlerine çok benzer ve aralarında hemen hiç yapısal farklılık bulunmamaktadır. Bu proteazlar ayrıca düşük substrat özgüllüğüne sahiptirler ve optimal çalışma sıcaklığı, optimal pH,  $Ca^{2+}$  iyonu gereksinimleri gibi özellikleri bakımından farklılık gösterirler. Maxacal ve Savinase gibi yüksek alkali pH'da aktivite gösterebilen enzimler bulunmakla birlikte, Maxatase, Alcalase ve Subtilisin Novo gibi proteazlar daha düşük alkali pH'da çalışmaktadırlar. Bu enzimlerin tümünün moleküler ağırlıkları 20.000-30.000 Da arasındadır ve aktif merkezlerinde bir serin rezidüsü bulunmaktadır [Aehle, 2007].

### **2.7.2. Süt Ürünleri Endüstrisi**

Süt ürünleri fermentasyon türevli gıdaların klasik örnekleri arasındadır ve geçmişi çok gerilere dayanmaktadır. Çağlar boyunca oldukça çeşitli süt ürünleri geliştirilmiş, 1900'lü yılların ikinci yarısından itibaren biyokimyasal, mikrobiyolojik ve fizikokimyasal süreçler üzerindeki anlayış derinleştirilmiştir. Ham maddelerden, mikrobiyal kültürlerden veya başka kaynaklardan elde edilen enzimler kullanılarak

süt ürünlerinin tadı ve dokusu kontrol edilebilmekte, mevcut ürünler geliştirilmekte ve yeni süt ürünleri yaratılmaktadır.

Peynir üretiminin ilk aşaması olan sütün kesilmesi sürecinde koagüle edici enzimlerin (kısaca koagülan) aktivitesi sonucu süt proteinlerinin yaklaşık % 80'ini oluşturan kazeinler koloidal stabilitelerini kaybetmekte, kümeleşerek bir jel yapısı oluşturmaktadır. Sütün kesilmesini sağlayan bu koagülanların tümü proteolitik enzimlerdir ve aspartik endoproteazlar sınıfına girmektedir (Tablo 2.1) [Aehle, 2007].

Tablo 2.1: Süt ürünleri endüstrisinde kullanılan koagülanlar.

Koagülan	Kaynak	Moleküler Ağırlık (kDa)	Optimum Çalışma Sıcaklığı (°C)
Kimozin	Sığır	35,7	40-44
Mukorpepsin	<i>R.miehei</i>	38	58-62
Mukorpepsin	<i>R. pussilus</i>	30-39	42-45
Endotiyapepsin	<i>C. parasitica</i>	33,8	42

Koagülanlar benzer büyüklük ve üç boyutlu yapılara sahiptir ve korunmuş bölgeler içermektedir. Mikrobiyal koagülanlar arasındaki aminoasit homolojisi oldukça yüksek olup, bunlarla memeli koagülanları arasında büyük oranda farklılık bulunmaktadır. Hayvan rennetinden elde edilen kimozin ve pepsin inaktif zimojen formunda salınmaktayken, mikrobiyal enzimlerde böyle bir durum söz konusu değildir.

Kimozin peynir sütünün doğal pH'sında, K-kazeindeki 105 ve 106. aminoasitler olan Phe-Met arasındaki bağı kesmektedir ve bu yüksek özgüllüğü sayesinde diğer koagülanlar arasından sıyrılmaktadır. K-kazeinin 104 ve 105. aminoasitleri arasından kesim gerçekleştiren *C. parasitica* koagülanı haricinde tüm koagülanlar Phe-Met arasındaki peptid bağına hidroliz etmektedir. Genel olarak mikrobiyal koagülanlar hayvansal koagülanlara oranla daha yüksek proteolitik aktivite sergilemektedir.

Koagülanların sahip olması beklenen bir diğer önemli özellik sıcaklık kararlılığıdır. Örneğin Emmental peynirinin üretimi, peynirdeki koagülanların tümünün inaktive edilmesi amacıyla 50 °C'ta pişirme aşamasını kapsamaktadır. Bu peynirin üretiminde düşük sıcaklık kararlılığına sahip enzimler tercih edilmektedir. Tüm koagülanların sıcaklık kararlılığı azalan pH değerleri karşısında artmaktadır.

Proteazların süt ürünleri endüstrisinde yeni sayılabilecek bir diğer uygulama alanı da protein hidrolizatlarının hazırlanmasıdır. Süt proteini hidrolizatları sporcu destek gıdaları, ocuk besinleri ve diyet gıdaların üretiminde kullanılmaktadır. Kazeinler ve peynir altı suyu proteinlerinin hidrolizi sonucunda, bunların moleküler boyut ve Şekil, elektrokimyasal özellikler ve hidrofobisite gibi fizikokimyasal nitelikleri deęiŐmekte, bunun sonucunda ise allerjenite düŐmekte, tat çoğu zaman acılığa varan seviyelere kadar değişmektedir. Tüm bu nitelikler protein hidrolizinin derecesi ile kontrol edilmekte, kullanılan proteolitik enzimin tipi ve süreç Şartları da hidrolizin seviyesinin ayarlanmasında etkili olmaktadır.

Belirli özelliklere sahip endo- ve ekzoproteazlar kullanılarak hidrolizin derecesi, serbest aminoasit konsantrasyonu, peptit boyutu ve acılık oluşumunun önlenmesi istendiğinde ise tat kontrol edilebilmektedir.

Bu alanda sayısız hayvansal (pankreatik pepsin, tripsin) ve bitkisel proteazlar (papain, bromelain) kullanıldığı gibi, mikrobiyal kaynaklı (*B. subtilis*, *B. licheniformis*) endüstriyel proteazlar da kullanılmaktadır [Aehle, 2007].

### 2.7.3. Unlu Mamullerin retimi

Unlu mamullerin üretiminde kullanılan proteazlar, seçilen proteaza ve kullanıma bağlı olarak, hamurun gevŐeklięini artırmak gibi minör deęiŐikliklere neden olabilirler veya gluten yapısını yoğun biçimde hidroliz ederek hamurun viskoelastik özelliklerinin azalmasını sağlayabilirler. Bazı proteazlar hamurun fiziksel ve reolojik özellikleri üzerindeki etkilerinden bağımsız olarak, elde edilen unlu mamln tadı ve rengini de deęiŐtirebilmektedir.

Buğday unu su ile karıŐtırıldıęında viskoelastik gluten matriks oluŐurmaktadır. Bu matriks, içerisinde hava kabarcıklarını alıkoymakta, bu da buğday ununa spesifik fırınlanma performansını kazandırmaktadır. Bununla birlikte buğday unu içerisindeki protein miktarı ve kalitesi, buğday ununun temel kalite unsurlarıdır. Fırıncılıkta proteaz kullanımı ile buğday ununun protein içeriği istenilen seviyelere getirilebilmekte ve bu sayede hamurun gluten içeriği değiştirilerek oluşan son ürünün hacmi ve yapısı istenilen düzeye çekilebilmektedir. Benzer Şekilde, kraker, bisküvi, gofret ve pizza üretiminde daha az protein içeriğine sahip olan düşük viskoelastik

özelliikte hamura gereksinim duyulduğundan, düşük özgülükte proteazlar kullanılarak hamurun protein içeriği azaltılmaktadır.

Proteazların ekmek üretiminde kullanımı ürünün tadı ve kabuk rengini etkileyebilmektedir. Proteolitik aktivite sonucu ortaya çıkan aminoasitler ve peptitler söz konusu etkilere neden olabilmektedir. Aminoasitler aromatik bileşenlerin üretiminde ara ürün olarak ortaya çıkmaktadır ve peptitler de oksitleyici, tat zenginleştirici ve tatlandırıcı potansiyeline sahiptir. Ayrıca gluten proteinlerinin parçalanması ile ortaya çıkan aminoasitler, Maillard tepkimesi ile şekerler ile reaksiyona girerek ekmeğin lezzetine ve kabuk rengine katkıda bulunabilmektedirler [Aehle, 2007].

#### **2.7.4. Deri Endüstrisi**

Deri işlemede kullanılagelen klasik yöntemler hidrojen sülfid gibi kimyasalların kullanımını gerektirdiğinden çevre kirliliği oluşmakta, bunun yanı sıra çeşitli güvenlik sorunları da ortaya çıkmaktadır. Enzimler aracılığıyla deriye biyolojik olarak muamele edilmesi, kontrol, sürat ve atık giderimi gibi alanlarda avantajlar sunduğundan tercih edilmektedir. Elastolitik ve keratinolitik aktiviteye sahip alkalin proteazlar deri işlemede kullanılan enzimlerdir. Temiz post elde edilmesi sürecinde enzimler istenmeyen pigmentlerin giderimini sağlamakta ve bu sayede deri yüzeyi genişletilmektedir. Dericilikte ıslatma basamağında pankreatik proteazların kullanımı geleneksel bir yöntemdir; alkalin proteazların bu aşamada kullanımı yaygın hale gelmiştir. Alkali koşullarda kıl köklerinin kabartılmasını içeren kıl giderimi sürecinde, alkalin proteazlardan faydalanılarak açığa çıkmış olan kıl folikül proteinini giderilmekte böylece deri üzerindeki kıllardan arındırılmaktadır [Gupta et al., 2002], [Anwar and Saleemuddin, 1998].

Deri endüstrisinde ıslatma aşamasındaki bilinen kullanımlarının yanı sıra, proteazların ayrıca kireçleme ve kıl giderimi aşamalarında da kullanımı önerilmektedir. Bu alana uygulanabilecek enzimlerin 25 ve 35 °C arasındaki sıcaklıklarda yüksek aktiviteye sahip olması tercih edilmektedir [Lageiro, 2007].

### 2.7.5. Hayvan Yemi Üretimi

Proteazların kullanıldığı bir başka alan hayvan yemi endüstrisidir. Tahıllardan sonra proteinler hayvan yemlerinin en önemli bileşenini oluşturmaktadır. Proteazlar diğer enzimlerle birlikte hayvan yemlerine eklenir ve yem içerisindeki soya fasülyesi gibi protein kaynaklarıyla birlikte bulunan lektin ve proteaz inhibitörleri gibi anti-nütrisyonel faktörlerin etkisinin önüne geçmekte kullanılır. Anti-nütrisyonel faktörlerin besinlerin sindirimini zorlaştırdığı ve fizyolojik hasara yol açabildiği bilinmektedir. Ayrıca proteazlar yem içeriğindeki proteinleri daha küçük parçalara ayırmakta ve sindirimi kolaylaştırmaktadır [Aehle, 2007].

### 2.7.6. Diğer Kullanım Alanları

Proteazlar protein bazlı atıkları çözdüklerinden dolayı atığın biyolojik oksijen ihtiyacını azaltmaktadırlar. Son yıllarda çeşitli gıda işleme endüstrisi atıkları ve evsel atıkların gideriminde alkalen proteazlardan yararlanılmaktadır. *Bacillus subtilis* alkalen proteazından kanatlı mezbahalarında ortaya çıkan ve büyük kısmını tüylerin oluşturduğu yüksek protein içeren atıklardan gıda ve yem sanayisi için protein geri kazanımında faydalanıldığı bilinmektedir.

Alkalen proteazlar, kullanılmış röntgen filmi ve fotoğraf filmlerinden gümüş geri kazanımında önemli işleve sahiptir. Filmler içerdikleri jelatin tabakasında kendi ağırlıklarının % 1,5-2'si kadar gümüş barındırırlar; filmler geri dönüştürüldüğü takdirde sahip oldukları gümüş çeşitli alanlarda kullanım için önemli bir kaynak teşkil eder. Filmlerden gümüş geri kazanımında klasik yöntem atık filmlerin yakılmasıdır, ancak bu yöntem çevre kirliliğine sebep olmakta, dahası, polyesterden imal edilen tutucu film geri kazanılamamaktadır. Söz konusu gümüş filmlere jelatin ile bağlandığından dolayı, proteolitik aktivite ile gümüş protein tabakadan ayrılabilir. Jelatinin enzimatik hidrolizi yalnızca gümüş kazanımını sağlamamakta, tutucu film tabakasının da geri dönüşümünü mümkün kılmaktadır [Gupta et al., 2002].



## 3. MİKROBİYAL ÜRETİM YÖNTEMLERİ

### 3.1. Mikrobiyal Beslenme

Hücre büyümesi ve çoğalmasında zorunlu olan hücre bileşenlerinin biosentezi için çeşitli besin ve enerji kaynakları gerekmektedir. Mikroorganizmalar ihtiyaç duydukları özgül enerji, elektron/hidrojen ve karbon kaynakları baz alınarak çeşitli sınıflara ayrılabilir (Tablo 3.1) [Waites et al., 2001].

Tablo 3.1: Mikroorganizmaların besinsel ihtiyaçlarına göre sınıflandırılması.

Fizyolojik tip	Enerji Kaynağı	Elektron Kaynağı	Karbon Kaynağı
Kemotrof	Kimyasal		
Fototrof	Işık		
Organotrof		Organik bileşikler	
Litotrof		İnorganik moleküller	
Ototrof			CO <sub>2</sub>
Heterotrof			Organik bileşikler
Kemoorganotrof	Organik bileşikler	Organik bileşikler	Organik bileşikler
Kemolitotrof		İnorganik moleküller	CO <sub>2</sub>
Fotolitotrof	Işık	İnorganik moleküller	CO <sub>2</sub>
Fotoorganotrof	Işık	Organik bileşikler	Organik bileşikler

Mikroorganizmalar çeşitli kimyasal elementler varlığında besinsel ihtiyaçlarını karşılayabilmektedir. Makronütrientler olarak bilinen karbon, hidrojen, oksijen ve azotun besin yerinde litre başına gram miktarında bulunması gerekmektedir. Fosfor ve kükürt ile birlikte bu elementler, lipidler, nükleik asitler, polisakkaritler ve proteinler gibi temel hücre polimerlerinin başlıca bileşenlerini oluşturur (Tablo 3.2) [Waites et al., 2001]. Kalsiyum, demir, potasyum ve magnezyum gibi minör elementler ile kobalt, bakır, mangan, molibden, nikel, selenyum ve çinko gibi eser elementler hücre büyümesi için gereklidir [Waites et al., 2001].

Tablo 3.2: Tipik bir mikroorganizmanın bileşenleri.

Su	% 70-80
Protein	% 15-18
Polisakkarit	% 1-3
Lipid	% 1-2
Nükleik Asitler	% 3-7

### 3.1.1. Makronütrientler

CO<sub>2</sub>'in kullanıldığı ototrofik fermentasyonlardan endüstride nadiren faydalanılmakta, hemen tüm endüstriyel fermentasyon süreçleri heterotrofik mikroorganizmalar ile gerçekleştirilmektedir. Heterotrofik fermentasyonlarda karbon kaynakları biyosentezin karbon “omurgası”nı oluşturmakta ve büyük oranda enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bundan dolayı fermentasyon ortamında litre başına 10-20 g ve daha üzerinde konsantrasyonlarda karbona ihtiyaç duyulmaktadır. Genel olarak şekerler uygun karbon ve enerji kaynaklarıdır.

Mikroorganizmalar hidrojen ve oksijen ihtiyaçlarını su ve organik bileşiklerden karşılayabilmektedir. Bununla beraber pek çok organizmanın aerobik solunumda son elektron alıcısı olarak moleküler oksijene gereksinim duyduğu bilinmektedir.

Mikroorganizmaların yaklaşık % 15'ini oluşturan azot, yapısal ve işlevsel proteinler ile nükleik asitlerin yapısına katılmaktadır. Azot ihtiyacının giderilmesi için besi yerinde litre başına 1-2 g azot kaynağı bulunması gerekmektedir. Azot kaynağı olarak amonyum tuzları sıklıkla kullanıldığı gibi, nitrat, amino asitler ve üre gibi azot yönünden zengin bileşikler de tercih edilmektedir. Ayrıca *Azotobacter* ve *Rhizobium* türlerinin moleküler azotu kullanabildiği bilinmektedir [Waites et al., 2001].

### 3.1.2. Minör Elementler

Fosfor çoğunlukla pH tamponu olarak inorganik fosfat iyonları şeklinde fermentasyon ortamına eklenmektedir. Bu element nükleik asitlerin, karbon metabolizması ara ürünlerinin ve enerji transdüksiyonunda işlevsel olan ATP ve NADP gibi bileşiklerin sentezi için gereklidir. Besi yerindeki fosfor konsantrasyonu 100 mg/l'yi aşmamalıdır. Mikroorganizmaların ihtiyaç duyduğu bir başka minör

element olan kükürt ise sistein ve metiyonin gibi kükürt içeren amino asitler ile bazı vitaminlerin üretiminde kullanılır. Fermentasyon ortamına inorganik sülfat veya kükürt tuzları halinde ve 20-30 mg/l konsantrasyonlarında eklenmektedir.

Kalsiyum, demir, potasyum ve magnezyum gibi diğer minör elementler 10-20 mg/l konsantrasyonlarında besi yerinde bulunmalıdır. Bir takım minör elementler özgül enzimatik aktivite için gereklidir. Örneğin demir, sitokromlar gibi bazı oksidaz-redüktazlar için, potasyum protein sentezinde görevli enzimler için işlevseldir. Kimi minör elementlerin ayrıca yapısal rolleri bulunmaktadır: magnezyum iyonları ribozomların stabilizasyonunda rol oynarken, bazı minör elementler hücre duvarı ve zarının bütünlüğünün korunmasında işlevseldir [Waites et al., 2001].

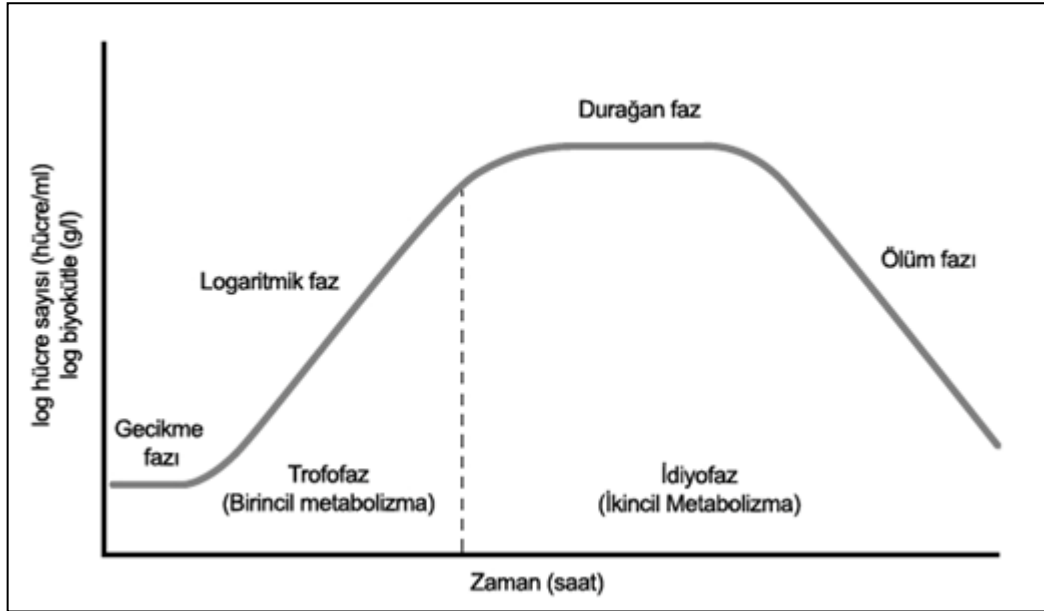
### **3.1.3. İz Elementler**

Kobalt, bakır, mangan, molibden, nikel, selenyum ve çinko iz elementler olarak adlandırılmakta ve besi yerinde genellikle 0,1-1 mg/l gibi çok düşük konsantrasyonlarda bulundurulmaktadır. Bazı enzimlerin üretimi söz konusu olduğunda bundan daha düşük oranlarda kullanımları gerekmektedir.

Mikroorganizmaların besinsel ihtiyaçları çeşitlilik gösterebilmektedir. Çoğu bakteri düşük miktarda karbon ve enerji kaynakları ile temel mineral elementleri içeren bir besi yerinde büyüebilmektedir. Böyle minimal besiyerlerinde gelişebilen mikroorganizmalar prototrof olarak adlandırılmaktadır. Ancak bu sınıfın dışında kalan mikroorganizmaların özgül ihtiyaçları bulunmaktadır. Amino asitler ve vitaminler gibi ek organik maddelerin yokluğunda büyüme göstermeyen bu tip mikroorganizmalar oksotroflar olarak sınıflandırılmaktadır. Çoğu organotrofik canlı büyüme için B vitaminleri gibi çeşitli vitaminlere ve büyüme faktörlerine gereksinim duymaktadır. Daha az sayıda mikroorganizmanın ise hücre büyümesi için yağda çözünen vitaminlere (A, D, E ve K) ihtiyaç duyduğu bilinmektedir [Waites et al., 2001].

### 3.2. Mikrobiyal Büyüme

Fermentasyon sırasında mikroorganizma popülasyonu, gecikme fazı, logaritmik faz, durağan faz ve ölüm fazı gibi çeşitli büyüme fazları geçirmektedir (Şekil 3.1) [Waites et al., 2001]. Gecikme fazında hemen hiç büyüme gerçekleşmediği ve mikrobiyal popülasyonun sabit kaldığı kabul edilmektedir. Bu faz boyunca yoğun metabolik aktivite söz konusudur ve mikroorganizma içinde bulunduğu yeni çevreye adapte olmaya çalışmaktadır. Hücreler taze besi yeri içerisine aşılandıklarında enzim, vitamin, kofaktör vb. eksikliği duymakta ve hücre bölünmesinden önce bu eksikliklerini gidererek ortamda mevcut bulunan besin maddelerini kullanmaktadır. Fermentasyon ortamının kimyasal bileşimi gecikme fazının uzunluğunu etkilemektedir. Fermentasyonda kullanılan besi yeri, ön kültür hazırlanmasında kullanılan besi yerindeki farklı bir karbon kaynağı içeriyorsa, mikroorganizmalar bu yeni substratı metabolize etmek için farklı enzimler sentezlemek zorunda kalacaklarından dolayı gecikme fazı uzayabilmektedir. Osmotik basınç, ön kültürün toplanma zamanı, konsantrasyonu, morfolojisi gibi fiziksel koşullar gecikme fazının süresini etkileyen diğer faktörler arasındadır.



Şekil 3.1: Mikrobiyal büyüme fazları.

Hücreler içinde buldukları yeni çevreye adapte olduklarında, sunulan fermentasyon koşullarında maksimum özgül büyüme hızına ulaşana dek artan

frekansta bölünerek çoğalmaktadır. Bu noktada logaritmik faz başlamıştır ve hücre sayısı/biyokütle sabit hızla yükselmektedir.

Besi yerinde bulunan sınırlayıcı besin maddelerinin tümü metabolize edildiğinde hücre büyümesi yavaşlamaya başlar. Bir süre sonra büyüme artık sürdürülemez duruma gelir ve hücreler durağan faza girer. Bu fazda hücre büyüme hızı sıfırdır ve toplam hücre sayısı/biyoküttele bir değişiklik gözlenmez (hücre bölünme hızının hücre ölüm hızına eşit olduğu kabul edilir). Ancak mikroorganizmalar metabolik olarak aktif bulunmakta ve hücre içi depo maddeleri ile lizize uğramış hücrelerden salınan besin maddelerini metabolize etmektedir. Bu aşamada kimi zaman sekonder metabolit sentezi gerçekleşmektedir. Durağan fazın uzunluğu mikroorganizmaya ve çevresel şartlara bağlıdır. Sporlanmayan hücreler için bundan sonra ölüm fazı başlamaktadır. Bu fazda hücreler sabit bir hızla ölerik sıklıkla lizize uğramaktadır [Waites et al., 2001].

### **3.2.1. Çevresel Şartların Hücre Büyümesine Etkileri**

Mikroorganizmaların büyüme ve gelişmesi, içerisinde buldukları ortamın kimyasal ve fiziksel şartlarından büyük ölçüde etkilenmektedir. Bununla birlikte mikroorganizmalar pek çok farklı çevreye uyum sağlayacak şekilde evrimleşmiştir.

- **Sıcaklığın Hücre Büyümesine Etkileri**

Sıcaklığın artması kimyasal tepkimeleri hızlandırıcı etki göstermektedir. Sıcaklıktaki her 10 °C'lık artış reaksiyon hızını iki katına çıkarmaktadır. Bundan dolayı sıcaklık arttıkça hücre büyümesi hızlanmaktadır. Ancak proteinler, nükleik asitler ve lipidler gibi makromoleküllerin denatüre olarak işlevlerini yitirdikleri sıcaklık değerleri bulunmaktadır. Ayrıca lipid membranın akışkanlığını kaybederek fonksiyonsuzlaştığı sıcaklık değerlerinde hücre büyümesi durmaktadır.

Her organizmanın bir optimal büyüme sıcaklığı bulunmaktadır ve farklı mikroorganizma grupları çeşitli sıcaklık aralıklarında gelişim göstermektedir. Stenotermal olarak adlandırılan tipik bir mikroorganizma 30 °C'ın üzerindeki sıcaklıklarda büyürken, öritermal organizmalar daha yüksek sıcaklıklarda gelişebilmektedir.

Mezofilik mikroorganizmalar için optimal büyüme sıcaklığı 20-45 °C ve minimum büyüme sıcaklığı 15-20 °C arasındadır. Psikrofilikler için optimum büyüme sıcaklıkları 15 °C'ın altındaki değerlerdir ve bu organizmalar oda sıcaklığında yaşayamamaktadır. Psikrofilik canlılar membranlarında büyük oranda doymamış yağ asitleri içerdiklerinden dolayı düşük sıcaklıklarda işlevseldir. Optimal büyüme sıcaklığı 50 °C'ın üzerinde olan organizmalar termofil olarak sınıflandırılmaktadır.

Termofil olmayan bir mikroorganizmanın yüksek sıcaklıklara maruz bırakılması; sitoplazmik zar da hasar oluşmasına, ribozomların işlevsizleşmesine, enzimlerin geri dönüşümsüz olarak denatürlenmesine ve DNA ipliğinin kırılmasına neden olmaktadır. Yüksek sıcaklık sebebiyle oluşan hücre hasarları hücre büyüme hızını düşürerek inhibisyona ve hücre ölümüne yol açmaktadır. Sıcaklık tolerans mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamakla birlikte termofilik mikroorganizmaların ribozomlarının yüksek sıcaklıklarda etkin biçimde çalıştığı ve hücre membranlarının bozulmadığı bilinmektedir [Waites et al., 2001].

- pH'nın Hücre Büyümesine Etkileri

Her mikroorganizmanın gelişebildiği optimal pH değeri ve pH aralıkları bulunmaktadır. Genellikle funguslar bakterilerden daha düşük pH değerlerinde (pH 4-6) gelişmektedir. Asidofiller 1-5,5 arasında pH optimumlarına sahiptir. Mikroorganizmaların büyük çoğunluğunu, pH 5-9 aralığında gelişebilen nötrofiller oluşturmaktadır. *Bacillus* ve *Micrococcus* türleri gibi alkalofiller 8,5-11,5 aralığında pH optimaline sahiptir [Waites et al., 2001].

- Çözünmüş Maddeler ve Suyun Hücre Büyümesine Etkileri

Mikroorganizmalar metabolik aktivite için belirli bir oranda serbest suya gereksinim duymaktadır ve pek çok mikroorganizmanın yaklaşık % 70-80'ini su oluşturmaktadır. Hücre duvarı taşıyan mikrobiyal hücreler hipotonik çözeltiler içerisine konulduklarında su alarak turbid hale gelirlerken, hücre duvarı bulunmayan hücreler şişerek patlar. Kuru ve hipertonik ortamlarda suyun hücre içine alınması ve korunması zordur. Hipertonik bir çevrede büyük oranda su bulunmakla birlikte bu su hücreler için kullanılabilir değildir. Hücre dışında yüksek oranda şeker ve tuz gibi

çözünmüş madde bulunan hipertonic ortamlarda su hücre dışına çıkma eğilimindedir ve bundan dolayı hücre büyümesi aksamaktadır.

Bir mikroorganizma için ortamda bulunan elverişli su oranını belirtmek için su aktivitesi ( $A_w$ ) terimi kullanılmaktadır. Su aktivitesi, mikroorganizmayı çevreleyen çözelti içerisindeki suyun buhar basıncının saf suyun buhar basıncına olan oranıdır.

Mikroorganizmalar kuru ortamlara ve yüksek ozmotik basınca olan toleranslarına göre sınıflandırılabilir. Bir kaç istisna haricinde çoğu bakteri 0,9  $A_w$  altındaki değerlerde gelişmemektedir. Funguslar genellikle düşük nem seviyelerinde ( $A_w=0,7$ ) büyüebilmektedir ve bu canlılar kserotolerant olarak adlandırılmaktadır. Bundan başka, gerçek kserotolerant filamentöz funguslar ve ozmofilik mayalar 0,6  $A_w$  gibi çok düşük değerlerde yaşayabilmektedir. Çok yüksek tuz konsantrasyonlarında ( $A_w=0,98$ ) gelişim gösteren canlılar halofiller olarak bilinir ve bu canlıların hücre duvarları farklı tipte membran lipidleri içermektedir (Waites et al., 2001).

- Oksijenin Hücre Büyümesine Etkileri

Mikroorganizmalar oksijen ihtiyaçlarına göre beş ana sınıfa ayrılmaktadır. Obligat aeroblar yalnızca oksijen varlığında gelişebilmektedir. Bu canlılar için oksijen, oksijenli solunumda son elektron alıcısı olarak işlevseldir. Fakültatif anaeroblar oksijen varlığında ve yokluğunda büyüebilmekle birlikte, ortamda oksijen bulunduğunda daha etkin hücre büyümesi sergilemektedir. Bir diğer grup olan mikroaerofiller belirli maddelerin sentezi için az miktarda oksijene ihtiyaç duymaktadır. Ancak bu canlılar normal atmosferik oksijen konsantrasyonlarında büyümemektedir. Aerotolerant anaeroblar oksijen varlığını tolere ederek gelişebilen mikroorganizmaları içermektedir. Diğer bir sınıf olan obligat anaerob canlılar ise oksijeni tolere edemeyerek, varlığında ölmektedir [Waites et al., 2001].

### 3.3. Fermentasyon Ortamı

Endüstriyel mikrobiyolojide pek çok fermentasyon süreci besi yeri adı verilen sıvı ortamlarda gerçekleştirilmektedir. Fermentasyon ortamı kullanılan mikroorganizmanın tüm besinsel ihtiyaçları ile sürecin teknik gereksinimlerini karşılamalıdır. Besi yeri formülasyonu hedeflenen ürünün elde edilmesini destekler

nitelikte olmalıdır. Endüstriyel fermentasyonların çeşitli aşamalarında besiyerlerine gereksinim duyulmaktadır. Bunlar arasında ön kültür hazırlanması, pilot ölçekte üretim çalışmaları ve büyük ölçekli üretim çalışmaları bulunmaktadır. Ön kültür ve fermentasyon aşamalarının gereksinimleri birbirinden farklı olduğundan dolayı bu basamaklarda kullanılan besiyerleri sıklıkla farklı içeriğe sahiptir

Genel olarak bir besi yeri, hemen tüm endüstriyel fermentasyonlarda enerji ve biyosentez için gerekli karbon elementlerini sunan bir karbon kaynağı ile azot kaynakları, fosfor ve kükürt kaynaklarını içerir. Diğer ikincil ve eser elementler fermentasyon ortamında olması gereken bileşenlerdir. Bununla birlikte bazı mikroorganizmaların biotin ve riboflavin gibi vitaminlerin varlığına gereksinim duydukları bilinmektedir. Aerobik fermentasyonlarda ortama devamlı moleküler oksijen girişi gerektiği gibi, bazı anaerobik fermentasyonlar için de başlangıç havalandırma oranı önemli bir parametredir. Fermentasyon ortamının pH'sının kontrol edilmesi amacıyla besi yeri içeriğine çeşitli tamponlar eklenmektedir. Fermentör ölçeğinde gerçekleştirilen çalışmalarda köpük oluşumunun önüne geçilmesi amacıyla köpük kırıcı ajanların kullanımı da söz konusudur [Waites et al., 2001].

### **3.4. Fermentasyon Koşullarının Optimizasyonu**

Fermentasyon veriminin artırılması amacıyla, hedeflenen mikrobiyal ürünün (biyokütle veya metabolit) elde edilmesinde etkili olan büyüme parametreleri belirlenebilmektedir.

Çeşitli besi yeri bileşenleri ile bunların farklı konsantrasyonları, farklı pH, sıcaklık değerleri gibi değişen koşullar altında gerçekleştirilen bir dizi deney sonucunda optimal büyüme/üretim şartları aydınlatılabilmektedir. Fermentasyonda kullanılan mikroorganizmanın maksimum özgül büyüme hızının belirlenmesi, özellikle birincil metabolitlerin üretimi söz konusu olduğunda ayrıca önem taşımaktadır; birincil metabolitlerin sentezlenmesi büyüme ile doğrudan ilişkilidir [Waites et al., 2001].

Endüstriyel fermentasyon süreçlerinde kullanılan fermentasyon ortamı ve koşulları, hedeflenen son ürünün üretimi, konsantrasyonu ve verimini etkileyen son derece kritik faktörlerdir. Fermentasyon ortamı ve süreç koşullarının optimizasyonu



fermentasyondan elde edilecek kazancın en yüksek seviyeye çıkarılmasında önemlidir.

Optimizasyon çalışmaları zahmetli, pahalı, açık uçlu ve zaman alıcı bir çok deney içermektedir. Fermentasyon ürününün en üst seviyede üretildiği fizyolojik şartların belirlenmesi için gerçekleştirilen çalışmalar arasında, fermentasyon koşullarının çeşitli kombinasyonlarının denenmesi ve sürecin içerdiği basamakların farklı bir sırayla takip edilmesi bulunmaktadır [Panda et al., 2007].

### **3.4.1. Açık ve Kapalı Uçlu Optimizasyon Sistemleri**

Sabit sayı ve tipte parametrenin analiz edildiği kapalı uçlu sistemler en basit optimizasyon stratejisi ile işlemektedir. Bu sistemler ile çalışıldığında fermentasyona katkısı olabilecek çok sayıda farklı bileşen/parametre gözden kaçabilmektedir. Buna karşın açık uçlu optimizasyon sistemlerinde istenilen sayı ve tipte fermentasyon değişkeninin incelenmesi mümkündür ve süreç için en iyi bileşen/parametreler belirlenebilmektedir. Bir optimizasyon çalışmasında uygulanabilecek ideal yöntem, başlangıçta açık uçlu bir optimizasyon sistemi kullanılarak en uygun parametlerin belirlenmesi ve ardından kapalı uçlu bir sistem ile devam edilmesidir [Panda et al., 2007].

### **3.4.2. Fermentasyon Ortamı ve Koşullarının Optimizasyonunda Kullanılan Yöntemler**

- **Bileşen Değiştirme**

Açık uçlu bir sistem olan bileşen değiştirmede yalnızca tek tipte bileşenlerin etkinliklerinin karşılaştırılması mümkündür. Bu yöntemde fermentasyon ortamının bir bileşeninin yenisi ile ancak aynı oranda kullanılarak değiştirilmesi söz konusudur. Ancak farklı bileşenlerin etkileşimlerinin gözlemlenebilmesi olası değildir. Bu teknik ile farklı karbon, azot kaynakları ve diğer besi yeri bileşenlerinin fermentasyona olan etkileri irdelenebilmektedir [Panda et al., 2007].

- **Biyolojik Taklit**

Biyolojik taklit kapalı uçlu bir optimizasyon yöntemidir. Çeşitli parametrelerin optimize edilebildiği bu teknik, fermentasyonda kullanılan mikroorganizmanın

ihtiyaç duyduğu her bileşenin doğru oranda (kütle dengesi stratejisi) kullanılması konseptine dayanmaktadır. Çalışılan besi yeri mikroorganizmaların element bileşimi temelinde optimize edilmektedir. Mikroorganizmaların element bileşiminin belirlenmesinin pahalı ve zaman alıcı bir süreç olması ve farklı fermentasyon parametreleri arasındaki etkileşimin aydınlatılmasının mümkün olmaması bu yöntemi sınırlamaktadır. Bununla birlikte biyolojik taklit yöntemi ile optimal hücre büyümesi için fermentasyon ortamında bulunması gereken mikro ve makro element seviyeleri belirlenebilmektedir [Panda et al., 2007].

- Her Defada Bir Parametrenin Değiştirilmesi

Kapalı uçlu olan bu yöntem ile besi yeri bileşenlerinin yanı sıra fermentasyon koşullarının optimizasyonu da gerçekleştirilebilmektedir. Bu teknikte bir parametrenin farklı değerleri kullanılırken geri kalan tüm değişkenler sabit tutulmaktadır. Sade ve basit olmasının yanında değişkenlerin fermentasyona etkilerinin ayrı ayrı incelenmesinde faydalı olan bu yöntem, son derece zaman alıcı ve pahalı olabilmektedir [Panda et al., 2007].

- Faktöriyel Tasarım

Bir başka kapalı uçlu yöntem olan faktöriyel tasarımda, her parametre iki ya da daha fazla seviyede çeşitlendirilmekte ve ortaya çıkan sonuçlara bakılarak, fermentasyon değişkenleri ile bunların arasındaki etkileşimler etkin biçimde değerlendirilebilmektedir.

Deney sonuçlarının değerlendirilmesinde bir polinom eşitliğinden faydalanılmakta, oluşturulan eşitliğin katsayısı faktörlerin etki ve etkileşimleriyle ilişkilendirilmektedir. Tam faktöriyel tasarımlarda belirlenen değişken seviyelerinin her kombinasyonu denenmektedir. Bu faktörler sıklıkla bakteri soyu, besi yeri bileşenleri, sıcaklık, nem, başlangıç pH'sı ve aşılama miktarıdır. Besi yeri optimizasyonu çalışmalarında genellikle iki faktöriyel tasarımı ( $2^n$ , n=faktör sayısı) kullanılmaktadır. Bu tasarımlardan antagonist ve sinerjist etkiler gibi etkileşimlerin aydınlatılmasında faydalanılmaktadır [Panda et al., 2007].

- Plackett Burman Tasarımı

Plackett Burman tasarımından, bir sistemdeki çeşitli değişkenlerden en etkilisinin belirlenmesinde faydalanılmaktadır. Beş veya daha fazla değişkenin

irdelendiği çalışmalar için uygun bulunmaktadış. Bu yöntem n sayıda değişkenin n+1 sayıda deney ile değerlendirilmesine dayanmaktadır [Panda et al., 2007].

- Merkezi Karma Tasarım

Merkezi karma tasarım (MKT) Box ve Wilson tarafından önerilmiştir. MKTler iki seviyeli faktriyellere bir seri merkezi nokta eklenmesi ile eğimlilik ve etkileşimin belirlenmesi temelinde oluşturulmaktadır.

Kimyasal içeriği belirlenmiş ve kompleks besiyerlerinin optimizasyonunda MKT kullanıldığı bilinmektedir. MKT ile gerçekleştirilen deneyler sonrasında optimizasyona cevap-yüzey yöntemi ile devam edilmesi etkin bir yöntem olarak görülmektedir [Panda et al., 2007].

- Cevap Yüzey Yöntemi

İstatistiksel deney tasarımları az sayıda deney gerçekleştirilerek elde edilen bulguların hızlı ve etkili şekilde değerlendirilmesini sağlayarak süreç maliyetini düşürdüğünden dolayı gcl yöntemlerdir. Cevap yüzey yöntemi (CYY), faktörlerin en yüksek cevabı oluşturduğu seviyelerin belirlenmesini sağlayarak önemli değişkenlerin bulunması ve optimize edilmesine izin vermektedir. Kompozit karma tasarımda olduğu gibi istatistiksel yöntemleri kullanan CYYler, bir cevapla ilintili ampirik modellerin geliştirilmesi amaçlanmakta, fermentasyon sürecinin birbirine bağımlı ya da bağımsız olan değişkenleri arasındaki ilişki matematiksel olarak aydınlatılmaktadır.

Fermentasyon ortamı tasarlanması ve sürecin optimize edilmesi sonu olmayan bir çalışma alanıdır. Her optimizasyon tekniğinin avantaj ve dezavantaları bulunmaktadır. Besi yeri bileşenlerinin ve fermentasyon koşullarının üretime olan etkilerinin irdelenmesinde her defada bir parametrenin değiştirilmesi yöntemini takiben tam faktöriyel ve cevap-yüzey yöntemlerinin uygulanması etkin bir optimizasyon sağlayabilmektedir [Panda et al., 2007].

## 4. PROTEİN SAFLAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

Protein saflaştırma, belirli bir proteinin ortamda bulunan hücresel birimlerden ve diğer proteinlerden ayrılması amacıyla gerçekleştirilen işlemler bütünüdür. Saflaştırma sürecinin amacı; hedef proteinin, ilgilenilen protein kaybedilmeksizin ortamda bulunan diğer proteinlerden ayrılmasıdır.

Proteinler çözünürlük, boyut, iyonik yük ve özgül bağlanma afinitelerine göre birbirlerinden ayrıştırılabilmektedir. Birçok protein içeren karışımlardan istenilen proteinin ayrıştırılması amacıyla, ilgilenilen proteinin farklı özelliklerine dayanan bir seri saflaştırma basamağı takip edilmektedir. Saflaştırmanın her aşamasında elde edilen örnekler istenilen proteine özgü aktivite testine alınır ve protein konsantrasyonu belirlenir [Stryer, 2006].

### 4.1. Çöktürme

Birçok proteinin çözünürlüğü yüksek tuz konsantrasyonlarında azalmakta, çözünürlüğü azalan proteinler ise çökmektedir. Proteinlerin çöktüğü tuz konsantrasyonları birbirinden farklı olduğundan dolayı proteinlerin ayrıştırılmasında bu yöntem kullanılmaktadır. Örneğin 0.8 M amonyum sülfat fibrinojenin, 2.4 M amonyum sülfat serum albüminin çöktürülmesi için yeterli olmaktadır. Ayrıca saflaştırmanın diğer basamaklarında elde edilen fraksiyonlar gibi seyreltik protein çözeltilerinin konsantre edilmesinde de tuzla çöktürmeden faydalanılmaktadır. Gerektiğinde diyaliz ile ortamda bulunan tuz uzaklaştırılabilmektedir.

Çöktürme işleminde en yaygın kullanılan tuz amonyum sülfattır. Amonyum sülfatın diğer tuzlara oranla daha saf halde elde edilmesi ile sudaki çözünürlüğünün diğer tuzlardan daha yüksek olması bu tuzun çöktürme aşamasında tercih edilmesinin başlıca sebebidir.

Çöktürme işlemi için bir diğer yöntem organik çözücülerin kullanılmasıdır. Bu yöntemde proteinlerin hidrofobik bölgeleri etrafındaki su, organik çözücü moleküller ile yer değiştirir ve proteinlerin sudaki çözünürlükleri azalır. Böylece proteinler arasında etkileşim gerçekleşir ve bir araya gelerek çökerler [Stryer, 2006].

## 4.2. Diyaliz

Ortamda kalan tuz biyolojik aktiviteyi etkileyebileceği gibi daha sonraki saflaştırma basamaklarında iyonik değişmelere de neden olabileceğinden, çöktürme işleminin ardından protein çözeltilisinin içindeki tuzun uzaklaştırılması gerekmektedir.

Proteinler, selüloz membran gibi yarı-geçirgen, porlu bir membranın kullanıldığı diyaliz yöntemiyle küçük moleküllerden ayrılabilirler. Por çapından büyük boyuttaki moleküller diyaliz membranının içerisinde kalırken, por çapından küçük moleküller ve iyonlar porlardan geçerek membranı terk ederler. Bu yöntem tuz ve diğer küçük moleküllerin uzaklaştırılmasında faydalı olmakla birlikte proteinlerin birbirinden ayrılması için yeterli değildir [Stryer, 2006].

## 4.3. Kromatografik Yöntemler

Moleküler büyüklük temelinde daha ileri saflaştırma jel filtrasyon kromatografisi (moleküler elek kromatografisi) ile gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemde dekstran, agaroz veya poliakrilamit gibi çözünmez ve yüksek oranda hidratlanmış polimerlerden yapılmış porlu boncuklar içeren kolonlar kullanılmaktadır. Sefadexs, Sefaroz ve biyojel bu amaçla üretilmiş, genellikle 100 µm (0.1 mm) çapında boncuklar içeren ticari kolon preparasyonlarına örnek verilebilir. Küçük moleküller bu boncuklara girebilirken büyük olanlar girememektedir; sonuçta küçük moleküller boncukların içinde ve aralarında bulunurken daha büyük moleküller yalnızca boncukların aralarında kalabilecektir. Büyük moleküller kolon içerisinde daha hızlı hareket ederek kolonu daha önce terk edecektir. Boncukların içerisine girebilecek boyutta küçük moleküller ise daha dolambaçlı bir yol izleyeceklerinden dolayı kolondan daha geç çıkacaktır.

Bir başka kromatografik yöntem olan iyon değişim kromatografisinde proteinlerin net iyonik yüklerinden faydalanılarak saflaştırma gerçekleştirilmektedir. Nötral pH'da pozitif net yüke sahip bir protein karboksilat grupları içeren bir kolonda kolon materyaline tutunurken, negatif yüklü bir protein aynı kolona tutunamayacaktır. Böyle bir kolona bağlanmış pozitif yüklü proteinler yıkama tamponundaki sodyum klorür konsantrasyonunun artırılmasıyla elüe edilebilmektedir; bu durumda sodyum iyonları pozitif yüklü proteinler ile rekabete

girerek kolona bağlanma yoluyla proteinleri kolondan ayırmaktadır. Daha düşük yoğunlukta pozitif net yüke sahip proteinler kolondan erken çıkarken, yük yoğunluğu daha yüksek olanlar kolonu daha geç terk edecektir. Pozitif yüklü proteinler (katyonik proteinler) negatif yüklü karboksimetilselüloz (KM-selüloz) kolon kromatografisi ile birbirlerinden ayrılmaktadır. Negatif yüklü proteinlerin (anyonik proteinler) ayrıştırılmasında ise pozitif yüklü dietilaminoetilselüloz (DEAE-selüloz) kolonlardan faydalanılmaktadır.

Proteinlerin saflaştırılmasında öne çıkan bir başka yöntem afinite kromatografisidir. Bu teknik bir çok proteinin özgül kimyasal gruplara olan yüksek afinitesinden faydalanmaktadır. Örneğin bir bitki proteini olan konkanavalin A, ham özütün glukoz rezidüleri içeren bir kolondan geçirilmesiyle saflaştırılabilmektedir. Konkanavalin A'nın glukozla olan yüksek afinitesi bu proteini kolona bağlarken, bir çok diğer protein kolon materyaliyle bağlantı kurmayacaktır. Kolona konsantre glukoz çözeltisi yüklenmesiyle konkanavalin A kolondan sökülebilmektedir; bu konsantre çözeltide bulunan glukoz, konkanavalin A proteinini kolona bağlı glukoz rezidülerinden ayırır.

Afinite kromatografisinde, X grubuna afinitesi olan bir protein, bu X grubunun ya da bir türevinin kovalent olarak bağlı bulunduğu bir kolonun kullanımıyla etkili biçimde saflaştırılabilir. Bunun için, böyle bir kolona bir protein karışımı yüklendikten sonra, kolona bağlanmayan proteinlerin ortamdaki uzaklaştırılması için uygun bir tamponla kolon yıkanır, daha sonra X grubunun derişik çözeltisinin kullanılması veya afiniteyi düşürücü şartların oluşturulması yoluyla protein elüe edilir. Afinite kromatografisinin etkinliği, saflaştırılmak istenen protein ve bu proteinin afinite gösterdiği molekül arasındaki bağlanmanın özgüllüğü arttıkça yükselir [Stryer, 2006].

## 5. GEREÇ ve YÖNTEM

### 5.1. Gereç

#### 5.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Tablo 5.1: Kullanılan kimyasallar.

Kimyasal Adı	Firma - Katalog No
2-Propanol	Riedel 24137
Akrilamit	Sigma A 8099
Aquazide	Calbiochem
Amonyum persülfat	Biorad 161-0700
Asetik Asit	Riedel 27225
Aseton	Merck 100013
Asetonitril	Carlo Erba 401201
BaCl <sub>2</sub>	Fluka B 0750
Bisakrilamit	Biorad 161-0201
Bradford protein assay	Biorad 500-0006
CaCl <sub>2</sub>	Sigma C-3306
CoCl <sub>2</sub>	Sigma C 2644
Coomassie brilliant blue R-250	Sigma B 7920
CTAB	Sigma H 6269
CuCl <sub>2</sub>	Sigma C-6641
DEAE Sepharose fast flow (Anyon değiştirici rezin)	Amersham Biosciences AB 17-0510-01
Diyaliz membranı	Roth 0653.1
DMSO	Sigma D 5879
DTT	Promega V 3151
EDTA	Sigma E 5134
Etanol	J. T. Baker 8228
Etilen glikol	Sigma 324558

Tablo 5.1: Devam.

FeCl <sub>2</sub>	Merck 372870
FeCl <sub>3</sub>	Merck 803945
FeSO <sub>4</sub>	Sigma F-7002
Filtre kağıdı	3MM Whatman
Gliserol	Riedel 15524
Glisin	Sigma G 7126
HCl	Merck 1.00314
İzoamil alkol	Merck 1.00978.1000
Kazein	Sigma C 5890
KCl	Riedel 12636
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck 1.05101.1000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Riedel 04243
LiCl	Aldrich 213233
L-Tirozin	Sigma T 8566
Maya özütü	Merck 1.03753
Metanol	Merck 106007.2500
MgCl <sub>2</sub>	Merck 105832
MnCl <sub>2</sub>	Merck 105917
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Riedel 04269
NaCl	Merck 1.06400.1000
NaOH	Merck 1.06462.1000
NH <sub>4</sub> Ac	Riedel
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck 1.01216
NiCl <sub>2</sub>	Sigma N 5756
Nutrient broth	Difco 234000
PMSF	Sigma 7626
Protein moleküler ağırlık belirteci	Thermo Scientific 26616
Protein moleküler ağırlık belirteci	Sigma SDS-6H2
SDS	Sigma 5750
Süt tozu	Difco 232100



Tablo 5.1: Devam.

Sephacryl S-100 High Resolution Matrix (Moleküler elek kromatografisi rezini)	Amersham Biosciences AB 17-0584-10
TCA	Anonim
TEMED	Sigma T 7024
Tris baz	Sigma T-1503
Triton X-100	Merck
Tryptic Soy Broth	Becton Dickinson 211825
Tween 80	Sigma P 8074
Maya özütü	Merck 1.03753
ZnCl <sub>2</sub>	Anonim
ZnSO <sub>4</sub>	Anonim
β-Merkaptoetanol	Sigma M-6250

### 5.1.2. Kullanılan Cihazlar

Tablo 5.2: Kullanılan cihazlar.

+ 4 °C Soğutucu	Ariston No-Frost
- 20 °C dondurucu	Ariston No-Frost
- 80 °C dondurucu	Heraeus Instrument
Buz Makinesi	Bar Line BF 85
Çalkalamalı su banyosu	Julabo – SW 21
Çalkalamalı su banyosu	Julabo – MP 13
Etüv	Endmund Bühler – TH 15
Fraksiyon toplayıcı	Biorad 2110
Güç kaynağı	Biorad Power Pack 1000
Hassas terazi	Sartorius – BL 210S
İnkübatör	Edmund Bühler KS-15
Jel kurutucu	E-C Apparatus Corp. EC 355
Jel kurutucu pompası	E-C Apparatus Corp. EC 353
Manyetik karıştırıcı	Heidolph MR 3001

Tablo 5.2: Devam.

Masa üstü santrifüj	Heraeus Sepatech Biofuge 15R
Masa üstü santrifüj	Beckman Coulter Allegra 25R
Mikrosantrifüj	Beckman Microfuge 18
Mikrodalga fırın	Beko – 1550
Orbital karıştırıcı	Biometra WT12
Otoklav	Hirayama Hiclave HVE-50
Mikropipet 2 µl	Gilson Pipetman
Mikropipet 20 µl	Gilson Pipetman
Mikropipet 200 µl	Gilson Pipetman
Mikropipet 1000 µl	Gilson Pipetman
Mikropipet 5000 µl	Gilson Pipetman
pH metre	Inolab pH Level 1
Protein elektroforez sistemi	Biorad Mini Protean II
Soğutuculu yer inkübatörü	Certomat – BS-T
Spektrofotometre	Biorad Smartspec 3000
Steril kabin	Heraeus Herasafe – HS 12
Sterilizatör	Binder – ED115
Su banyosu	Techne TE-10A
Tek kullanımlık steril filtre (0,25 µm)	Schleicher & Schüll10462200
Terazi	Sartorius –BL 3100
Vorteks	IKA – MS 2-Minishaker
Yazıcı	Biorad Econorecorder 1327

## 5.2. Yöntem

### 5.2.1. Biyolojik Materyal

Bu tez çalışmasında biyolojik kaynak olarak kullanılan *Bacillus* sp. P22 yerel izolatu, GYTE (yeni adıyla GTÜ) Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Enzim Moleküler Genetiği Laboratuvarında endüstriyel enzim üreticisi yerel bakteriyel soyların taranarak seçildiği ve tanımlandığı çalışmalar çerçevesinde, Gönen Dağ Iıcasından alınan toprak örneğinden öncelikle alkale proteaz üreticisi olarak seçilmiş, aynı zamanda iyi bir  $\alpha$ -amilaz üreticisi olduğu da belirlenmiştir. P22; adı geçen grup tarafından yapılan klasik tiplendirme çalışmaları kapsamında manuel testler, API ve VITEK kitleri ile gerçekleştirilen çalışmaların her birinde farklı bir tür ile benzeştiği görülmekle birlikte, tekrarlanan testler sonucunda *B. megaterium* olarak önerilmiş; 16S rDNA dizi analizi sonucunda *B. megaterium* ile de benzeşiklik göstermekle birlikte, *B. flexus* ile daha yüksek bir benzerlik oranına sahip olduğu belirlenmiş; gerçekleştirilen diğer moleküler temelli tiplendirme yöntemleri ile kesin bir tür adı verilememiş, ancak yapılan kantitatif DNA-DNA hibritleme çalışmaları sonucunda ne *Bacillus megaterium* ile ne de çalışmaya alınan diğer soylarla hibritlenmediğinden, P22'nin daha önce tanımlanmamış bir soy olabileceği sonucuna varılmış ve söz konusu yerel izolatu, bu aşamada, *Bacillus* sp. P22 olarak adlandırılması seçilmiştir. Farklı referans soylarla DNA-DNA hibritlemesi ve alt tür düzeyinde ayırt ettirici gücü yüksek moleküler temelli analizlerle tiplendirme çalışmalarının sürdürülmesi planlanan ve tanımlanmamış bir soy olarak belirlenmesi durumunda DSMZ Kültür Koleksiyonuna sunulacak olan P22 izolatu, bu tez çalışmasında proteaz üretkenliği ve biyoteknolojik kullanım potansiyeli açısından irdelenmiştir.

## 5.2.2. Enzim Üretim Koşullarının Optimizasyonu

### 5.2.2.1. *Bacillus* sp. P22 Hücrelerinin Büyütülmesi ve Enzim Üretimi için Uygun Besi Yerinin Seçilmesi

*Bacillus* sp. P22'nin farklı besiyerlerindeki büyüme ve alkalen proteaz aktivitesinin gözlenmesi amacıyla, -20 °C'ta saklanmakta olan bakteri stoğunun 100 µl'si 10 ml Luria-Bertani (LB) Broth besiyeri içeren 100 ml'lik steril bir erlene aktarıldı ve 37 °C sıcaklık, 200 rpm çalkalama hızında gece boyu inkübe edilerek ön kültüre alındı. Ertesi gün aşağıda içerikleri tarif edilen besiyerleri kullanılarak 250 ml'lik steril erlenelerde % 1 aşılama oranı, 1/5 havalandırma oranı, 30 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızında büyük kültürler başlatıldı. Kültürlerin hücre büyümesi ve enzim aktivitesi 48-76 saate kadar takip edildi. Kültürlerde enzim aktivitesinin gözlenmediği saatlerde çalışma sonlandırıldı.

- Besiyeri 1

% 0,01 Proteoz pepton, % 0,01 NaCl distile suda çözülerek 250 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 50 ml distile suda çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besiyeri 2

% 1 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, % 0,8 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, % 0,05 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, % 0,002 CaCl<sub>2</sub> distile su içinde çözülerek 291 ml'ye tamamlandı ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlandı. % 20'lik filtre ile sterilize edilmiş glukoz çözeltisinden 9 ml (final konsantrasyonu % 0,6 olacak şekilde) otoklavlama sonrası diğer bileşenler ile karıştırıldı.

- Besiyeri 3 (Luria-Bertani Besiyeri)

% 1 Nutrient Broth, % 0,5 maya özütü, % 0,8 NaCl, % 0,052 Tris distile suda çözülerek 1 litreye tamamlandı, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edildi.

- Besi yeri 4

% 1 jelatin, % 1 Nutrient Broth, % 0,5 maya özütü, % 0,8 NaCl, % 0,052 Tris distile su içerisinde çözülerek 300 ml'ye tamamlandı ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlama sonrası kullanıldı.

- Besi yeri 5

% 0,3 Et özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 1 jelatin distile su içerisinde çözülerek 300 ml'ye tamamlandı ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanarak kullanıldı.

- Besi yeri 6

% 3 Tryptic Soy Broth, % 0,7 NaCl, % 0,036 Tris distile su içerisinde çözülerek 300 ml'ye tamamlandı ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanarak kullanıldı.

- Besi yeri 7

% 0,8 maya özütü, % 0,4 kazein, % 0,42 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,3 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> distile su içerisinde çözülerek 300 ml'ye tamamlandı ve 121 °C'ta 20 dakika sterilize edildi.

- Besi yeri 8

% 0,4 NaNO<sub>3</sub>, % 0,001 CaCl<sub>2</sub>, % 0,05 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, % 0,1 KCl, % 0,05 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,05 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, % 0,001 FeSO<sub>4</sub> 285 ml distile suda çözülerek 121 °C'ta 20 dakika otoklavlandı. Son konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 15 ml % 20'lik steril glukoz çözeltisi otoklavlama sonrası diğer besiyeri bileşenleri ile karıştırılarak kullanıldı.

- Besi yeri 9 (Horikoshi I Besiyeri)

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 285 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 20 dakika sterilize edildi. Final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 15 ml % 20'lik steril glukoz çözeltisi otoklavlama sonrası diğer besiyeri bileşenleri ile karıştırılarak kullanıldı.

- Besi yeri 10 (Horikoshi II Besi yeri)

% 1 nişasta, % 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 300 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilerek kullanıldı.

- Besi yeri 11

% 1 nişasta, % 0,5 Proteoz pepton, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 300 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilerek kullanıldı.

- Besi yeri 12 (% 1 Süt tozu içeren Horikoshi besi yeri)

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O distile suda çözülerek 700 ml'ye tamamlandı. Süt tozu, final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 300 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

Tüm besi yeri pH'ları pH 7 olacak şekilde ayarlandı. Kullanılan on iki besi yeri arasında en yüksek aktivitenin belirlendiği 12 numaralı besi yeri (% 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri) daha ileri optimizasyon çalışmaları için kullanıldı.

### **5.2.2.2. İnkübasyon Koşulları ve Besi Yeri İçeriğinin Optimizasyonu Çalışmaları**

Optimizasyon çalışmalarının bu aşamasında öncelikle alkalen proteaz üretiminin en iyi olduğu inkübasyon koşulları belirlendi. Bu amaçla; çeşitli canlandırma yöntemleri, inkübasyon sıcaklığı, besi yeri pH'sı, çalkalama hızı, havalandırma ve aşılama oranlarının hücre büyümesi ve enzim üretimi üzerine olan etkileri irdelendi. Bundan sonraki adımda ise 12 numaralı besi yeri (% 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri) içeriğine farklı karbon ve azot kaynakları ile metal tuzları eklenerek bu değişkenlerin optimizasyonu sağlandı.

Bundan sonra, daha ileri optimizasyon gerçekleştirilmesi amacıyla, bu aşamaya kadar elde edilen bulgular değerlendirilerek enzim üretimi üzerine artırıcı etkisi olduğu belirlenen bileşenler ile çeşitli ek bileşenler 12 numaralı besi yeri içeriğine katılarak etkinlikleri irdelendi. Bir sonraki basamakta ise enzim üretimi için seçilen

besi yeri bileşenlerinin çeşitli konsantrasyonları denenerek optimizasyon çalışmaları tamamlandı. Pozitif kontrollerde gözlenen aktivite değerleri % 100 kabul edilerek göreceli aktiviteler hesaplandı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda enzim aktivitesine paralel olarak hücre büyüme eğrileri hazırlandı.

- *Bacillus* sp. P22 Hücrelerinin Üretimi

*Bacillus* sp. P22 soyunun - 20 °C ve - 80 °C'ta korunan stokları bir ve iki aşamalı sıvı ön kültürlerle alınarak enzim üretimi için elverişli canlandırma yöntemi araştırıldı. 2 ml LB besi yerinin 20 µl bakteri stoğu ile aşılansak 37 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızında gece boyu inkübe edilmesiyle birinci ön kültür hazırlandı. İkinci ön kültür, 100 ml'lik erlenlerde, 10 ml LB besi yerinin birinci ön kültür ile % 1 oranında aşılması ile yine aynı inkübasyon şartlarında hazırlandı.

Ayrıca - 80 °C stoğu doğrudan LB agar besi yeri içeren petriye yayılarak 37 °C sıcaklıkta gece boyu inkübasyona bırakıldı. Katı besi yerinde büyüyen koloniler ön kültür çalışmasında kullanılmak üzere + 4 °C'ta muhafaza edildi. Ön kültür hazırlamak amacıyla koloniler öze yardımıyla LB besi yeri içeren erlenlere aktararak, yukarıda belirtilen şartlarda bir ve iki aşamalı ön kültürler elde edildi. Elde edilen ön kültürler kullanılarak % 1 süt tozlu Horikoshi besi yeri içeren 250 ml erlenlerde, 1/5 havlandırma, % 1 aşılama oranı ile 30 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızında kültürler başlatıldı. Büyük kültürlerdeki hücre büyümesi ve enzim aktivitesi 48 saat boyunca izlendi. En yüksek aktivitenin belirlendiği kültürdeki aktivite değeri % 100 kabul edilerek göreceli aktiviteler hesaplandı. Bununla birlikte elde edilen veriler kullanılarak enzim aktivitesine paralel hücre büyüme eğrisi oluşturuldu.

- Luria Bertani Besi Yeri

- % 1,5 Agar, % 1 Nutrient Broth, % 0,5 maya özütü, % 0,8 NaCl, % 0,052 Tris baz distile suda çözülerek 1 litreye tamamlandı, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edildi.

- İnkübasyon Sıcaklığının Enzim Üretimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Farklı sıcaklık değerlerinin enzim üretimi üzerine etkilerinin incelenmesi amacıyla, % 1 süt tozlu Horikoshi besi yeri içeren 250 ml'lik erlenlerde 1/5 havlandırma, % 1 aşılama oranı ve 200 rpm çalkalama hızında, 30, 37, 45 ve 50 °C

sıcaklıklarda çalışıldı. Kùltürler 48 saat boyunca izlendi, elde edilen bulgular kullanılarak enzim aktivitesi eşliğinde hücre büyüme eğrisi oluşturuldu. Bu çalışmada 30 °C'ta inkübe edilen kùltür pozitif kontrol olarak kullanıldı ve bu kùltürde elde edilen aktivite değeri % 100 kabul edilerek göreceli aktivite hesaplandı.

- Besi Yeri pH'sının Enzim Üretimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

pH 7 ve pH 10 olmak üzere iki ayrı pH değerinde, % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri içeren 250 ml'lik erlenlerde 1/5 havalandırma, % 1 aşılama oranı ile 30 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızında kùltürler başlatıldı. 76 saat boyunca hücre büyümesine paralel olarak alkalen proteaz aktivitesi izlendi ve elde edilen bulgular doğrultusunda enzim aktivitesi eşliğinde hücre büyüme eğrileri hazırlandı.

- Havalandırma Oranı ve Çalkalama Hızının Enzim Üretimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Çeşitli havalandırma oranlarının enzim aktivitesini ne şekilde etkilediğinin değerlendirilmesi için 1/3, 1/5, 1/8 ve 1/10 besi yeri/erlen hacmi oranlarında 250 ml'lik erlenlerde % 1 aşılama oranı ile 30 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızında % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri kullanılarak başlatılan kùltürlerdeki 48 saatlik hücre büyümesi ve alkalen proteaz aktivitesi takip edildi. Pozitif kontrol olarak 1/5 havalandırma oranıyla inkübe edilen kùltür kullanıldı. Edinilen veriler kullanılarak enzim aktivitesine paralel hücre büyüme eğrisi oluşturuldu.

150, 200 ve 250 rpm çalkalama hızları kullanılarak 250 ml'lik erlenlerde % 1 aşılama ve 1/5 havalandırma oranları ile 30 °C sıcaklıkta % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yerinde üç ayrı kùltür başlatılarak farklı değerlerde çalkalama hızlarının hücre büyümesi ve enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlendi. Bu çalışmada 200 rpm çalkalama hızında büyütülen kùltür pozitif kontrol kabul edildi. Elde edilen sonuçlar ışığında 48 saatlik enzim aktivitesi ve hücre büyümesi eğrileri hazırlandı.

- Aşılama Oranının Enzim Üretimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

% 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yerinde % 1, 2, 5, 10 ve 20 aşılama oranlarında beş ayrı kùltür başlatılarak, farklı aşılama yüzdelerinin alkalen proteaz



üretimi üzerine olan etkileri izlendi. Tüm kültürler 30 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızında, 250 ml erlenlerde 1/5 havalandırma oranı kullanılarak inkübe edildi. 48 saat boyunca izlenen kültürlerin enzim aktivitesi ve hücre büyümesi eğrileri hazırlandı.

- Çeşitli Karbon Kaynaklarının Alkalen Proteaz Üretimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Bu çalışma için glukoz, sükroz, laktoz, maltoz, fruktoz, galaktoz, ksiloz, arabinoz, mannitol, gliserol ve nişasta % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yerindeki süt tozunun yerine karbon kaynağı olarak kullanıldı. Bu amaçla, anılan karbon kaynaklarının % 20'lik sulu çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltiler 0,25 µm filtreden geçirilerek sterilize edildikten sonra final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde besiyerlerine eklendi. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri, negatif kontrol olarak ise süt tozu içermeyen Horikoshi besi yeri kullanıldı. 250 ml'lik erlenlerde 1/5 havalandırma, % 1 aşılama oranı ile 30 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızında başlatılan on üç ayrı kültürün hücre büyümesi ve enzim aktivitesi 72 saat süresince izlendi ve edinilen sonuçlar doğrultusunda enzim aktivitesi paralelinde hücre büyüme eğrisi hazırlandı.

- Çeşitli Organik Azot Kaynaklarının Alkalen Proteaz Üretimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Farklı organik azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkilerinin incelenmesi amacıyla, % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri içeriğindeki % 0,5 maya özütü ve % 0.5 Proteoz pepton yerine, % 1 oranında maya özütü, Proteoz pepton, et peptonu, Tryptone, Soytone, N-Z amine A, Et özütü, Jelatin, Üre ve % 0,5 N-Z amine A + % 0,5 maya özütü içeren on ayrı besi yeri kullanıldı. Negatif kontrol olarak % 1 süt tozu, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve % 0,02 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O içeren besi yeri ile pozitif kontrol olarak % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri kullanıldı. Tüm kültürler 250 ml'lik erlenlerde 1/5 havalandırma, % 1 aşılama oranı ile 30 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızında inkübe edilerek 72 saat boyunca hücre büyümesine paralel olarak enzim aktivitesi takip edildi, elde edilen veriler kullanılarak enzim aktivitesi paralelinde hücre büyüme eğrileri hazırlandı.

- Çeşitli İnorganik Azot Kaynaklarının Alkalen Proteaz Üretimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Sodyum nitrat, potasyum nitrat, amonyum sülfat, amonyum klorür, amonyum fosfat, amonyum asetat gibi inorganik azot kaynakları ile glisin ve arjinin gibi amino asitlerin alkalen proteaz aktivitesine etkilerinin araştırılması amacıyla bu azot kaynakları % 1 oranında, % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri içeriğindeki % 0,5 maya özütü ve % 0,5 Proteoz pepton yerine eklenerek büyüme ve aktivite izlendi. Bu çalışmada % 1 süt tozu, % 0,1  $K_2HPO_4$  ve % 0,02  $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$  içeren besi yeri negatif kontrol olarak, % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri ise pozitif kontrol olarak kullanıldı ve başlatılan on ayrı kültür 250 ml'lik erlenlerde 1/5 havalandırma, % 1 aşılama oranı ile 30 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızında inkübe edilerek 72 saatlik hücre büyümesi eşliğinde enzim aktivitesi izlendi. Elde edilen sonuçlar kullanılarak zamana bağlı büyüme eğrisi ve aktivite grafiği hazırlandı.

- Çeşitli Metal Tuzlarının Alkalen Proteaz Üretimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

*Bacillus* sp. P22 alkalen proteazı üretiminin besi yeri içeriğine eklenen metal tuzlarından ne şekilde etkilendiğinin gözlenmesi amacıyla % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yerine, içeriğindeki % 0,02  $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$  yerine yine aynı oranda  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $KCl$ ,  $NaCl$ ,  $CoCl_2$ ,  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ,  $ZnCl_2$ ,  $FeSO_4$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  tuzları eklenerek, 250 ml'lik erlenlerde 1/5 havalandırma, % 1 aşılama oranı ile 30 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızında kültürler başlatıldı, 72 saat boyunca hücre büyümesi ve enzim aktivitesi takip edildi. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri kullanılırken negatif kontrol amacıyla aynı besi yeri tuzsuz olarak kullanıldı. Elde edilen sonuçlar ışığında enzim aktivitesine paralel hücre büyüme eğrileri hazırlandı.

- *Bacillus* sp. P22 Alkalen Proteaz Üretim Besi Yeri Bileşen Kompozisyonunun Belirlenmesi

Besi yerine eklenen çeşitli karbon ve azot kaynakları ile metal tuzlarının *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazı üretimi üzerine etkilerinin irdelendiği çalışmalar sonucunda enzim üretimini olumlu yönde etkilediği belirlenen parametrelerin birarada ve farklı kombinasyonlarda kullanımının enzim üretimine etkisini irdelleyebilmek amacıyla yeni bir çalışma planlandı. Planlanan bu çalışmada % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri içeriğini oluşturan bileşenler çeşitli şekillerde

kombine edilerek ve besi yeri içeriğine önceki çalışmalarla belirlenen ek bileşenler (jelatin, asparajin,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , tripton) eklenerek her birinin hücre büyümesi ve enzim üretimi üzerine olan etkileri incelendi. Bu çalışmada, aşağıda tarif edilen besiyerleri kullanılarak, 250 ml erlenlerde 1/5 havalandırma, % 1 aşılama oranı ile 30 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızında büyütülen kültürler hazırlandı. Bu çalışma için pozitif kontrol olarak 12 numaralı besi yeri (% 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri) kullanıldı ve elde edilen veriler pozitif kontrolde gözlenen enzim aktivitesine görece değerlendirildi. Tüm kültürlerin hücre büyümesi ve alkalen proteaz aktivitesi 72 saat süreyle takip edildi ve enzim aktivitesi eşliğinde hücre büyüme eğrileri hazırlandı.

- Besi yeri 13

% 1 maya özütü, % 1 Proteoz pepton, % 0,1  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , % 0,02  $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 14

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 1 Jelatin, % 0,1  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , % 0,02  $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 15

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 1 Asparajin, % 0,1  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , % 0,02  $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 16

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 0,1  $K_2HPO_4$ , % 0,02  $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ , % 0,05  $KH_2PO_4$  distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 17

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 0,1  $Na_2HPO_4$ , % 0,02  $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$  distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 18

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 0,1  $Na_2HPO_4$ , % 0,05  $NaH_2PO_4$ , % 0,02  $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$  distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 19

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 0,1  $K_2HPO_4$ , % 0,25  $NaNO_3$ , % 0,02  $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$  distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 20

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 0,1  $K_2HPO_4$ , % 0,25  $KNO_3$ , % 0,02  $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$  distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta

10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 21

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,25 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, % 0,02 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 22

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 NaCl, % 0,02 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 23

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,5 NaCl, % 0,02 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 24

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, % 0,02 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 25

% 2 Tripton , % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O distile suda çözümlenerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözümlenerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- *Bacillus* sp. P22 Alkalen Proteaz Üretim Besi Yeri Bileşen Derişimlerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, bir önceki basamakta elde edilen bilgiler ışığında, içeriğinde % 1 oranında jelatin bulunan ve % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri (14 numaralı besi yeri) bileşenlerinin miktarları optimize edildi. Bu çalışma için aşağıda tarif edilen besiyerleri kullanıldı. Çalışma; 250 ml erlenlerde 1/5 havalandırma, % 1 aşılama oranı ile 30 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızında gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan besi yeri içerikleri Tablo 5.3'de ayrıca verildi. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak besi yeri 12 (% 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri) kullanıldı ve bu besi yerinde elde edilen aktivite değeri % 100 kabul edilerek göreceli aktiviteler hesaplandı. Kültürlerdeki hücre büyümesi ve alkalen proteaz aktivitesi 72 saat boyunca izlenerek tüm kültürler için enzim aktivitesi ve hücre büyüme eğrileri hazırlandı.

- Besi yeri 26

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 1 jelatin, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O distile suda çözümlenerek 500 ml'ye tamamlandı. 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilerek kullanıldı.

- Besi yeri 27

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 1 jelatin, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O distile suda çözümlenerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 0,5 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözümlenerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 28

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 1 jelatin, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 2 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 29

% 0,5 Proteoz pepton, % 1 jelatin, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 30

% 1 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 1 jelatin, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 31

% 0,5 maya özütü, % 1 jelatin, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 32

% 0,5 maya özütü, % 1 Proteoz pepton, % 1 jelatin, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 33

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 0,5 jelatin, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 34

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 2 jelatin, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 35

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 1 jelatin, % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 36

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 1 jelatin, % 0,3 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 37

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 1 jelatin, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.



- Besi yeri 38

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 1 jelatin, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,2 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

- Besi yeri 39

% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 1 jelatin, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,5 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O distile suda çözülerek 400 ml'ye tamamlandı. Süt tozu final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde 100 ml distile su içerisinde çözülerek 121 °C'ta 10 dakika sterilize edildi, 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilen diğer bileşenler ile otoklavlama sonrası karıştırıldı.

Tablo 5.3: *Bacillus* sp. P22 alkalen proteaz üretim besi yeri bileşen derişimlerinin optimize edildiği çalışmada kullanılan besi yeri içerikleri.

	% Süt tozu	% Maya özütü	% Proteoz pepton	% Jelatin	% $K_2HPO_4$	% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
Besi yeri 14	1	0,5	0,5	1	0,1	0,02
Besi yeri 26	0	0,5	0,5	1	0,1	0,02
Besi yeri 27	0,5	0,5	0,5	1	0,1	0,02
Besi yeri 28	2	0,5	0,5	1	0,1	0,02
Besi yeri 29	1	0	0,5	1	0,1	0,02
Besi yeri 30	1	1	0,5	1	0,1	0,02
Besi yeri 31	1	0,5	0	1	0,1	0,02
Besi yeri 32	1	0,5	1	1	0,1	0,02
Besi yeri 33	1	0,5	0,5	0,5	0,1	0,02
Besi yeri 34	1	0,5	0,5	2	0,1	0,02
Besi yeri 35	1	0,5	0,5	1	0	0,02
Besi yeri 36	1	0,5	0,5	1	0,3	0,02
Besi yeri 37	1	0,5	0,5	1	0,1	0
Besi yeri 38	1	0,5	0,5	1	0,1	0,2
Besi yeri 39	1	0,5	0,5	1	0,1	0,5
Besi yeri 12	1	0,5	0,5	0	0,1	0,02

### **5.2.3. *Bacillus sp.* P22'nin zamana bağı hücre büyümesi ve alkalen proteaz aktivitesinin belirlenmesi**

Tez çalışmasının bu bölümü, besi yeri bileşenleri ve inkübasyon koşullarının optimizasyonu çalışmaları tamamlandıktan sonra, *Bacillus sp.* P22 suşunun optimum şartlarda zamana bağı büyüme ve alkalen proteaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirildi.

Bakteri suşunun -20 °C'da korunmakta olan stoğunun 20 µl'si 2 ml LB besi yerine ekildi, 37 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızında gece boyu inkübe edilerek ön kültür hazırlandı. 12 numaralı besi yerinin (% 1 süt tozu, % 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) hazırlanan ön kültür ile % 1 oranında aşılmasıyla, 500 ml erlende 1/5 havalandırma oranı, 200 rpm çalkalama hızı ve 30 °C inkübasyon sıcaklığında ana kültür başlatıldı. 76 saat süreyle hücre büyümesi ve enzim aktivitesi takip edildi.

### **5.2.4. *Bacillus sp.* P22 Alkalen Proteazının Büyük Ölçekte Üretimi ve Saflaştırılması**

#### **5.2.4.1. *Bacillus sp.* P22 Hücre Kültürünün Hazırlanması ve Kültür Üst Sıvısının Toplanması**

Tez çalışmasının saflaştırma aşamasında, optimizasyon çalışmalarında belirlenen koşullarda (12 numaralı besi yeri kullanılarak, 500 ml erlenlerde, 1/5 havalandırma, % 1 aşılama oranı ile 30 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızında) kültürler hazırlandı. 1500 ml hacimde başlatılan kültürler inkübasyonun 24. saatinde toplandı ve +4 °C'ta, 7.000 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası elde edilen üst sıvı saflaştırma çalışmalarında enzim kaynağı olarak kullanıldı.

#### **5.2.4.2. *Bacillus sp.* P22 Alkalen Proteazının Saflaştırılması**

- **Ön Saflaştırma Çalışmaları**

Saflaştırma basamaklarının optimize edilmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapılarak en verimli koşullar belirlendi. Bu çalışmalarda, süzölmüş kültür üst sıvısında P22 alkalen proteazının çöktürülmesi için farklı tuz konsantrasyonları ile çeşitli koruyucular içeren ve koruyucu içermeyen diyaliz tamponlarının saflaştırma

için uygunlukları değerlendirilerek, enzimin DEAE sefaroz iyon değiştirici kolon kromatografisindeki saflaşma profili belirlendi.

- Amonyum Sülfat Çöktürmesi

24. saatinde durdurularak toplanan *Bacillus* sp. P22 kültürünün +4 °C, 7.000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmesi ile elde edilen üst sıvı, iki kat 3 MM Whatman kağıttan geçirilerek filtre edildi. Bu aşamada en uygun tuz konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla süzölen üst sıvı dört eşit hacime bölündü. Üst sıvılara son konsantrasyonları sırasıyla % 20, 40, 60 ve 80 olacak şekilde amonyum sülfat eklendi ve +4 °C'ta gece boyu düşük hızda karıştırılarak tek basamakta çöktürme işlemi gerçekleştirildi. Kültür üst sıvısı, amonyum sülfat çöktürmesini takiben +4 °C'ta 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi ve peletler -20 °C'a, üst sıvılar ise +4 °C'a kaldırıldı. 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 tampon ile çözülen peletlerin enzim aktivitesi belirlendi. Ayrıca bu aşamada elde edilen örnekler SDS-PAGE analizine alınarak, çeşitli tuz konsantrasyonlarındaki çöktürme işlemi sonucu jelde oluşan profil irdelendi.

- Diyaliz

Saflaştırmanın diyaliz basamağının düzenlenmesi amacıyla, önceki çalışmalarda elde edilen veriler ışığında tekrar hücre kültürü başlatıldı ve 24. saat sonunda durdurulan kültürün +4 °C, 7.000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmesiyle elde edilen üst sıvı iki kat 3 MM Whatman kağıt kullanılarak süzöldü. Süzöntü +4 °C'ta geceboyu % 80 amonyum sülfat ile çöktüröldü. Çöktürme işlemi sonrasında kültür üst sıvısı dört ayrı santrifüj tüpüne aktarılarak +4 °C'ta 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında elde edilen dört ayrı peletin çözümesinde, üç tanesi çeşitli koruyucular içeren ve aşağıdaki şekilde hazırlanan dört farklı tampon kullanıldı.

- Tampon 1: 50 mM Tris-HCl, % 15 Gliserol, 7 mM  $\beta$ -ME, pH 8.0
- Tampon 2: 50 mM Tris-HCl, 7 mM  $\beta$ -ME, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.0
- Tampon 3: 50 mM Tris-HCl, % 15 Gliserol, 7 mM  $\beta$ -ME, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.0
- Tampon 4: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0

Peletler tarif edilen tamponlar ile çözülerek diyaliz membranına aktarıldı ve gece boyu +4 °C'ta yavaş hızda karıştırılarak diyalize bırakıldı. Ertesi gün her tampon tekrar hazırlanarak örnekler taze tamponlara karşı 2 saat daha diyaliz edildi. Diyaliz öncesi ve sonrasında alkalen proteaz aktiviteleri ölçülerek, kullanılan farklı tamponların etkinliği değerlendirildi.

Bu ön çalışmaların ardından, Bölüm 5.2.4.1'de anlatıldığı şekilde yeniden hazırlanan büyük ölçekli hücre kültüründen *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazı, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE Sefaroz iyon değiştirici ve Sefakril S-100 moleküler elek kromatografisi kullanılarak üç basamakta saflaştırıldı.

- Büyük Ölçek Saflaştırma Çalışmaları

- Amonyum Sülfat Çöktürmesi

- 24. saatinde durdurularak toplanan *Bacillus* sp. P22 kültürünün +4 °C, 7.000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmesi ile elde edilen üst sıvı, iki kat 3 MM Whatman kağıttan geçirilerek filtre edildi. Elde edilen filtrata son konsantrasyonu % 80 olacak şekilde amonyum sülfat eklendi ve +4 °C'ta gece boyu düşük hızda karıştırılarak tek basamakta çöktürme işlemi gerçekleştirildi. Kültür üst sıvısı amonyum sülfat çöktürmesini takiben +4 °C, 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi ve elde edilen pelet diyaliz aşamasında kullanılmak üzere - 20 °C'a kaldırıldı.

- Diyaliz

- % 80 amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen pelet 50 mM Tris-HCl, % 15 Gliserol, 7 mM  $\beta$ -ME, pH 8.0 tampon ile çözülerek diyaliz membranına aktarıldı ve gece boyu +4 °C'ta aynı tampona karşı diyalize bırakıldı. Ertesi gün örneğin tamponu yenilenerek 2 saat daha diyaliz edildi.

Diyaliz sonrasında örnek akuazid ile +4 °C'ta 48 saat konsantre edildi. Konsantrasyon işlemi sonunda örnek membrandan çıkarıldı ve iki kez +4 °C 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek ham özüt elde edildi.

- Kromatografi Çalışmaları

- Akuazid sonrası elde edilen konsantre örnek 50 mM Tris-HCl, % 15 Gliserol, 7 mM  $\beta$ -ME, pH 8.0 tampon ile dengelenmiş DEAE sefaroz iyon değiştirici kolona (9,5 x 1,9 cm) yüklendi. Saflaştırma sonunda elde edilen kromatogramdan yola çıkılarak, protein tepelerine karşılık gelen fraksiyonlara

- alkalen proteaz aktivite testi uygulandı. Ayrıca saflaşma profilinin görülmesi amacıyla SDS-PAGE analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen bulguların değerlendirilmesiyle enzimatik aktivite ve saflık derecesi gözetilerek seçilen fraksiyonlar tek havuz halinde toplandı.

- DEAE sefaroz iyon değiştirici kromatografi ile elde edilen havuz diyaliz membranına aktarılarak, moleküler elek kolonuna yüklenmek amacıyla 50 mM Tris-HCl, 0,1 M NaCl, % 15 Gliserol, 7 mM  $\beta$ -ME, pH 7.5 tampona karşı gece boyu +4 °C'ta düşük hızda karıştırılarak diyaliz edildi. Ertesi sabah taze tampon ile 2 saat daha diyalize bırakılan örnek, bundan sonra +4 °C'ta Akuazid ile 72 saat konsantre edilerek Sefakril S-100 moleküler elek kolonuna (40 x 1,1 cm) yüklenmeye hazır hale getirildi.

- 50 mM Tris-HCl, 0,1 M NaCl, % 15 Gliserol, 7 mM  $\beta$ -ME, pH 7.5 tampon ile dengelenmiş kolona tek seferde yüklenen örneğin saflaştırılması sonucunda elde edilen fraksiyonlara alkalen proteaz aktivite testi uygulandı ve SDS-PAGE analizi gerçekleştirildi. Aktif fraksiyonlar saflıkları göz önünde bulundurularak tek havuz halinde birleştirildi ve tez çalışmasının bir sonraki adımı olan nitelendirme çalışmalarında enzim kaynağı olarak kullanıldı.

### 5.2.4.3. Alkalen Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

*Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının aktivitesi modifiye edilmiş Anson [Anson, 1938] yöntemiyle tayin edildi. Substrat olarak kazein, belirteç olarak Folin-Ciocalteu reaktifi kullanıldı [Lowry et al., 1951]. Bu yöntemde kullanılan Folin-Ciocalteu reaktifi alkali pH'da kazeinin hidrolizinden açığa çıkan tirozin ve triptofan (daha az ölçüde sistein ve histidin) ile tepkimeye girerek koyu mavi renk oluşturmakta, spektrofotometrede 660 nm dalgaboyunda absorbans ölçülerek enzim miktarı tayin edilmektedir.

- Alkalen Proteaz Aktivite Testi

Alkalen proteaz aktivitesinin belirlenmesinde, 1 ml kültür örneğinin 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmesiyle elde edilen üst sıvı enzim kaynağı; 50 mM pH 10.5 glisin-NaOH tamponunda çözülmüş % 0,6'lık kazein çözeltisi substrat olarak kullanıldı. Substrat çözeltisinin 250 µl'si ile kültür üst sıvısının 50 µl'si eppendorf tüplere aktarıldı ve 30 °C sıcaklığındaki su banyosunda 20 dk boyunca inkübe edildi. Kör olarak 250 µl substrat çözeltisi ile 50 µl besi yeri/enzim tamponu kullanıldı. İnkübasyon sonunda tüplere 250 µl TCA çözeltisi eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. 30 dk boyunca inkübasyon sonrasında 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilen tüplerden 200 µl üst sıvı temiz eppendorf tüplere aktarıldı. 1 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 200 µl ½ oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifi eklenerek oda sıcaklığında 30 dk inkübasyondan sonra 660 nm'de köre karşı absorbans değerleri ölçüldü.

- Substrat Çözeltisi

- 0,15 g Kazein, 25 ml 50 mM Glisin-NaOH, pH 10.5 tamponda çözülerek hazırlandı.

- Alkalen Proteaz Aktivite Testinde Kullanılan Tamponlar

- 50 mM Glisin-NaOH, pH 10.5 tamponu:

- 3,76 g Glisin

- 2,92 g NaCl

- 2 g NaOH 1 litre distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

- TCA çözeltisi:

- 17,98 g TCA

- 18,04 g Sodyum asetat

- 18,8 ml Asetik asit 1 litre distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

- 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi :

- 53 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 litre distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

- Tirozin Standart Eğrisinin Hazırlanması

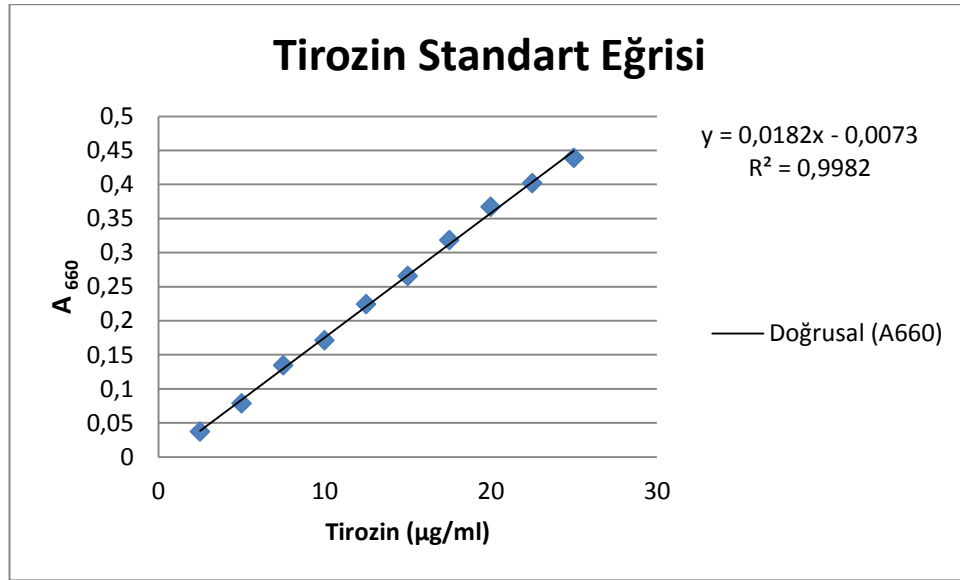
Alkalen proteaz aktivite testi ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesi için tirozin standart eğrisinin eğiminden faydalanıldı. 50 mM pH 10.5 glisin-NaOH tampon içerisinde 50 µg/ml derişimde hazırlanan L-tirozin çözeltisi kullanılarak, 500 µl içinde 2,5-25 µg L-tirozin içeren dilusyonlar iki set halinde hazırlandı. Kör olarak 500 µl glisin-NaOH, pH 10.5 tamponu kullanıldı. Bundan sonra deney tüplerine 2,5 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 0,5 ml ½ oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifi eklendi. Tüpler 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 660 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü. Elde edilen değerler ile hazırlanan grafiğin (Şekil 5.1) eğiminden alkalen proteaz aktivitesinin belirlenmesinde faydalanıldı. Alkalen proteaz aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{Aktivite} = \frac{\frac{A_{660}}{\text{Eğim}} \times \frac{1000}{M.A. \text{Tirozin}} \times \text{Reaksiyon Hacmi (ml)}}{\text{Enzim Hacmi (ml)} \times \text{Reaksiyon Süresi (dakika)}} \quad (5.1)$$



- Reaksiyon Hacmi: 0,3 ml
- Enzim Hacmi: 0,002 - 0,05 ml
- Reaksiyon Süresi: 20 dakika
- $M.A_{Tirozin}$ : 181,19 g/mol
- Eğim: 0,0183

Buna göre bir birim (U) enzim, 30 °C sıcaklık ve pH 10.5’da % 0,6’lık kazeinden bir dakikada 1  $\mu$ mol tirozin açığa çıkaran enzim miktarı olarak tarif edilmiştir (Takami et al., 1989).



Şekil 5.1: Tirozin standart eğrisi.

#### 5.2.4.4. Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi

Saflaştırma aşamalarının tümünde toplam protein miktarı Bradford [Bradford, 1976] yöntemiyle tayin edildi. Uygun miktarda örnek temiz eppendorf tüplere alınarak distile suyla 800  $\mu$ l’ye tamamlandı. Kör olarak 800  $\mu$ l distile su kullanıldı. Bundan sonra tüplere 200  $\mu$ l Bradford reaktifi eklenerek 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 595 nm dalga boyunda örneklerin absorbans değerleri belirlendi.

- Protein Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Bradford yöntemiyle toplam protein miktarının belirlenmesinde sığır serum albumini (BSA) standart olarak kullanıldı. 0,1 mg/ml BSA çözeltisinden 800 µl dH<sub>2</sub>O içinde 2-12 µg BSA içeren 6 farklı standart çözeltisi iki set halinde hazırlandı. Tüplere 200 µl Bradford reaktifi eklendikten sonra 595 nm dalga boyundaki absorbans değerleri spektrofotometrede belirlendi. Elde edilen veriler kullanılarak hazırlanan eğrinin eğimi protein miktarının hesaplanmasında kullanıldı.

$$\text{- Toplam protein miktarı} = A_{595} / \text{Eğim} / \text{Örnek hacmi (µl)}$$

#### **5.2.4.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS - PAGE)**

Elektrofrez, makromolekülleri akrilamid veya agaroz jellerde birbirlerinden ayırmakta en çok kullanılan yöntemdir. Enzim çalışmalarında sıklıkla başvuru alan elektroforetik yöntem ise, protein ve peptitlerin moleküler ağırlıkları temelinde ayrılmalarını sağlayan sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektrofrezidir (SDS-PAGE). SDS-PAGE’de protein veya peptitler, benzer anyonik yük yoğunluklarına sahip olmaları için anyonik bir deterjan olan SDS ile kaplanırlar. Bu örnekler bir jele yüklenerek elektrik akımına maruz bırakıldıklarında, negatif yüklü proteinler pozitif yüklü elektroda doğru göç edeceklerdir. Bu şartlar altında moleküllerin pozitif kutba doğru olan göçleri jelin polimer matriksi tarafından geciktirilecektir ve bu gecikmenin derecesi moleküllerin ağırlıklarına bağlı olacaktır. Belirlenmiş bir zaman aralığında büyük moleküler ağırlığa sahip moleküller en az seviyede göç edecekler, bununla birlikte daha hafif moleküller jel matriksince daha az geciktirileceklerinden dolayı aynı zaman aralığında daha çok mesafe kat ederek daha hızlı göç edeceklerdir. SDS-PAGE yöntemi bu temele dayanmaktadır [Copeland, 2000].

- Jelin Hazırlanması

Temiz bir cam beherde hazırlanan ayırma jeli otomatik pipet yardımıyla camların arasına döküldükten sonra, jelin üzerine hava ile temasını kesmek amacıyla bir enjektör vasıtasıyla izopropanol eklendi. Jel polimerleştikten sonra üzerindeki izopropanol uzaklaştırıldı ve düzenek distile su ile yıkandı. Camlar arasında kalan su 3MM Whatman kağıt ile giderilerek düzenek kurutuldu. Bundan sonra, hazırlanmış

olan derişim jeli camlar arasına otomatik pipet ile döküldü ve hemen ardından örneklerin yüklenecekleri kuyuların açılması amacıyla kullanılan tarak camlar arasına yerleştirildi. Derişim jeli polimerize olduktan sonra taraklar çıkartıldı ve oluşan kuyular 1X SDS-PAGE yürütme tamponu ile yıkandı. Ucu çekilmiş Pasteur pipetleri ile kuyular temizlenerek düzenek örneklerin yüklenmesi için hazır hale getirildi. SDS-PAGE örnekleri kuyulara yüklendikten sonra üzerlerine 1X yürütme tamponu eklendi.

- Ayırma Jeli

- 750 µl dH<sub>2</sub>O
- 3750 µl 0,75 M Tris HCl, pH 8.8 / % 0,2 SDS
- 3 ml Akrilamit/Bisakrilamit (30:1)
- 90 µl % 10 APS
- 6 µl TEMED

- Derişim Jeli

- 1050 µl dH<sub>2</sub>O
- 1500 µl 0,25 M Tris HCl, pH 6.8 / % 0.2 SDS
- 390 µl Akrilamit/Bisakrilamit (30:1)
- 60 µl % 10 APS
- 3 µl TEMED

- SDS-PAGE Örneklerinin Hazırlanması

Jelde yürütülecek örneklerin 20 µl'si eppendorf tüplere aktarılarak üzerlerine 5 µl yükleme tamponu eklendi. Örnekler kısa süre santrifüjlendikten sonra beş dakika süreyle kaynamakta olan suda bekletildi. Kaynatma işlemini takiben tekrar kısa süre santrifüj edilen örnekler otomatik pipet kullanılarak hazırlanan jele yüklendi.

- Yükleme Tamponu

- 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, % 1 SDS
- 2 mM EDTA
- % 1 β-merkaptoetanol
- % 10 gliserol

- % 0.002 Bromofenol mavisi

- Örneklerin Jelde Yürütülmesi

SDS düzeneği, hazırlanan örnekler kuyulara yüklü oldukları halde elektroforez tankı içerisine yerleştirildi ve tank 1X yürütme tamponu ile dolduruldu. Örnekler derişim jelini terk edinceye kadar 100 V'da gerçekleştirilen yürütme işlemi, örneklerin ayırma jeline geçmeleriyle birlikte 200 V'da sürdürülerek, yükleme tamponu jeli terk edene kadar elektroforeze devam edildi.

Yürütme işlemi sonlandırıldıktan sonra camlar açılarak derişim jeli atıldı ve ayırma jelinin sol üst köşesine küçük bir kesik atılarak jel işaretlendi. Boyama çözeltisinde çalkalanarak boyanan jel, arıtma çözeltisine alındı ve jelin rengi açılana kadar bu çözeltide bekletildi.

- 5X Yürütme Tamponu

- 15 g Tris baz

- 72 g Glisin

- 5 g SDS distile su ile 1 litreye tamamlandı ve pH: 8.3'e ayarlandı.

- Boyama Çözeltisi

- 100 ml % 10 asetik asit

- 100 ml % 95'lik etanolde çözülmüş % 0.25 Coomassie Blue ile hazırlandı.

- Arıtma Çözeltisi

- % 5 asetik asit

- % 50 etanol ile hazırlandı.

#### **5.2.4.6. Alkalen Proteaz Zimogram Analizi**

Proteolitik aktivitenin kaynağı olan protein bandının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen zimogram analizinde % 0,1 jelatin içeren ayırma jeli kullanıldı. Örnekler denatürleyici olmayan yükleme tamponu ile kaynatılmaksızın jele yüklendi. Elektroforez sonrasında, jel içerisinde bulunan SDS'in uzaklaştırılması amacıyla % 2,5 Triton X-100 içeren 10 ml 0,1 M glisin-NaOH, pH 10.5 tampona alınan jel oda

sıcaklığında 30 dakika süreyle hafifçe çalkalayarak bekletildi. Bu aşamadan sonra jelin üzerini kaplayacak kadar 0,1 M glisin-NaOH, pH 10.5 tampon ile yıkanan jel, 30 °C sıcaklıkta 10 ml 0,1 M glisin-NaOH, pH 10.5 içerisinde hafifçe çalkalayarak bir saat inkübasyona bırakıldı ve bu süre sonunda Coomassie Blue ile boyandı. Proteolitik aktivite sonucunda jelde boyanmayan bölgeler gözlemlendi.

- Denatürleyici Olmayan Yükleme Tamponu

- 50 mM Tris-HCl, pH 6.8

- 2 mM EDTA

- % 10 gliserol

- % 0.002 Bromofenol mavisi

### **5.2.5. *Bacillus* sp. P22 Alkalen Proteazının Nitelendirilmesi**

Kısmen saflaştırılan *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının nitelendirilmesi çalışmaları için Sefakril S-100 kolon kromatografisinden elde edilen Havuz 1'den faydalanıldı. İlk aşamada enzimin optimal çalışma sıcaklığı ile pH'sı belirlendi. Bundan sonra enzimin kararlı olduğu sıcaklık ve pH aralığı belirlenerek, çeşitli metal iyonları, deterjanlar, organik çözücüler ve kimyasal maddeler varlığında alkalen proteaz aktivitesi tayin edildi. Farklı sıcaklık değerlerinde ve çeşitli stabilizatörler varlığında enzimin zamana bağlı sıcaklık kararlılığı belirlenerek nitelendirme çalışmaları tamamlandı. Nitelendirme çalışmalarında tüm deneyler üçer set halinde gerçekleştirildi.

#### **5.2.5.1. Optimal Reaksiyon Sıcaklığı ve Sıcaklık Kararlılığının Belirlenmesi**

*Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının optimal tepkime sıcaklığının belirlenmesi için 5, 10, 15, 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60 ve 65 °C sıcaklıklarda aktivite testleri gerçekleştirildi. Kısmen saflaştırılmış enzim örneğinin 2 µl'si 50 mM glisin-NaOH, pH 10.5 tampon ile 50 µl'ye tamamlandıktan sonra standart aktivite testi yapıldı. Enzimin optimal tepkime sıcaklığının 40 °C olduğu belirlendi ve bundan sonraki tüm nitelendirme çalışmaları bu sıcaklıkta gerçekleştirildi.

Sıcaklık kararlılığı çalışmasında, enzim örneğinin 2 µl'si 50 mM glisin-NaOH, pH 10.5 tampon ile 50 µl'ye tamamlandıktan sonra 10, 20, 30, 40, 45, 50 ve 55 °C sıcaklıklarda 15 dakika bekletildi. İnkübasyon sonrasında enzim dilüsyonları üzerine 250 µl substrat çözeltisi eklenerek aktivite testleri gerçekleştirildi. Doğrudan test edilen enzimin aktivite değeri % 100 kabul edilerek kalan aktiviteler hesaplandı.

*Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının 30 °C sıcaklıktaki zamana bağlı sıcaklık kararlılığının belirlenmesi için, uygun görülen miktarda 1/25 enzim dilüsyonu 30 °C sıcaklıkta 90 dakika süreyle inkübe edildi. Devam eden inkübasyon sırasında düzenli aralıklarla örnek alınarak optimal şartlarda standart alkalen proteaz aktivite testleri gerçekleştirildi. Elde edilen veriler doğrudan aktivite testine alınan enzim örneğinin aktivitesine görece değerlendirildi.

#### **5.2.5.2. Optimal Reaksiyon pH'sı ve pH Kararlılığının Belirlenmesi**

Kısmen saflaşmış enzimin optimal reaksiyon pH'sının belirlenmesi amacıyla pH 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5 ve 12 değerlerinde tamponlar hazırlandı. Enzimin 2 µl'si bu tamponlar ile 50 µl'ye tamamlandı. Her tampon için ayrı olarak hazırlanan substrat çözeltisinin 250 µl'si ile önceki çalışmada belirlenmiş olan optimal tepkime sıcaklığı olan 40 °C'ta standart aktivite testleri uygulandı. pH 6-8 değerleri aralığında 50 mM fosfat tamponu, 8-9 aralığı için 50 mM Tris-HCl tamponu, 9-12 aralığı için 50 mM glisin-NaOH tamponu kullanıldı. pH 6'nın altındaki pH değerlerinde substrat çözülemediği için çalışılmadı. Enzimin optimal reaksiyon pH'sı 10.5 olarak belirlendi ve bundan sonraki tüm nitelendirme çalışmaları bu pH değerinde yapıldı.

Enzimin pH kararlılığının belirlenmesi için pH 4, 5, 6, 7, 8, 8.5, 9, 10, 10.5, 11, 11.5, 12 değerlerinde hazırlanan tamponlar kullanıldı. Enzimin 2 µl'si farklı pH değerlerindeki tamponlar ile 50 µl'ye tamamlanarak + 4 °C'ta 18 saat süreyle bekletildi. İnkübasyon sonunda 50 mM glisin-NaOH, pH 10.5 tamponda çözülerek hazırlanan substrat çözeltisinin 250 µl'si ile optimal tepkime sıcaklığı (40 °C) ve pH'ında (10.5) aktivite testleri uygulandı. Doğrudan aktivite testine alınan enzimin aktivite değeri % 100 kabul edilerek kalan aktiviteler hesaplandı. pH kararlılığı çalışmasında pH 4-6 aralığında 50 mM asetat tamponu, 6-8 aralığında 50 mM fosfat

tamponu, 8-9 aralığında 50 mM Tris-HCl tamponu, 9-12 aralığında 50 mM glisin-NaOH tamponu kullanıldı.

Ayrıca pH 8.5, 9, 10, 10.5, 11, 11.5, 12 değerlerinde enzimin bir haftalık pH kararlılığı belirlendi. Enzim örneğinin 2 µl'si bu çalışma için belirlenen pH değerlerindeki tamponlarla 50 µl'ye tamamlanarak + 4 °C'ta bir hafta boyunca inkübe edildi. Bir hafta sonunda farklı pH'larda bekletilen enzim örneklerine standart aktivite testleri yapıldı ve doğrudan test edilen örneğin aktivite değeri % 100 kabul edilerek kalan aktiviteler belirlendi.

- Asetat Tamponu

- 0,1 M sodyum asetat ve 0,1 M asetik asit distile suda çözülerek hazırlandı ve istenilen pH değeri için karıştırıldıktan sonra ½ oranında seyreltilerek kullanıldı.

- Fosfat Tamponu

- 0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> distile suda çözülerek hazırlandı ve istenilen pH değeri için karıştırıldıktan sonra ½ oranında seyreltilerek kullanıldı.

- Tris-HCl Tamponu

- 0,1 M Tris ve 0,1 M HCl distile suda çözülerek hazırlandı ve istenilen pH değeri için karıştırıldıktan sonra ½ oranında seyreltilerek kullanıldı.

- Glisin-NaOH Tamponu

- 0,1 M glisin ve 0,1 M NaOH distile suda çözülerek hazırlandı ve istenilen pH değeri için karıştırıldıktan sonra ½ oranında seyreltilerek kullanıldı.

### **5.2.5.3. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkilerinin Belirlenmesi**

Bu çalışmada FeCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, LiCl, ZnCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KCl, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, NaCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Ac, FeSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> kullanılarak, çeşitli metallerin *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazı üzerine olan etkileri incelendi. Enzim çözültisinin 2 µl'si, son konsantrasyonda 1 ve 10 mM metal iyonu içerecek şekilde

50 mM glisin-NaOH, pH 10.5 tampon ile 50 µl'ye tamamlanarak, 30 °C'ta 30 dakika süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonunda optimal tepkime şartlarında standart aktivite testleri gerçekleştirildi. Metal iyonu içermeksizin aynı şartlarda inkübe edilen enzim pozitif kontrol olarak kullanıldı ve bu örneğin aktivite değeri % 100 kabul edilerek kalan aktiviteler belirlendi.

#### **5.2.5.4. Deterjanların Enzim Aktivitesine Etkilerinin Belirlenmesi**

Çeşitli deterjanların proteolitik aktiviteye etkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmada, enzimin 2 µl'si son konsantrasyonda % 0.1 ve 1 oranında CTAB, SDS, Sodyumdeoksikolat, Triton X-100, Tween 80 ve Tween 20 içerecek şekilde 50 mM glisin-NaOH pH, 10.5 tampon ile 50 µl'ye tamamlandı. 30 °C'ta 30 dakika inkübasyon sonrasında optimal tepkime şartlarında standart aktivite testleri uygulandı. Elde edilen sonuçlar deterjan içermeyen ve aynı şartlarda inkübe edilen pozitif kontrolün aktivite değerine göre değerlendirildi.

#### **5.2.5.5. Organik Çözücülerin Enzim Aktivitesine Etkilerinin Belirlenmesi**

Bu çalışmada aseton, etanol, metanol, izopropanol, izoamilalkol, DMSO, asetonitril ve etilen glikol gibi organik çözücülerin enzim aktivitesine olan etkileri belirlendi. Kısmen saflaştırılmış enzimin 2 µl'si son konsantrasyonda % 10 ve % 30 organik çözücü içerecek şekilde 50 mM glisin-NaOH pH, 10.5 tampon ile 50 µl'ye tamamlandı ve 30 dakika boyunca 30 °C'ta inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında optimal şartlarda standart aktivite testleri uygulandı ve organik çözücü içermeyen aynı şartlarda inkübe edilen pozitif kontrolün aktivite değeri % 100 kabul edilerek kalan aktiviteler hesaplandı.

#### **5.2.5.6 Çeşitli Kimyasal Maddelerin Enzim Aktivitesine Etkilerinin Belirlenmesi**

Bu çalışmada EDTA, β-ME, DTT ve PMSF gibi kimyasal maddelerin alkalen proteaz aktivitesine olan etkileri belirlendi. Enzim çözeltisinin 2 µl'si, bu kimyasal maddeleri son konsantrasyonda 1 ve 10 mM içerecek şekilde 50 mM glisin-NaOH



pH, 10.5 tampon ile 50 µl'ye tamamlanarak 30 °C'ta 30 dakika süreyle inkübe edildikten sonra optimal tepkime koşullarında standart aktivite testleri yapıldı. Aynı şartlarda inkübe edilen ancak kimyasal madde içermeyen enzim örneği pozitif kontrol olarak kullanıldı ve bu örneğin aktivite değeri % 100 kabul edilerek kalan aktiviteler saptandı.

#### **5.2.5.7. Çeşitli Stabilizatörlerin Enzimin Sıcaklık Kararlılığına Etkilerinin Belirlenmesi**

Bu çalışmada DMSO, etilen glikol ve gliserol % 10 veya % 30 oranlarında, CaCl<sub>2</sub> 10 mM konsantrasyonda kullanılarak anılan stabilizatörlerin enzimin sıcaklık kararlılığı üzerine etkileri irdelendi. Bu çalışmada, enzimin 2 µl'si son konsantrasyonda istenilen oranda stabilizatör içerecek şekilde 50 mM glisin-NaOH, pH 10.5 tampon ile 50 µl'ye tamamlandı ve 50 veya 60 °C'ta 15 dakika inkübe edildikten sonra optimal koşullarda standart aktivite testleri gerçekleştirildi. Pozitif kontrol olarak stabilizatör içermeden aynı şartlarda inkübe edilen enzim örneği kullanıldı ve bu örneğin aktivite değerleri % 100 kabul edilerek kalan aktiviteler hesaplandı.

*Bacillus* sp. P22 alkalin proteazının CaCl<sub>2</sub> varlığında, 50 ve 60 °C sıcaklıklarda zamana bağlı sıcaklık kararlılığının irdelendiği çalışmada, son konsantrasyonda 10 mM CaCl<sub>2</sub> içeren uygun görülen miktarda 1/25 enzim dilüsyonu belirlenen sıcaklıklarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürerken düzenli aralıklarla örnek alınarak optimal şartlarda aktivite testi uygulandı. CaCl<sub>2</sub> içermeksizin doğrudan aktivite testine alınan örnek pozitif kontrol olarak kullanıldı. Pozitif kontrolün aktivite değeri % 100 kabul edilerek kalan aktiviteler saptandı.

## 6. BULGULAR

### 6.1. *Bacillus* sp. P22 Alkalen Proteazının Üretilmesi için Uygun Besi Yerinin Seçilmesi

Bu tez çalışmasının biyolojik kaynağını oluşturan yerel izolat *Bacillus* sp. P22'nin topraktan izole edildikten sonra sıvı besi yerinde hücre dışı enzim üretkenliğinin değerlendirildiği ilk çalışmalarda optimal enzim üretimi için seçilen besi yeri bileşimi % 4 jelatin içeren NB besi yeri (% 0,3 et özütü, % 0,5 pepton, pH 7 [Battal, 2004]), bu çalışmanın başlangıcında da ilgili soydan enzim üretimi için denenmiş, ancak hücreler söz konusu besi yerinde üretilmemiştir. Ortamda bulunan jelatinin pH'da yol açabileceği azalmanın hücre büyümesini engelleyebileceği düşünülerek yapılan çalışmalarda besi yeri pH'sının 4'e düştüğü görülmüş, bu nedenle ilgili besi yerinde kullanılan jelatinin miktarı % 1'e düşürülmüş (Besi yeri 5), yanı sıra farklı besi yerleri de optimal enzim üretimi için denenmiştir.

Bu bağlamda gerçekleştirilen çalışmalarda; *Bacillus* sp. P22 on iki farklı besi yerinde, Bölüm 5.2.2.1'de detayları anlatılan koşullarda inkübe edilerek hücre büyümesi ve enzim aktivitesi 72 saate kadar izlendi. Kullanılan besi yerleri arasında, inkübasyonun 24. saati sonunda en yüksek proteolitik aktivitenin gözlemlendiği 12 numaralı besi yeri (% 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri), kısa sürede yüksek seviyede enzim üretimini sağlaması nedeniyle dikkat çekti. Bu nedenle bu çalışmada elde edilen veriler genel olarak 24. saat sonundaki hücre büyümesi ve proteolitik aktivite baz alınarak değerlendirildi. Bu çalışmada kullanılan tüm besiyerlerinin 24. saat sonunda elde edilen alkalen proteaz aktiviteleri ve hücre büyümesi değerleri Tablo 6.1'de, 72 saate kadar hücre büyümesi ve enzim aktivitesini gösteren grafikler ise Şekil 6.1 ve Şekil 6.2'de verildi.

Buna göre; yukarıda belirtilen 5 numaralı besi yerinde hücrelerin yine üremediği görüldü. Dolayısıyla bu besi yeri ile gerçekleştirilen çalışmada enzimatik aktivite değerlendirilemedi. 1, 2, 8 ve 11 numaralı besiyerlerinde üreme çok düşük düzeylerde ( $A_{600} = 0,2 - 0,85$ ) kalırken, en yüksek üremenin ( $A_{600} = 10,11$ ) % 3 oranında Tryptic Soy Broth içeren 6 numaralı besi yerinde olduğu kaydedildi. 3, 4, 7, 10 ve 12 numaralı besi yerlerinde hücre büyümesinin benzer düzeylerde (4,79 - 6,57)

olduğu, 9 numaralı besi yerinde ise 24. saatin sonunda ancak 1,95  $A_{600}$  değerine ulaştığı belirlendi (Tablo 6.1).

1, 4, 6, 10 ve 12 numaralı besi yerlerinde dikkate değer düzeylerde enzimatik aktivite elde edildi. Enzimatik aktivitenin belirlendiği bu besi yerlerinde genel olarak aktivitenin hücre büyümesine paralel olarak geliştiği görüldü. Bu besi yerlerinde inkübasyonun 24. saati sonunda elde edilen aktivite değerleri, sırasıyla, 35,8; 24,3; 40,0; 18,0 ve 86,5 U/ml/dk olarak belirlenirken, besi yeri 2 ve 3 için, sırasıyla, 1,04 ve 9,05 U/ml/dk bulundu. 7, 8, 9 ve 11 numaralı besi yerlerinde ise enzimatik aktivite belirlenemedi (Tablo 6.1).

İnorganik azot kaynaklarının ve karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı 2 ve 8 numaralı besi yerleri ile Proteoz pepton ve süt tozunun kullanıldığı 1 numaralı besi yerinin her üçünde de 0,2  $A_{600}$  düzeyinde çok düşük miktarlarda hücre büyümesi görülmesine karşın, bu üç besi yerinde elde edilen enzimatik aktivite değerleri çok farklıdır. % 1 glukozun kullanıldığı besi yeri 8'de hiç aktivite elde edilmezken, % 0,6 glukoz içeren besi yeri 2'de 24. saatte 1,04 U/ml/dk düzeyinde aktivite elde edildi, ancak 28. saatten itibaren sıfıra düştüğü görüldü. Bu kültürlerde hücre büyümesi ve aktivite 48. saate dek izlendikten sonra ne üremede ne de aktivitede bir değişiklik gözlenmediğinden kültürler durduruldu. Hücre büyümesinin 24. saatte 0,24 olduğu 1 numaralı besi yerinde büyümenin kültürün durdurulduğu 72. saatin sonunda da ancak 0,37  $A_{600}$  değerine ulaştığı görüldü (Şekil 6.1). Buna karşın 24. saatte 35,8 U/ml/dk olarak belirlenen enzimatik aktivite, kültürün sonlarına doğru artış göstererek 53,20 U/ml/dk düzeyine ulaştı (Şekil 6.2).

% 1 jelatin dışında içerikleri aynı olan 3 ve 4 numaralı besi yerlerinde 24. saatteki hücre büyümeleri aynı düzeyde (sırasıyla, 5,89 ve 5,51  $A_{600}$ ) görülmekle birlikte, proteolitik aktivite, ek olarak % 1 jelatinin kullanıldığı besi yeri 4'te 24,3 U/ml/dk düzeylerine ulaştı (Tablo 6.1). Bu kültürde görülen en yüksek enzimatik aktivite değeri (43,43 U/ml/dk) 31. saatte logaritmik fazın sonunda belirlenmiş olup, daha sonra hücre büyümesine paralel olarak düşmeye başladı ve kültürün sonlandırıldığı 72. saatte 17,73 U/ml/dk'ya geriledi (Şekil 6.2). Besi yeri 3'te ise en yüksek aktivite kültürün durağan fazında 28. saatte 11,53 U/ml/dk olarak belirlendi ve 31. saatten sonra hızla düşerek 48. saatte sıfıra ulaştı (Şekil 6.2). Bu nedenle bu kültür de daha ileri saatlerde izlenmedi.

En yüksek üremenin görüldüğü 6 numaralı TSB besi yerinde elde edilen proteolitik aktivite, kültürün durağan faza girdiği 31. saatte en yüksek değerine ulaştı

(47, 27 U/ml/dk), ancak bu saatten sonra hızla azalarak 55. saatte sıfıra düştü (Şekil 6.2). Buna karşın hücre büyümesinin 72. saate dek yaklaşık aynı değerlerde kaldığı görüldü (Şekil 6.1).

Maya özütü ve kazeinin kullanıldığı besi yeri 7'de hücre büyümesinin en yüksek değerine (7,3 A<sub>600</sub>) 28. saatte ulaştığı, 31. saatten sonra 5,5 A<sub>600</sub> değerlerine düşerek 72. saatin sonuna dek bu düzeylerde kaldığı görüldü (Şekil 6.1). Bu besi yerinde proteolitik aktivite belirlenmedi.

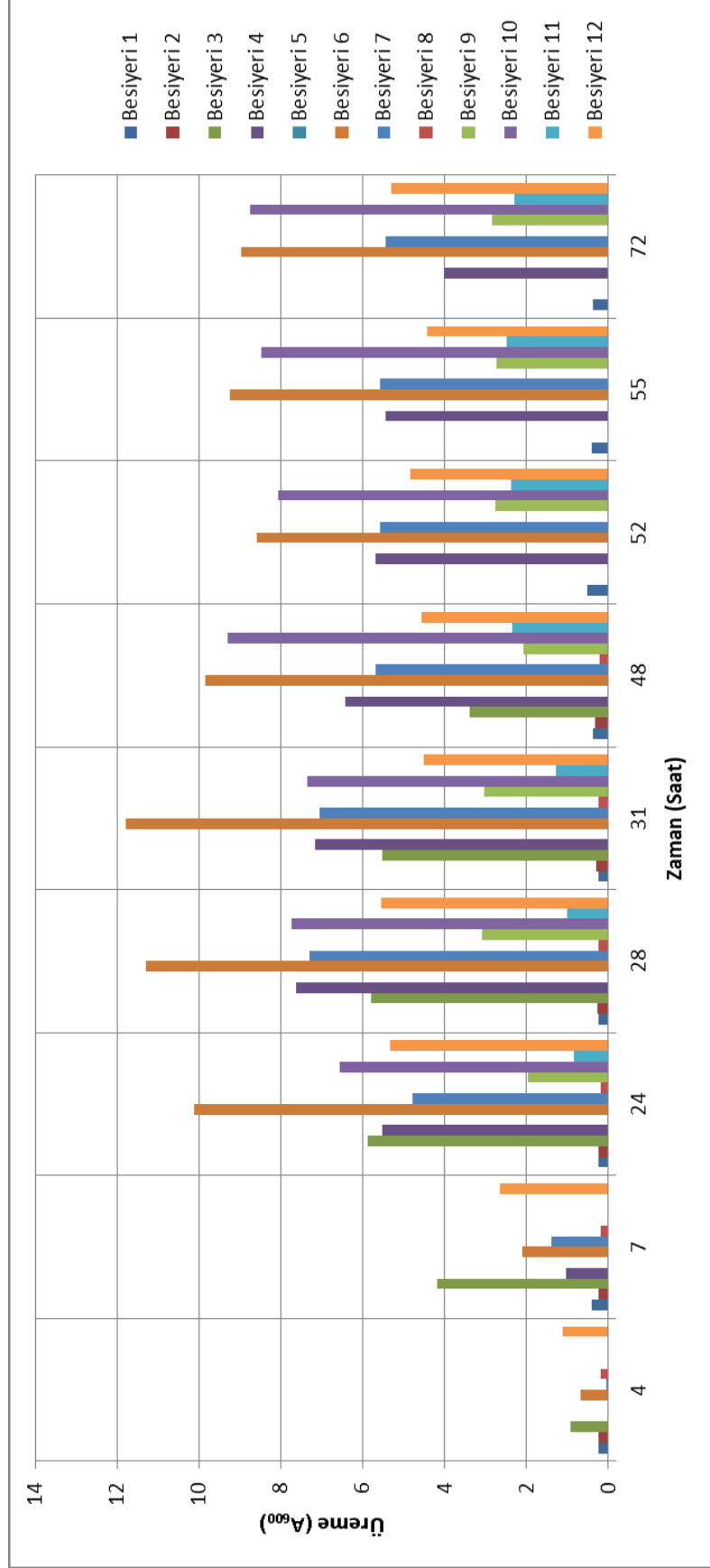
Besi yeri 9 - 12 Horikoshi besi yerinin farklı versiyonlarını oluşturmaktadır. Besi yeri 9 % 1 glikoz içeren Horikoshi besi yeri (Horikoshi I), Besi yeri 10 % 1 nişasta içeren Horikoshi besi yeri (Horikoshi II), Besi yeri 11 maya özütü içermeyen Horikoshi II besi yeri, Besi yeri 12 ise % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeridir. Besi yeri 9'da hücre büyümesinin kültürün 28. saatinde en yüksek düzeyi olan 3,0 A<sub>600</sub> değerine ulaştığı görüldü ve 72. saatin sonuna dek aynı düzeylerde kaldı (Şekil 6.1). Buna karşın bu kültürde proteolitik aktivite elde edilemedi. Benzer şekilde besi yeri 11'de de hücre büyümesi en fazla 2,48 A<sub>600</sub> (55. saat) değerine ulaştı ve kültürün sonuna dek bu düzeylerde kaldı. Maya özütü içermeyen Horikoshi II besi yeri ile gerçekleştirilen bu çalışmada kültürün 32. saatine dek proteolitik aktivite görülmemesine karşın, 48. saatten itibaren düşük düzeylerde (5,6 U/ml/dk) de olsa aktivite elde edildi (Şekil 6.2). Maya özütü içeren Horikoshi II besi yerinde (besi yeri 10) ise Hücre büyümesi ve aktivite kültürün başlangıcından itibaren paralel seyretti. Bu besi yerinde hücre büyümesinin 28. saatte 7,73 A<sub>600</sub> değerine ulaştığı ve kültürün sonuna dek yaklaşık aynı düzeylerde kaldığı görüldü. Bu kültürde en yüksek enzimatik aktivite 24. saatte 18,1 U/ml/dk olarak belirlendi. Bundan sonra azalarak 72. saatin sonunda 5,61 U/ml/dk değerine düştü (Şekil 6.2). Bu çalışmada en yüksek aktivitenin elde edildiği besi yeri, 12 numaralı % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri oldu. Bu kültürde üreme ve aktivite 10 numaralı besi yerine benzer şekilde kültürün başlangıcından itibaren paralel olarak seyretti, ancak aktivite değerleri çok daha yüksek bulundu. En yüksek proteolitik aktivite (86,5 U/ml/dk) logaritmik fazın sonunda elde edildi ve aktivite değerleri kültürün sonuna dek benzer düzeylerde kaldı (Şekil 6.2). Logaritmik fazın sonunda (24. saat) 4,97 A<sub>600</sub> değerine ulaşan hücre büyümesi, kültürün sonuna dek azalmadan devam etti (Şekil 6.1).

Bu çalışma sonucunda elde edilen bulguların değerlendirilmesiyle, 24. saatten itibaren en fazla alkalen proteaz aktivitesinin belirlendiği 12 numaralı besi yeri ile

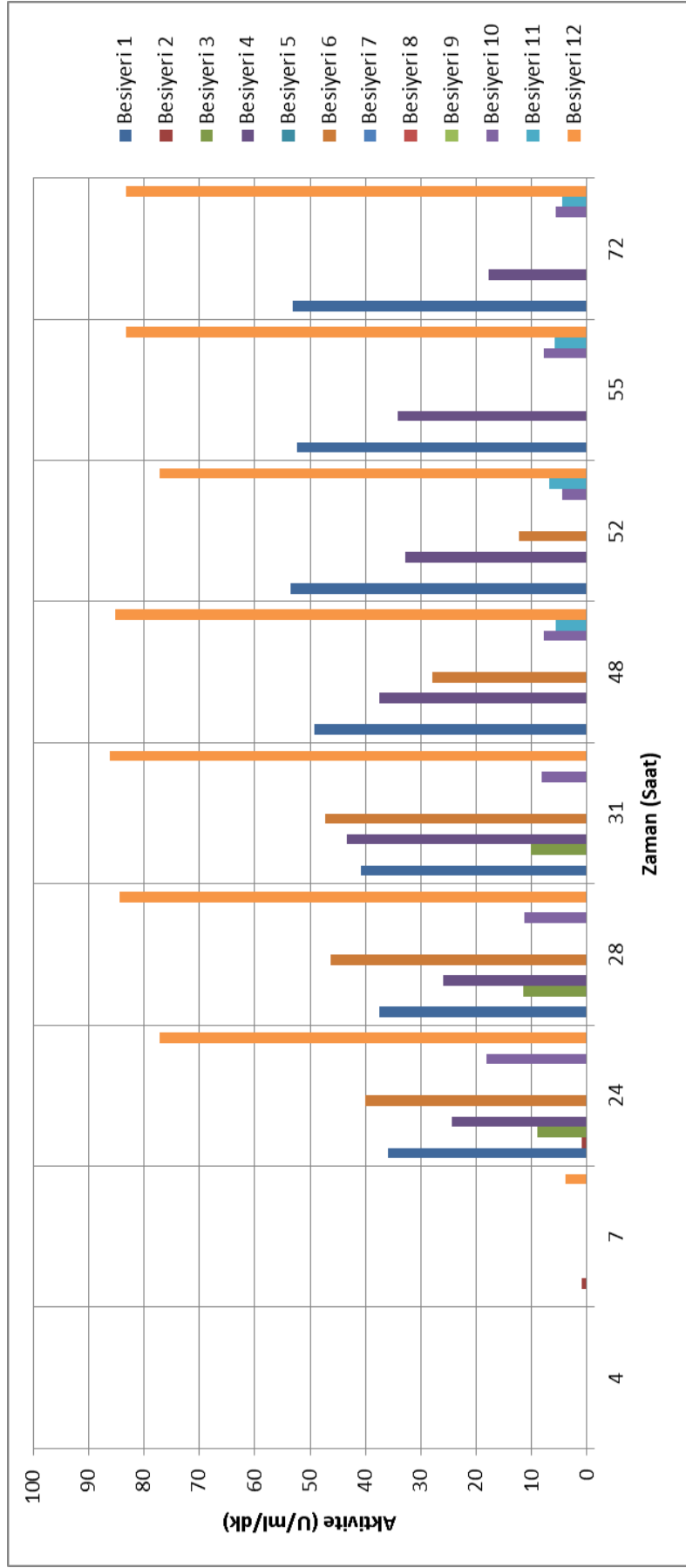
inkübasyon koşullarının belirleneceği optimizasyon çalışmalarına geçilmesine karar verildi.

Tablo 6.1: *Bacillus* sp. P22 alkalin proteazının üretilmesi için kullanılan farklı besi yerlerinde 24. saat sonunda elde edilen hücre büyümesi ve aktivite değerleri.

	Besi yeri 1	Besi yeri 2	Besi yeri 3	Besi yeri 4	Besi yeri 5	Besi yeri 6	Besi yeri 7	Besi yeri 8	Besi yeri 9	Besi yeri 10	Besi yeri 11	Besi yeri 12
Hücre Büyümesi ( $A_{600}$ )	0,24	0,23	5,89	5,51	0,01	10,1	4,79	0,2	1,95	6,57	0,85	4,97
Aktivite (U/ml/dk)	35,8	1,04	9,05	24,3	0,00	40,0	0,00	0,00	0,00	18,0	0,00	86,5



Şekil 6.1: Farklı besi yerlerinde (Besi yeri 1-12) kültüre alınan *Bacillus* sp. P22 soyunun 72 saatlik hücre büyümesi grafiği.



Şekil 6.2: Farklı besi yerlerinde (Besi yeri 1-12) kültüre alınan *Bacillus* sp. P22 soyunun 72 saatlik enzimatik aktivite grafiği.

## 6.2. İnkübasyon Koşulları ve Besi Yeri Bileşenlerinin Optimizasyonu Çalışmaları

Enzim üretimi için % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri (Besi yeri 12) kullanımı kararlaştırıldıktan sonra inkübasyon koşullarının optimizasyonuna yönelik çalışmalara geçildi. Bu aşamada; bakteri stoklarının farklı yöntemlerle canlandırılması, inkübasyon sıcaklığı, besi yeri pH'sı, havalandırma oranı, çalkalama hızı, aşılama oranı gibi değişkenlerin *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının üretimi üzerine olan etkileri belirlendi. Bir sonraki adımda ise; % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri içeriğine çeşitli karbon, organik ve inorganik azot kaynakları ile çeşitli metal tuzları eklendi ve bunların enzim üretimine olan etkileri irdelendi. Takip eden çalışmalarda daha ileri besi yeri optimizasyonu gerçekleştirilmesi amacıyla, besi yeri bileşenlerinin farklı kombinasyonları ile çeşitli konsantrasyonlarının alkalen proteaz üretimini ne şekilde etkilediği belirlenerek optimizasyon çalışmaları tamamlandı.

Farklı sıcaklıklarda saklanmakta olan bakteri stoklarından bir veya iki aşamada hazırlanan ön kültürle aşılama kültürlerinde enzim aktivitesi ve hücre büyümesi 48 saat boyunca takip edildi. Bu amaçla yapılan çalışmalarda; - 20 °C ve - 80 °C bakteri stoklarının sıvı ve katı LB besiyerlerinde, Bölüm 5.2.2.2'de anlatıldığı şekilde, bir veya iki aşamada canlandırılmasıyla elde edilen altı farklı ön kültürden gelen altı yeni kültür oluşturuldu. İnkübasyonun 24. saati sonunda -20 ve - 80 °C stoklarının bir aşamalı olarak canlandırılmasıyla hazırlanan kültürlerde en yüksek aktivite değeri belirlendi. - 20 °C bakteri stoğunun bir aşamalı olarak canlandırılmasıyla hazırlanan kültürün 24. saat aktivite değeri % 100 kabul edilerek göreceli aktiviteler hesaplandı (Tablo 6.2). Buna göre; - 20 °C ve - 80 °C bakteri stoklarının bir aşamada büyütülmesiyle elde edilen ön kültürlerin kullanıldığı bakteriyel kültürlerde alkalen proteaz aktivitelerinin, iki aşamada büyütülen ön kültürlerden hazırlanan kültürlerle oranla önemli derecede yüksek olduğu; buna karşın + 4 °C'da korunan hücrelerle hazırlanan ön kültürlerin kullanıldığı bakteriyel kültürlerde proteaz aktivitesinin bir aşamalı veya iki aşamalı olarak hazırlanmasının enzim aktivitede önemli bir değişikliğe yol açmadığı ve her iki durumda da - 20 °C ve - 80 °C stoklarının kullanıldığı kültürlerden daha düşük düzeylerde olduğu gözlemlendi.

Kültürlerin tümünde gözlenen hücre büyümesi değerlerinin 24-31 saat aralığında genel olarak sabit kaldığı ve birbirleri ile benzeşik olduğu görüldü (Şekil 6.3). + 4 °C'ta korunan hücrelerden tek aşamada, - 20 °C ve - 80 °C stoklarından iki

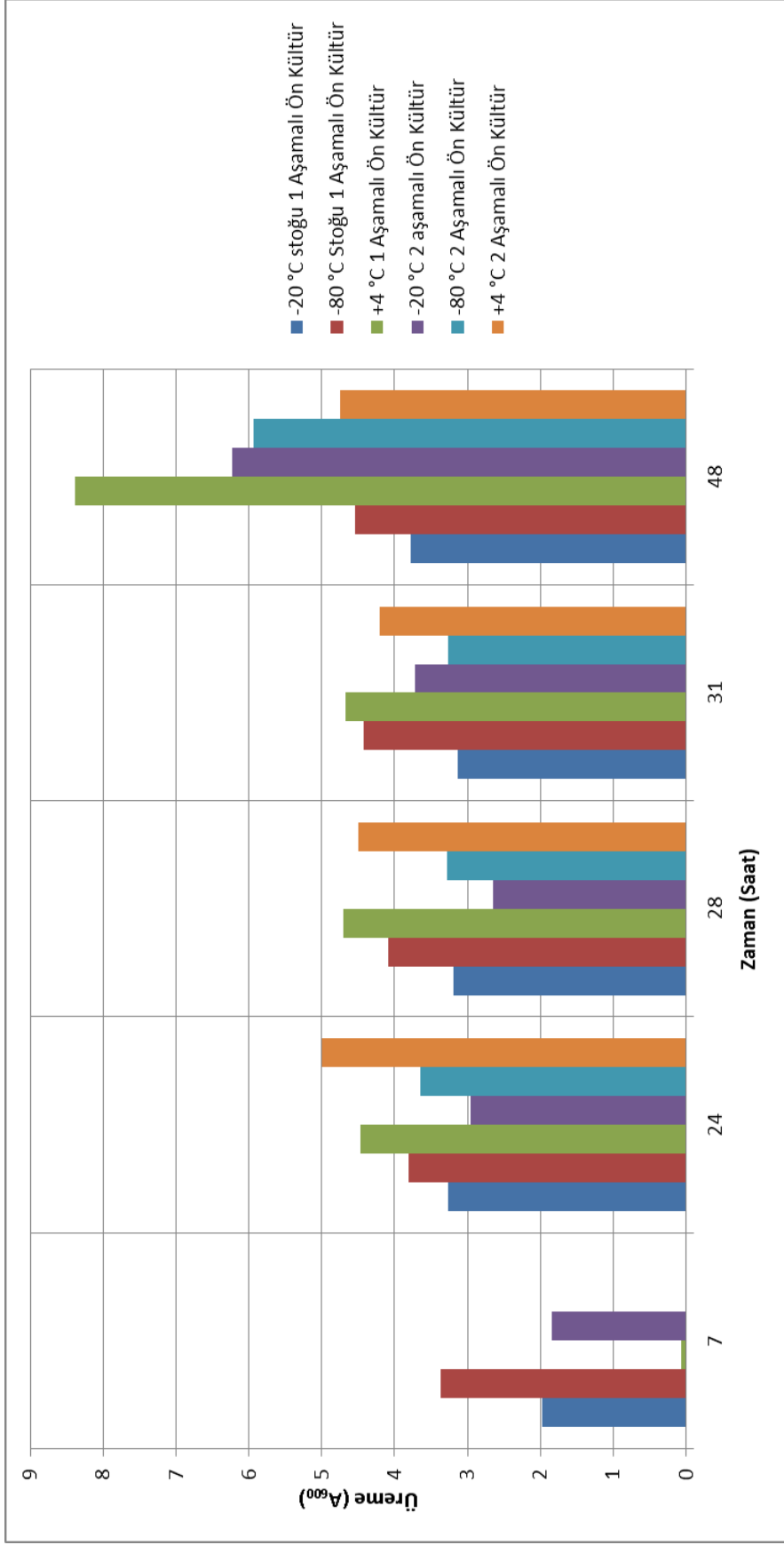


aşamada hazırlanan ön kültürlerin kullanıldığı kültürlerde ise 48. saatte bir ivme kazanarak 6,0 / 8,0  $A_{600}$  düzeylerine çıktığı gözlemlendi (Şekil 6.3).

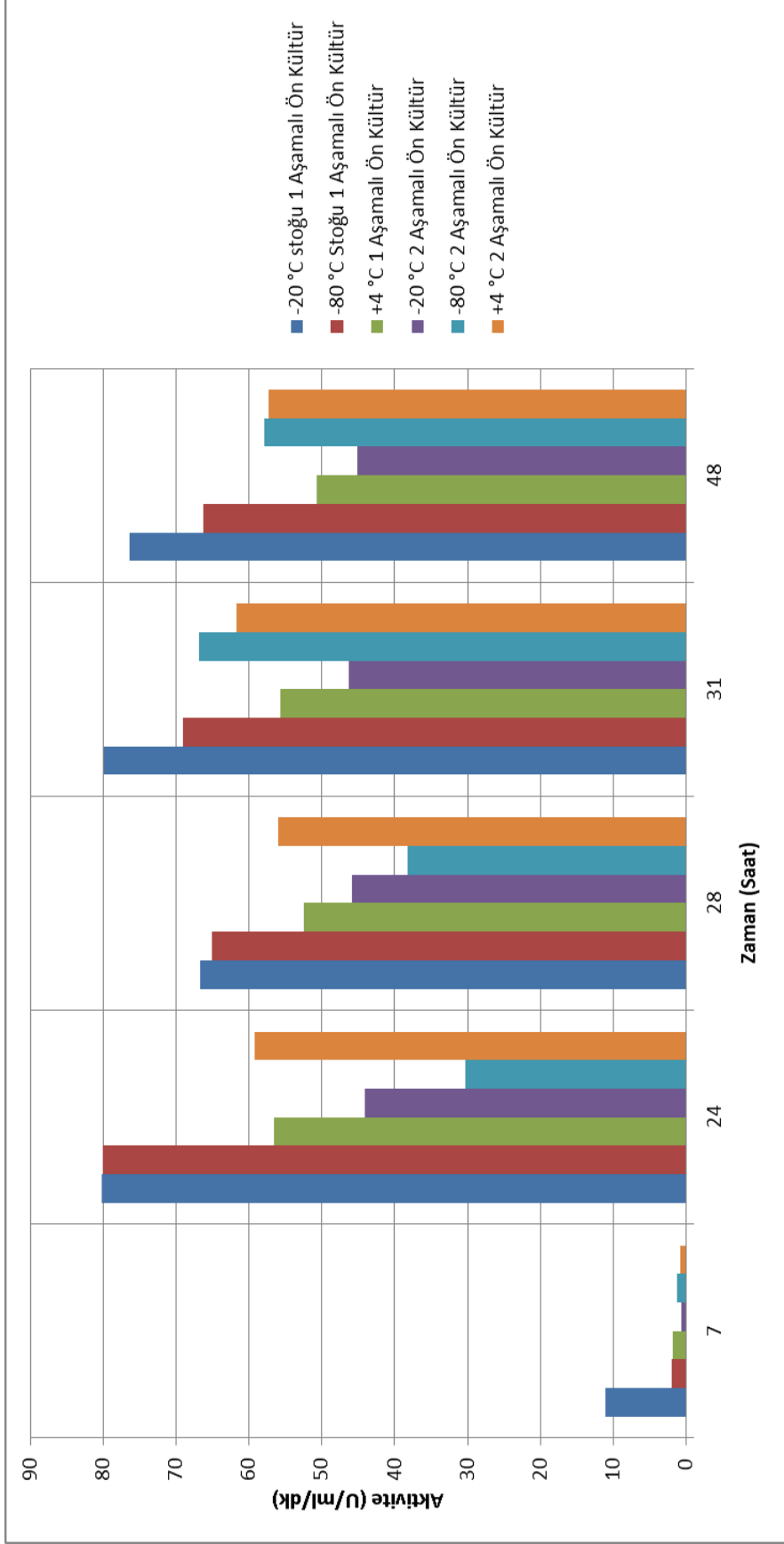
Bu sonuçlar ışığında bundan sonraki çalışmalar için kullanım kolaylığı gözetilerek  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  stoğunun kullanılmasına karar verildi. Çalışma boyunca hazırlanan tüm ön kültürler  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  stoğunun  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ta gece boyu büyütülmesiyle (yaklaşık 16 saat) elde edildi.

Tablo 6.2: Farklı şekillerde hazırlanan ön kültürlerle aşılana *Bacillus* sp. P22 kültürlerinde 24. saat sonunda elde edilen hücre büyümesi, aktivite ve göreceli aktivite değerleri.

Ön Kültür	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ stoğu 1 aşamalı ön kültür	$-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ stoğu 1 aşamalı ön kültür	$+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ stoğu 1 aşamalı ön kültür	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ stoğu 2 aşamalı ön kültür	$-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ stoğu 2 aşamalı ön kültür	$+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ stoğu 2 aşamalı ön kültür
Hücre Büyümesi ( $A_{600}$ )	3,27	3,81	4,47	2,95	3,65	4,99
Aktivite (U/ml/dk)	80,2	80,07	56,54	44,06	30,26	59,21
Göreceli Aktivite (%)	100	99,8	70,5	54,9	37,7	73,8



Şekil 6.3: Farklı şekillerde hazırlanan ön kültürlerle aşılanan *Bacillus* sp. P22 kültürlerinin 48 saatlik hücre büyümesi grafiği.

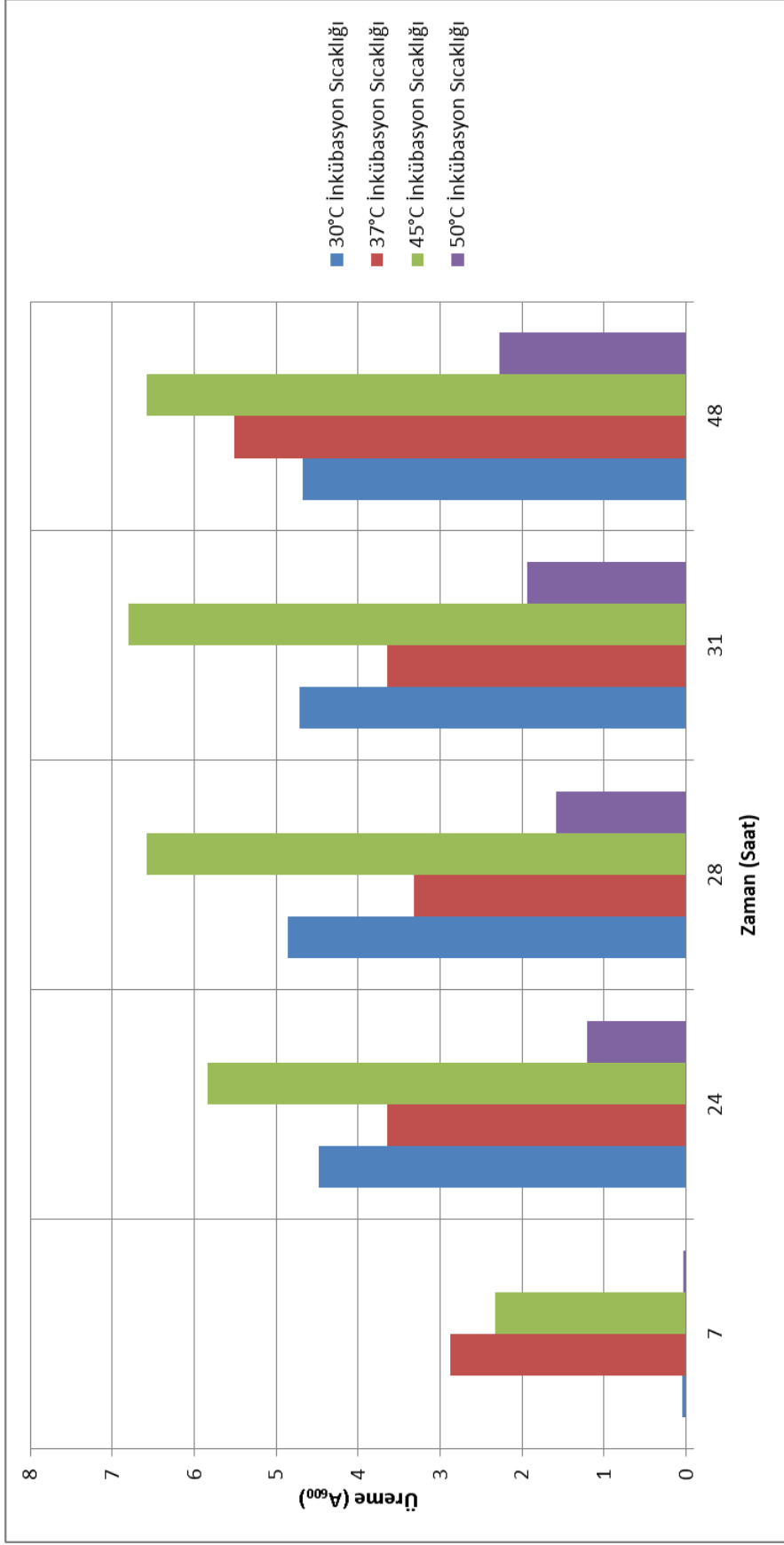


Şekil 6.4: Farklı şekillerde hazırlanan ön kültürlerle aşılanan *Bacillus* sp. P22 kültürlerinin 48 saatlik enzimatik aktivite grafiği.

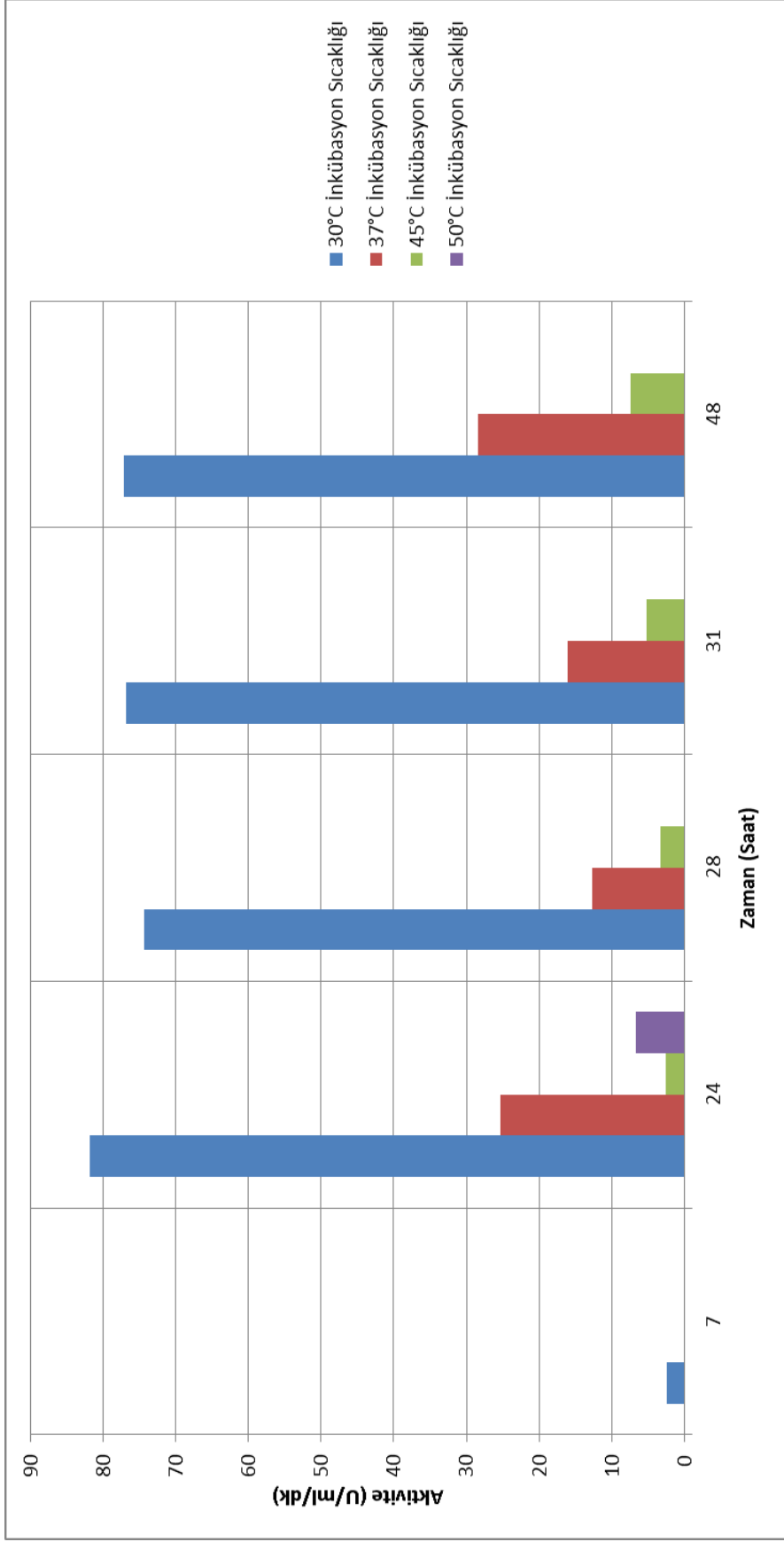
### 6.2.1. İnkübasyon Sıcaklığının Alkalen Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi

İnkübasyon sıcaklığının enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmada 30, 37, 45 ve 50 °C sıcaklıklarda inkübe edilen kültürlerde hücre büyümesi ve enzim aktivitesi 48 saat boyunca takip edilerek elde edilen sonuçlar değerlendirildi (Şekil 6.5 ve Şekil 6.6). Buna göre; en yüksek proteaz aktivitesi 30 °C sıcaklıkta inkübe edilen kültürde görüldü. Sıcaklığın artmasının enzim üretimini azalttığı belirlendi. İnkübasyon sıcaklığının 30 °C olduğu kültürde enzim aktivitenin en yüksek değerine (81,83 U/ml/dk) 24. saatte ulaştığı, kültürün 28 - 48. saatleri arasında çok fazla azalmadan devam ettiği görüldü (Şekil 6.6). Enzim aktivitenin 37 °C inkübasyon sıcaklığında hızla düşerek 25 - 28 U/ml/dk değerlerine gerilediği, 45 °C inkübasyon sıcaklığında çok yavaş artarak 48. saatin sonunda ancak 7,42 U/ml/dk değerine ulaştığı, 50 °C'ta ise 24. saatte görülen 6,6 U/ml/dk aktivite değerinin 28. saatten sonra sıfır olduğu belirlendi (Şekil 6.6).

30 °C'ta çalışılan kültürde en yüksek enzim aktivitenin büyümenin logaritmik fazının sonunda elde edildiği, durgun fazda proteolitik aktivitenin hücre büyümesine paralel olarak yaklaşık aynı düzeylerde seyrettiği görüldü. Bu kültürde 24. saatte 4,48 A<sub>600</sub> değerine ulaşan hücre büyümesi kültürün sonuna dek bu düzeylerde kaldı (Şekil 6.5). En yüksek hücre büyümesi 45 °C sıcaklıkta inkübe edilen kültürde görülürken, 50 °C inkübasyon sıcaklığında bakteri büyümesinin baskılandığı belirlendi. 45 °C'ta hücre büyümesinin 31. saatte en yüksek değerine (6,8 A<sub>600</sub>) ulaştığı, kültürün sonlandırıldığı 48. saate dek aynı düzeyde kaldığı görüldü (Şekil 6.5). 50 °C'ta A<sub>600</sub> değerinin yavaşça artarak 48. saatin sonunda ancak 2,27 değerine ulaştığı, enzim aktivitenin ise 24. saatten sonra bütünüyle baskılandığı belirlendi (Şekil 6.5 ve Şekil 6.6). 37 °C inkübasyon sıcaklığında ise; enzim aktivitenin görüldüğü 24. saatte 3,64 A<sub>600</sub> olan hücre büyümesinin, 48. saatin sonunda 5,51 değerine ulaştığı, buna karşın enzim aktivitenin aynı düzeylerde kaldığı görüldü (Şekil 6.5 ve Şekil 6.6).



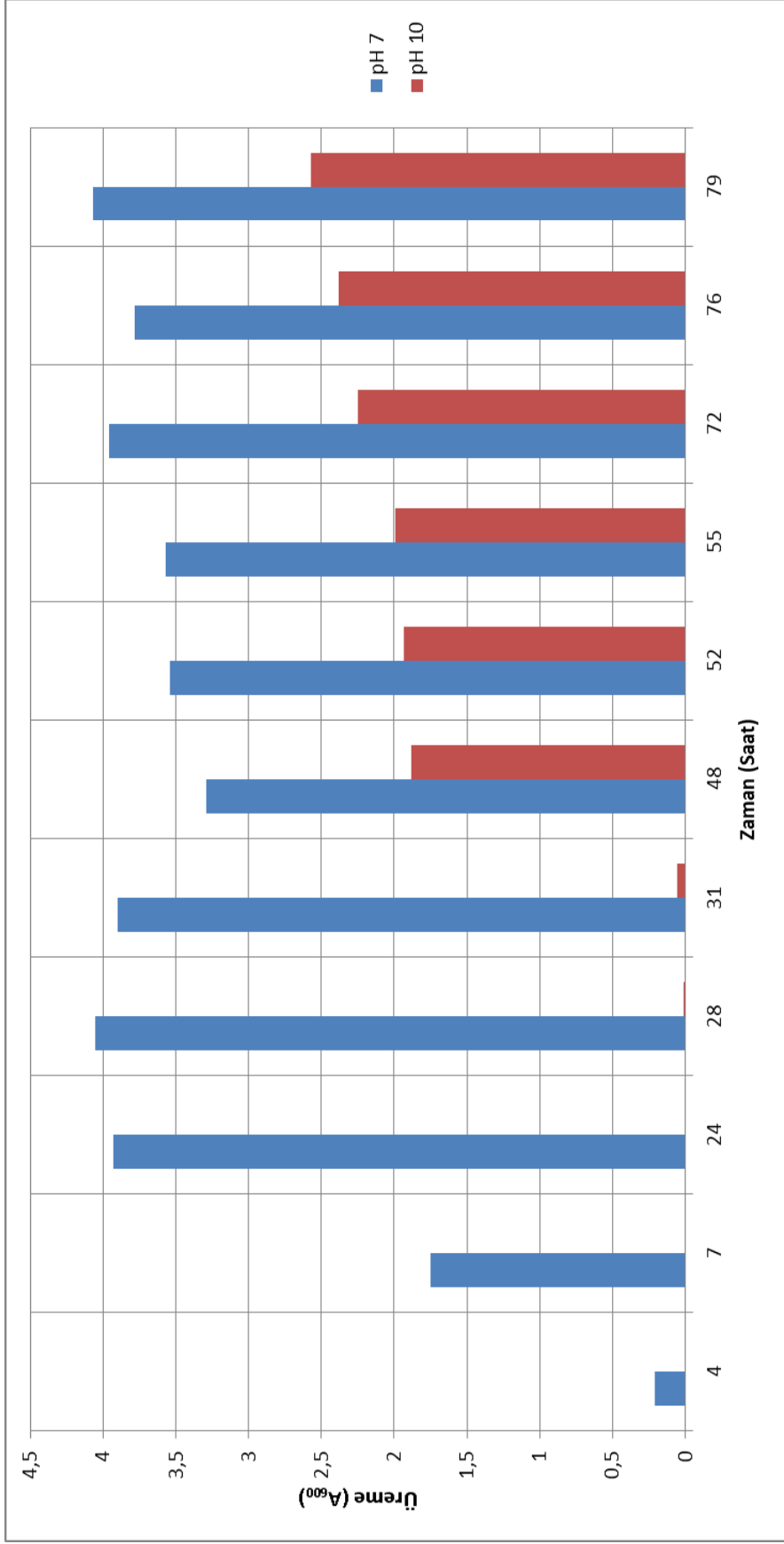
Şekil 6.5: Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen *Bacillus* sp. P22 kültürlerinin 48 saatlik hücre büyümesi grafiği.



Şekil 6.6: Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen *Bacillus* sp. P22 kültürlerinin 48 saatlik alkalen proteaz aktivitesi grafiği.

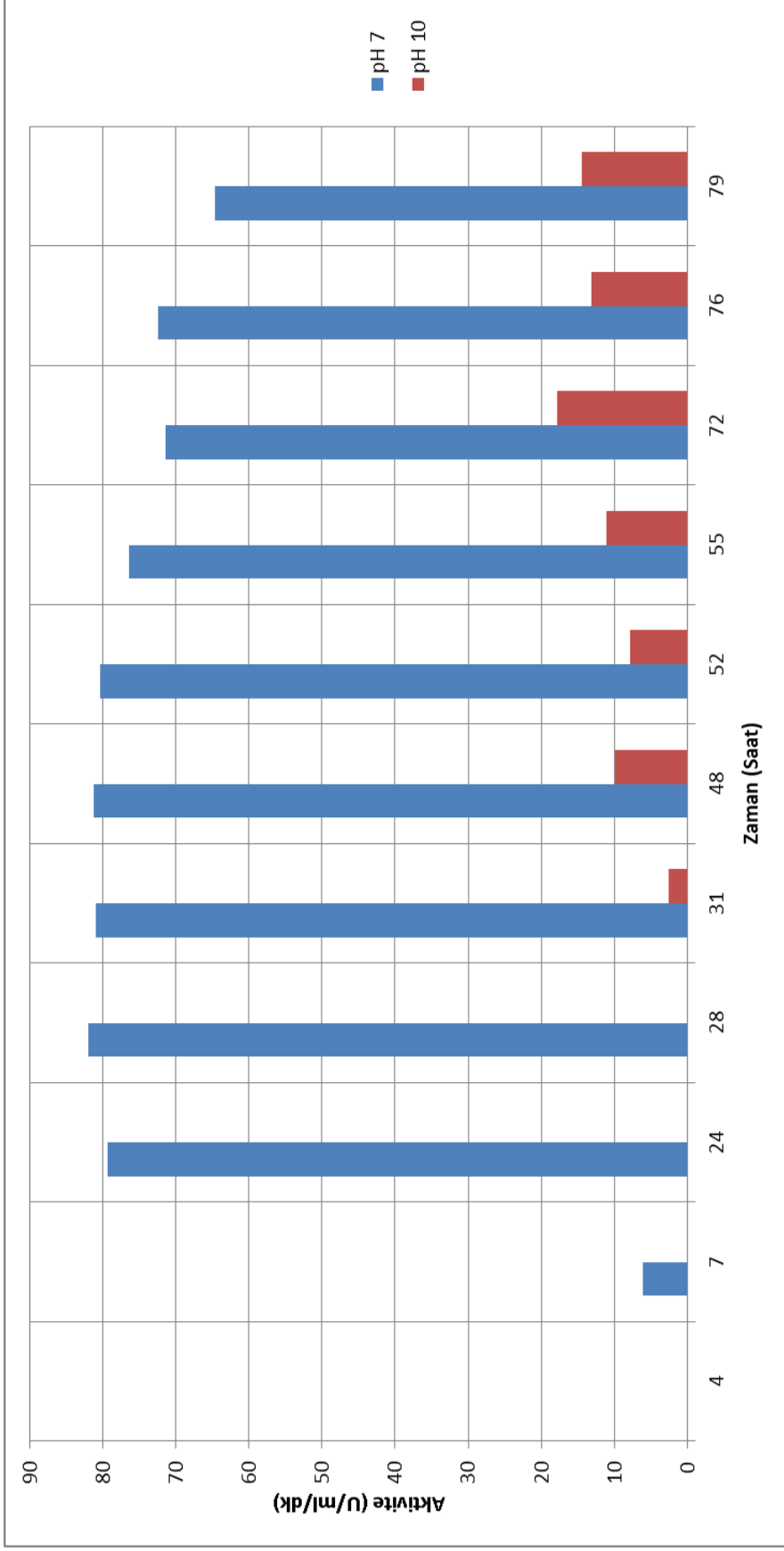
## 6.2.2. Besi yeri pH'sının Alkalen Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi

Besi yeri başlangıç pH'sının *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının üretimi üzerine etkilerinin incelendiği bu çalışmada; bakteriler pH 7 ve pH 10 değerlerinde hazırlanan % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yerlerinde 79 saat boyunca inkübe edildiler. Çalışmanın sonucunda elde edilen verilerle hazırlanan büyüme eğrisi ve enzimatik aktivite grafikleri Şekil 6.7 ve Şekil 6.8'de görülmektedir. Buna göre; nötral pH'da hücre büyümesi ve proteaz aktivitesinin zamana bağlı olarak paralel bir şekilde arttığı, 28. saatte hücre büyümesinin (3,93 A<sub>600</sub>) ve aktivitenin (81,88 U/ml/dk) en yüksek değerlerine ulaştığı; hücre büyümesinin çalışmanın sonuna dek (79. saat) bu düzeylerde kaldığı, buna karşın proteaz aktivitesinin 52. saatten sonra yavaşça azalarak 64,64 U/ml/dk'ya düştüğü belirlendi (Şekil 6.8). Başlangıç pH değerinin 10 olduğu besi yeri ile gerçekleştirilen çalışmada ise; 31. saatte başlayan hücre büyümesinin bu saatten sonra hızla artarak 48. saatte 1,88 A<sub>600</sub> değerine ulaştığı, sonrasında yavaşlayarak çalışmanın sonunda 2,57 A<sub>600</sub> değerine vardığı görüldü (Şekil 6.7). Proteaz aktivitesinin de benzer şekilde 31. saatten sonra ani bir artış gösterdiği ve inkübasyonun 72. saatinde 17,82 U/ml/dk değerine ulaştığı belirlendi (Şekil 6.8). Bu çalışma sonucunda, nötral pH'daki besi yeri ile çalışmalara devam edilmesine karar verildi.



Şekil 6.7: *Bacillus* sp. P22 soyunun başlangıç pH değeri 7 ve 10 olan % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yerindeki 79 saatlik hücre büyümesi grafiği.





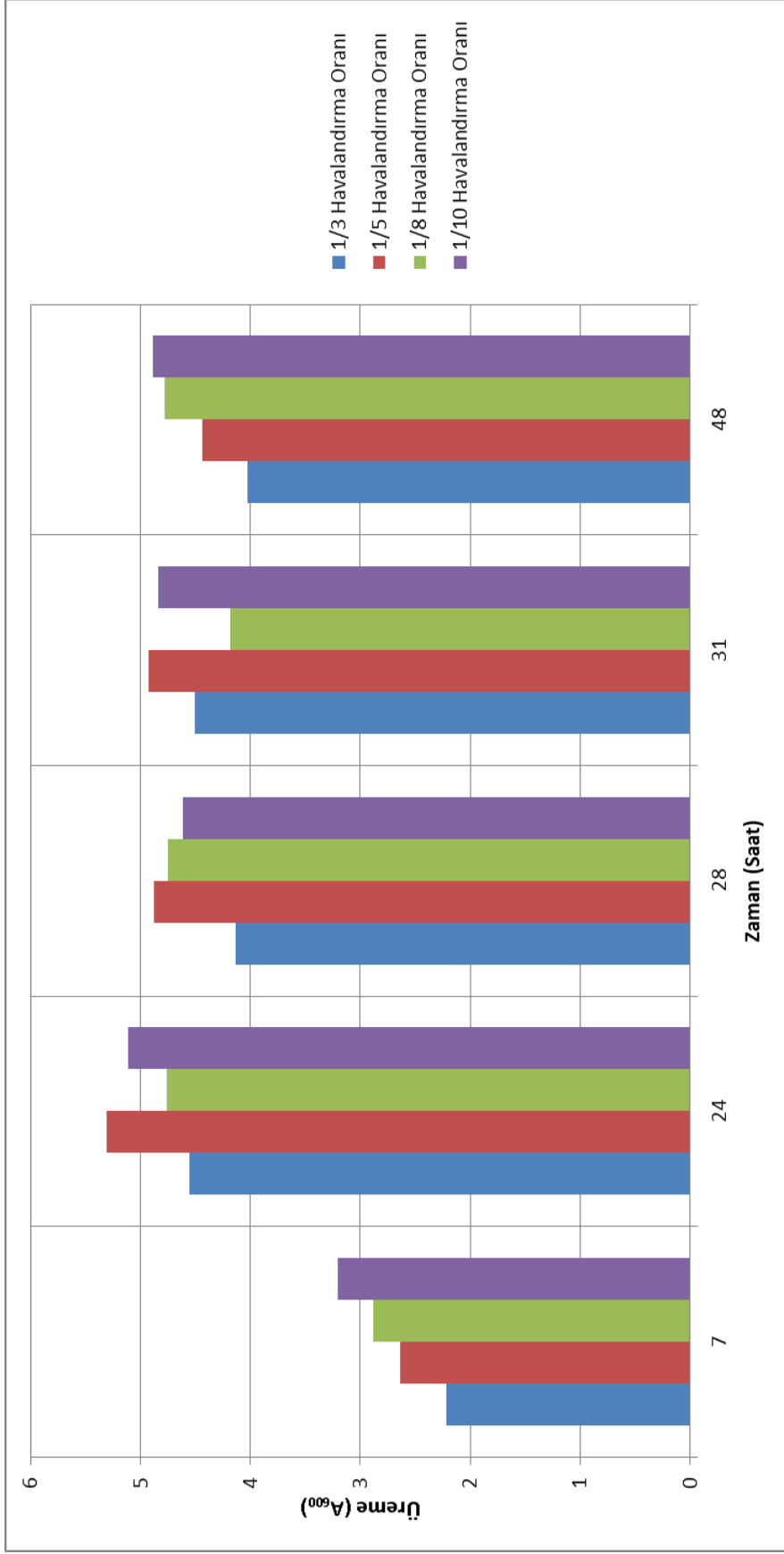
Şekil 6.8: *Bacillus* sp. P22 soyunun başlangıç pH değeri 7 ve 10 olan % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yerindeki 79 saatlik enzimatik aktivite grafiği.

### 6.2.3. Havalandırma Oranı ve Çalkalama Hızının Alkalen Proteaz Üretimi Üzerine Etkileri

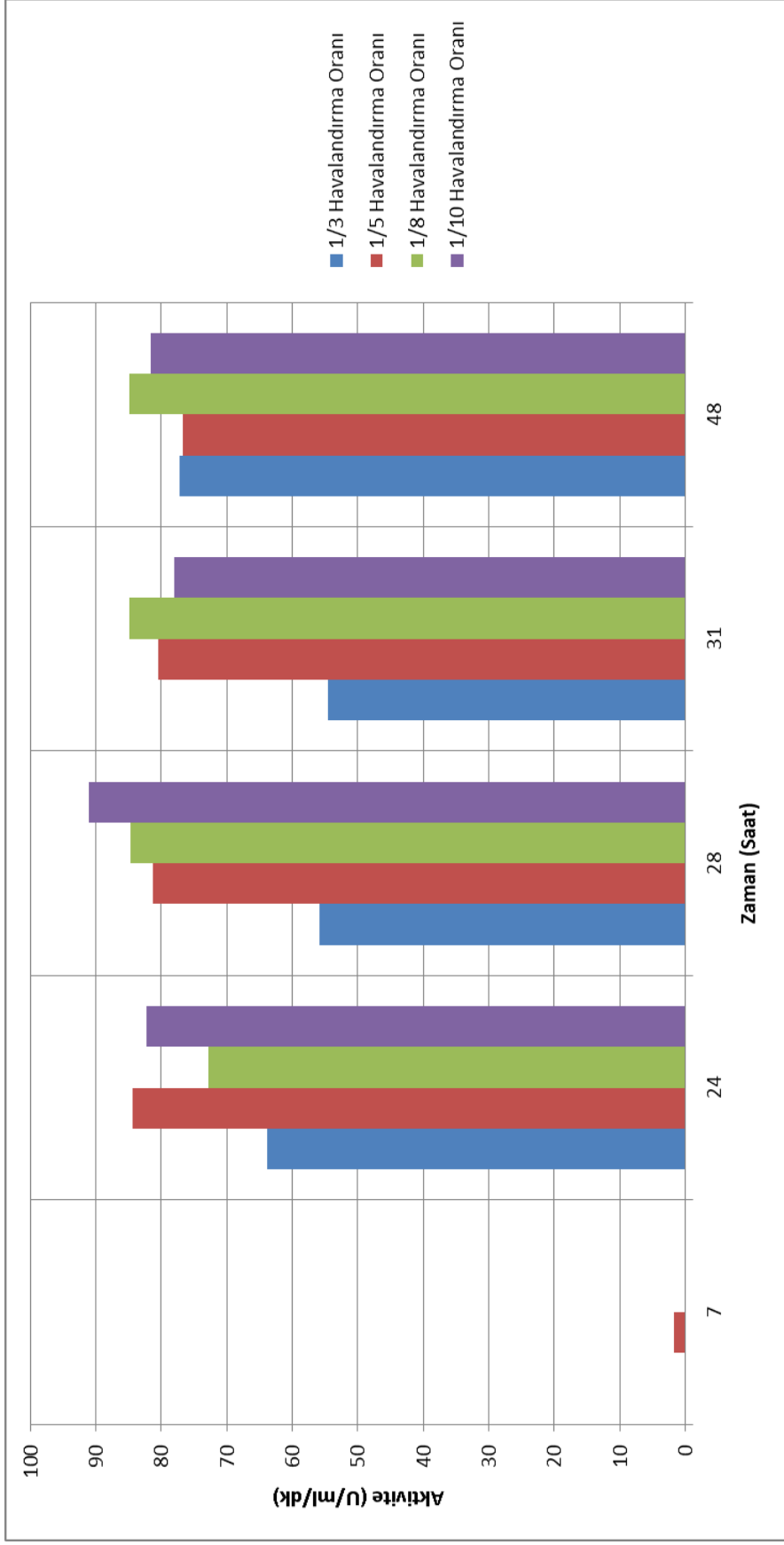
Bu çalışmada çeşitli havalandırma oranlarının hücre büyümesi ve alkalen proteaz üretimine etkileri belirlendi. Buna göre; hücre büyümesinin her koşulda benzer düzeylerde (4,03 – 5,31 A<sub>600</sub>) olduğu, buna karşın proteaz üretiminin 1/5, 1/8 ve 1/10 havalandırma oranlarının kullanıldığı kültürlerde en yüksek ve birbirleriyle benzeşik değerlerde olduğu; 1/3 havalandırma oranında ise enzimatik aktivitenin ilk 31 saatte diğer kültürlerle görece genel olarak % 20-25 daha düşük olduğu, ancak 48. saatte diğer kültürlerle aynı düzeylere ulaştığı görüldü (Şekil 6.9 ve Şekil 6.10). Kültürün 24. saatinde en yüksek proteaz aktivitesi (84,32 U/ml/dk) veren 1/5 havalandırma oranına sahip kültürün aktivitesinin 100 kabul edilerek hesaplandığı göreceli aktivite değerleri karşılaştırıldığında; 1/10 havalandırmaya sahip kültürde göreceli aktivitenin % 97,5 ile 1/5 oranında havalandırmaya sahip kültürün aktivitesine çok yakın olduğu; 1/8 oranında havalandırmaya sahip kültürün göreceli aktivitesinin % 86,4; 1/3 havalandırma oranında ise bu değer % 75,6 olduğu görülmektedir (Tablo 6.3). Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, 1/5 ve 1/10 havalandırma oranları öne çıkmakla birlikte, daha fazla kültür hacmine olanak sağlaması nedeniyle çalışmalarda 1/5 havalandırma oranının kullanılmasına karar verildi.

Tablo 6.3: Farklı havalandırma oranlarının kullanıldığı *Bacillus* sp. P22 kültürlerinde 24. saat sonunda elde edilen hücre büyümesi, aktivite ve göreceli aktivite değerleri.

Havalandırma Oranı	1/3	1/5	1/8	1/10
Hücre Büyümesi (A <sub>600</sub> )	4,55	5,31	4,76	5,11
Aktivite (U/ml/dk)	63,82	84,31	72,87	82,28
Göreceli Aktivite (%)	75,6	100	86,4	97,5



Şekil 6.9: Farklı havalandırma oranına sahip kültürlerde büyütülen *Bacillus* sp. P22 soyunun 48 saatlik hücre büyümesi grafiği.

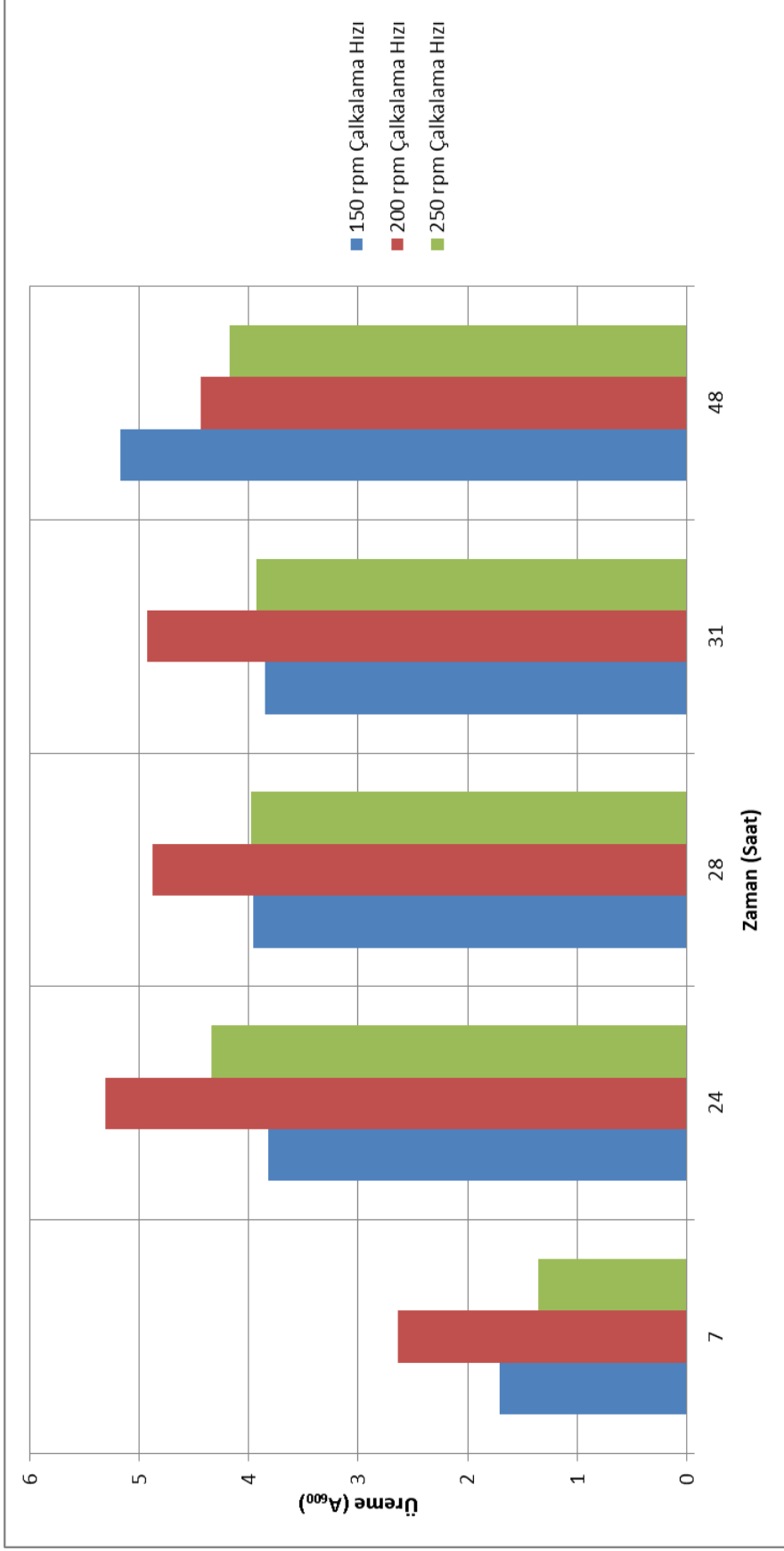


Şekil 6.10: Farklı havalandırma oranına sahip kültürlerde büyütilen *Bacillus* sp. P22 soyunun 48 saatlik enzim aktivitesi grafiği.

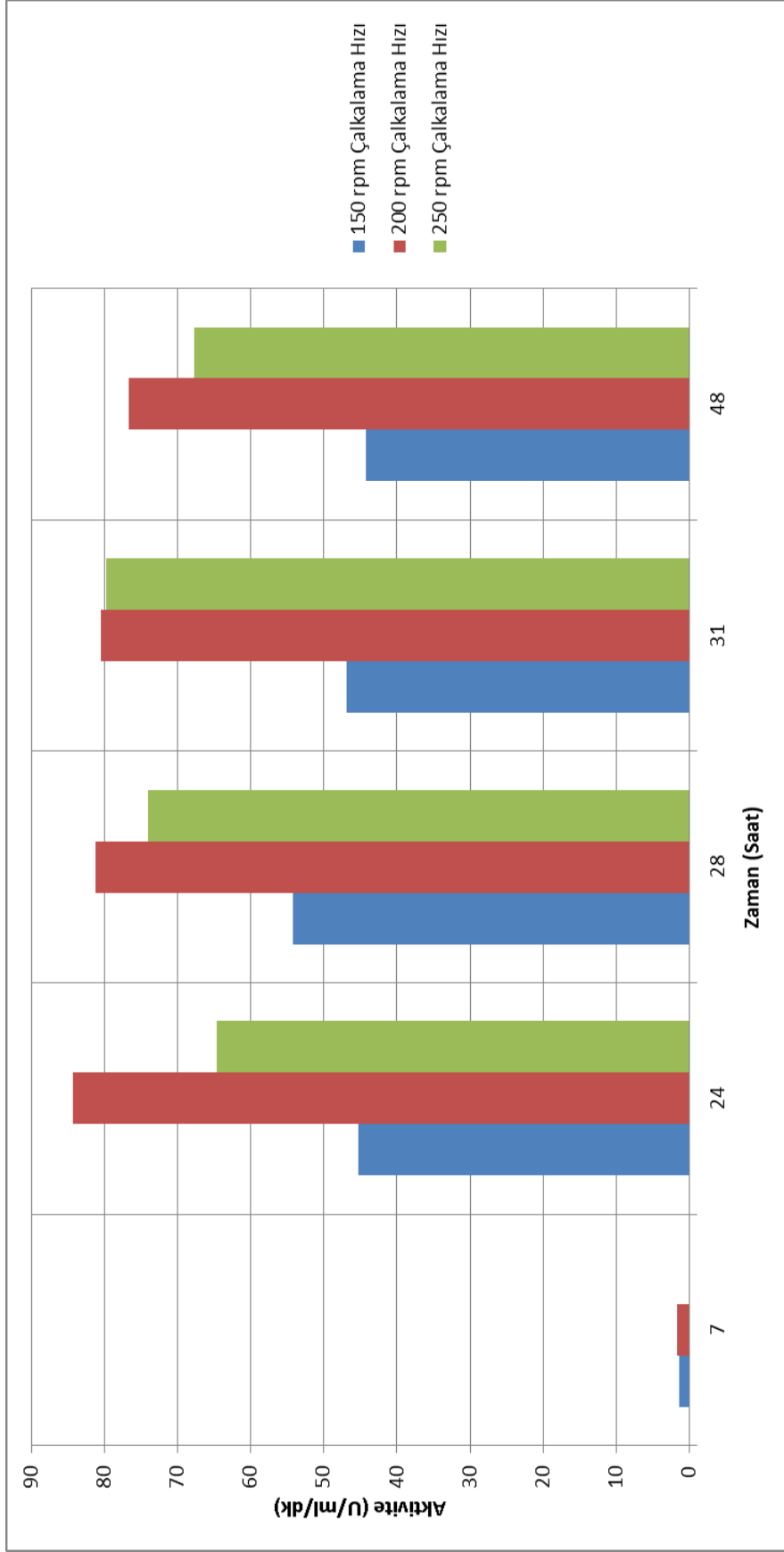
Çalkalama hızının alkalen proteaz üretimi üzerine etkilerinin irdelendiği çalışma 150, 200 ve 250 rpm çalkalama hızlarında gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar Tablo 6.4 ile Şekil 6.11 ve Şekil 6.12'de gösterildi. Her üç çalışmada da en yüksek enzimatik aktivite hücrelerin durgun faza girdiği 24. saatten sonra görüldü. Proteaz aktivitesinin en yüksek olduğu 24-31. saatler arasında hücre büyümesi; 150 ve 250 rpm çalkalama hızlarında gerçekleştirilen çalışmalarda, ortalama 4.0  $A_{600}$ ; 200 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilen çalışmada ise 5.0  $A_{600}$  bulundu (Şekil 6.11). En yüksek proteaz aktivitesi 200 ve 250 rpm çalkalama hızlarında yaklaşık 80 U/ml/dk; 150 rpm çalkalama hızında ise 45 U/ml/dk görüldü (Şekil 6.12). 200 ve 250 rpm çalkalama hızlarında elde edilen enzimatik aktivite değerleri önemli ölçüde değişmemekle birlikte, 200 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilen çalışmada en yüksek aktivite değerlerine kültürün 24. saatinde ulaşıldığı ve ilerleyen saatlerde de dikkate değer bir değişiklik görülmediğinden, çalışmaların buraya dek kullanılmış olan 200 rpm çalkalama hızında sürdürülmesine karar verildi.

Tablo 6.4: Farklı çalkalama hızlarında büyütülen *Bacillus* sp. P22 kültürlerinde 24. saat sonunda elde edilen hücre büyümesi, aktivite ve göreceli aktivite değerleri.

Çalkalama Hızı	150 rpm	200 rpm	250 rpm
Hücre Büyümesi ( $A_{600}$ )	3,82	5,31	4,34
Aktivite (U/ml/dk)	45,28	84,31	64,64
Göreceli Aktivite (%)	53,7	100	76,6



Şekil 6.11: Farklı çalkalama hızlarında büyütilen *Bacillus* sp. P22 kültürlerinde 48 saatlik hücre büyümesi grafiği.



Şekil 6.12: Farklı çalkalama hızlarında büyütülen *Bacillus* sp. P22 kültürlerinde 48 saatlik enzim aktivitesi grafiği.

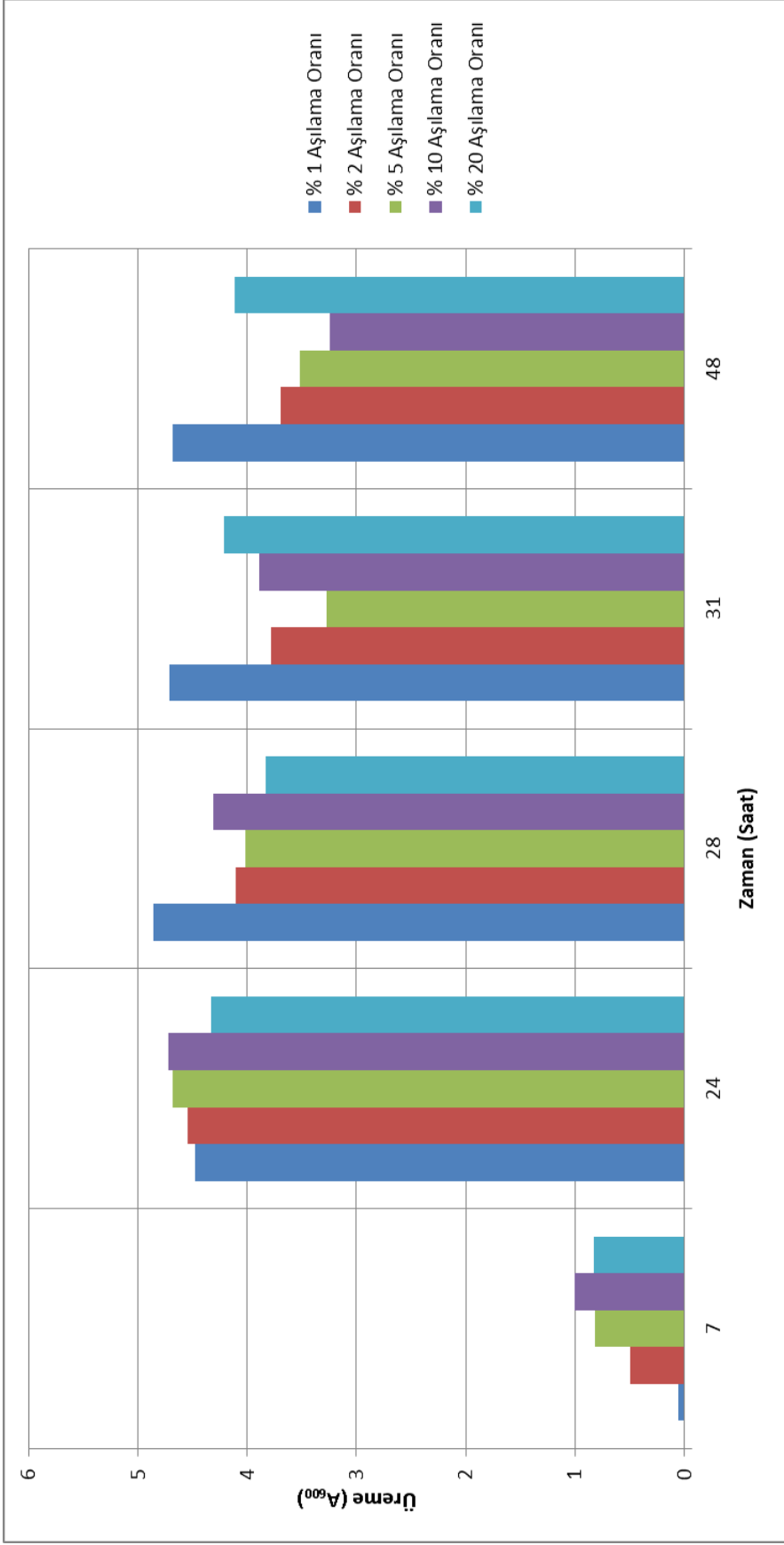
#### 6.2.4. Aşılama Oranının Alkalen Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi

Aşılama oranının alkalen proteaz üretimine etkisinin irdelendiği çalışmada % 1, 2, 5, 10 ve 20 aşılama oranları ile başlatılan kültürlerin hücre büyümesi ve enzim aktiviteleri 48 saat boyunca belirli aralıklarla alınan örneklerle izlendi. Şekil 6.13 ve Şekil 6.14’de görülen sonuçlara göre; aşılama oranının hücre büyümesini önemli ölçüde etkilemediği, kültürlerin hepsinde en yüksek enzimatik aktivitenin büyümenin durgun fazında 24 – 48 saat aralığında olduğu belirlendi. En yüksek alkalen proteaz aktivitesi (81,83 U/ml/dk) % 1 aşılama oranının kullanıldığı kültürde 24. saatte belirlendi. Aşılama oranının artmasıyla enzimatik aktivitede düşüş gözlemlendi. % 1 ve % 2 aşılama oranlarının kullanıldığı kültürlerde proteaz aktivitesinin önemli ölçüde değişmediği (ikinci durumda % 5 daha az); % 5 aşılama oranında aktivitenin, en yüksek aktivite değerine görece yaklaşık % 15; % 10 aşılama oranında % 20 ve % 20 aşılama oranında ise % 30 daha düşük olduğu belirlendi. Bundan sonraki çalışmalarda % 1 aşılama oranının kullanılması kararlaştırıldı.

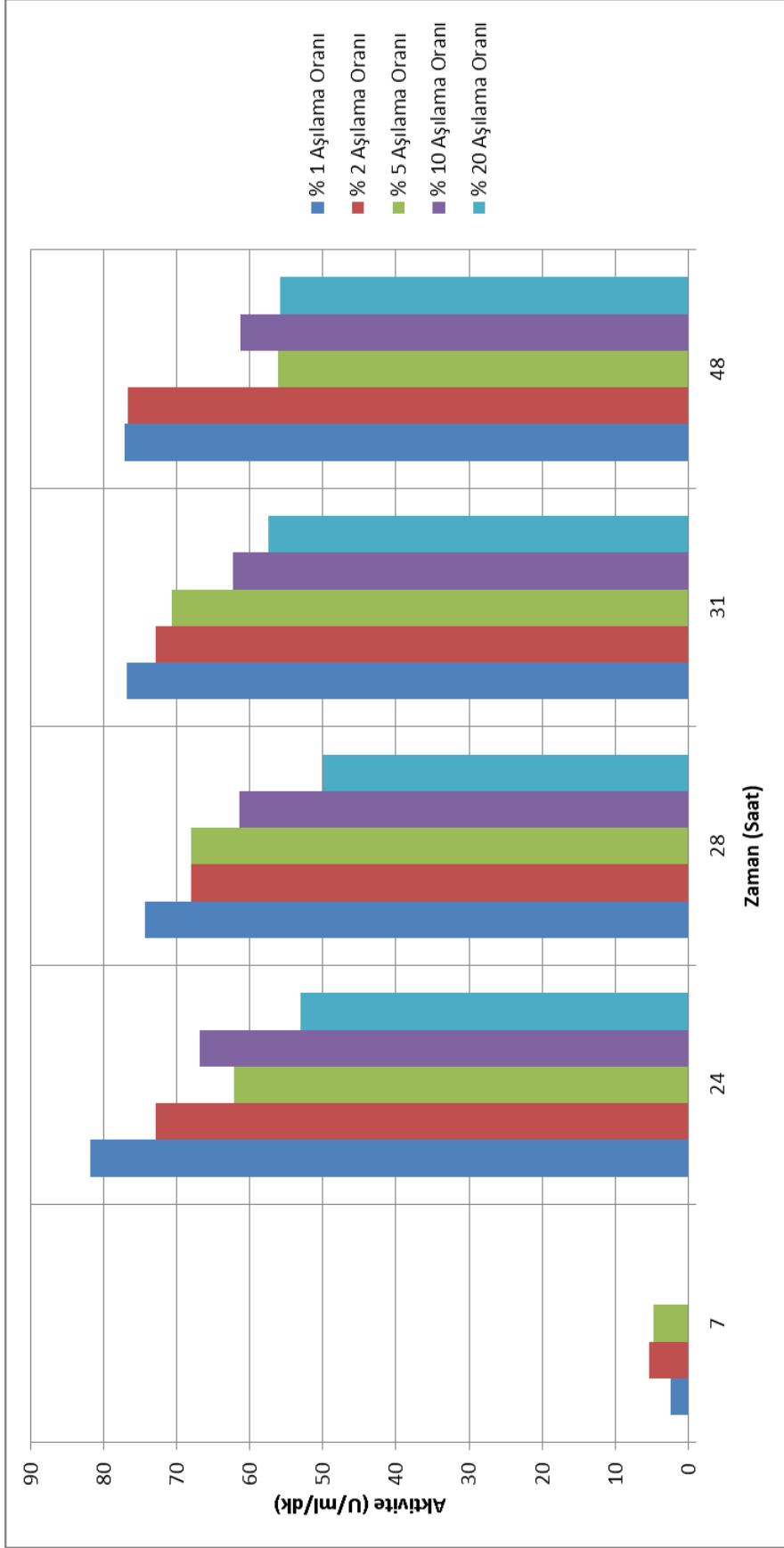
Tablo 6.5: Farklı aşılama oranlarının kullanıldığı *Bacillus* sp. P22 kültürlerinde 24. saat sonunda elde edilen hücre büyümesi, aktivite ve göreceli aktivite değerleri.

Aşılama Oranı	% 1	% 2	% 5	% 10	% 20
Hücre Büyümesi ( $A_{600}$ )	4,48	4,54	4,68	4,72	4,33
Aktivite (U/ml/dk)	81,83	72,82	62,19	66,81	53,06
Göreceli Aktivite (%)	100	88,9	76	81,6	64,8





Şekil 6.13: Farklı aşılama oranlarının kullanıldığı *Bacillus* sp. P22 kültürlerinde 48 saatlik hücre büyümesi grafiği.



Şekil 6.14: Farklı aşılama oranlarının kullanıldığı *Bacillus* sp. P22 kültürlerinde 48 saatlik enzim aktivitesi grafiği.

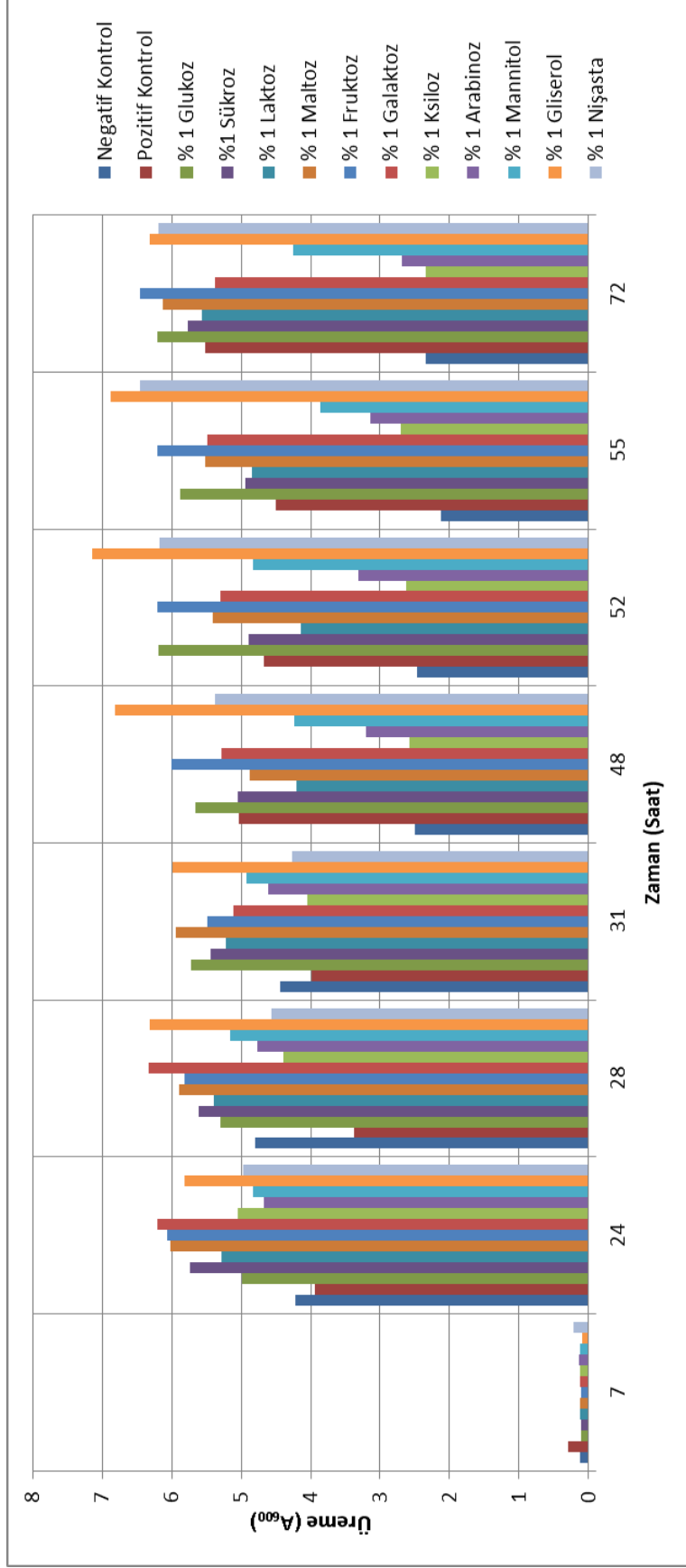
### 6.2.5. Çeşitli Karbon Kaynaklarının Alkalen Proteaz Üretimi Üzerine Etkileri

Çeşitli karbon kaynaklarının *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının üretimi üzerine etkilerinin irdelendiği bu çalışma; % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri içeriğindeki süt tozu yerine, aynı oranda glikoz, sukroz, laktoz, maltoz, fruktoz, galaktoz, ksiloz, arabinoz, mannitol, gliserol ve nişasta içeren besi yerlerinde gerçekleştirildi. Çalışmada; % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri pozitif kontrol, süt tozu içermeyen Horikoshi besi yeri ise negatif kontrol olarak kullanıldı. Hücre büyümesi ve enzimatik aktivite 72 saatlik inkübasyon sürecinde belirli aralıklarla alınan örneklerle izlendi ve sonuçlar Şekil 6.15 ve Şekil 6.16'da gösterildi. Buna göre; pozitif kontrol olarak kullanılan % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yerinde enzimatik aktivitenin, her zaman olduğu gibi logaritmik fazın sonlarına doğru, 24. saatten itibaren en yüksek değerlerine ulaştığı ve 72. saatin sonuna dek bu değerleri koruduğu görüldü. Negatif kontrol olarak kullanılan süt tozu içermeyen Horikoshi besi yerinde ise hemen hiç enzimatik aktivite görülmedi. Çalışmada kullanılan karbon kaynaklarından, nişasta dışında hiç birisinin proteaz üretimini uyarmadığı, nişastalı besi yerinde ise aktivitenin süt tozu içeren besi yerine görece yaklaşık % 75 daha az olduğu belirlendi (Şekil 6.16 ve Tablo 6.6). Kültürlerin hepsinde logaritmik fazın 24-31. saatler arasında sonlandığı ve hücre büyümesinin en yüksek değerine gliserollü besi yerinde ulaştığı belirlendi (Şekil 6.15).

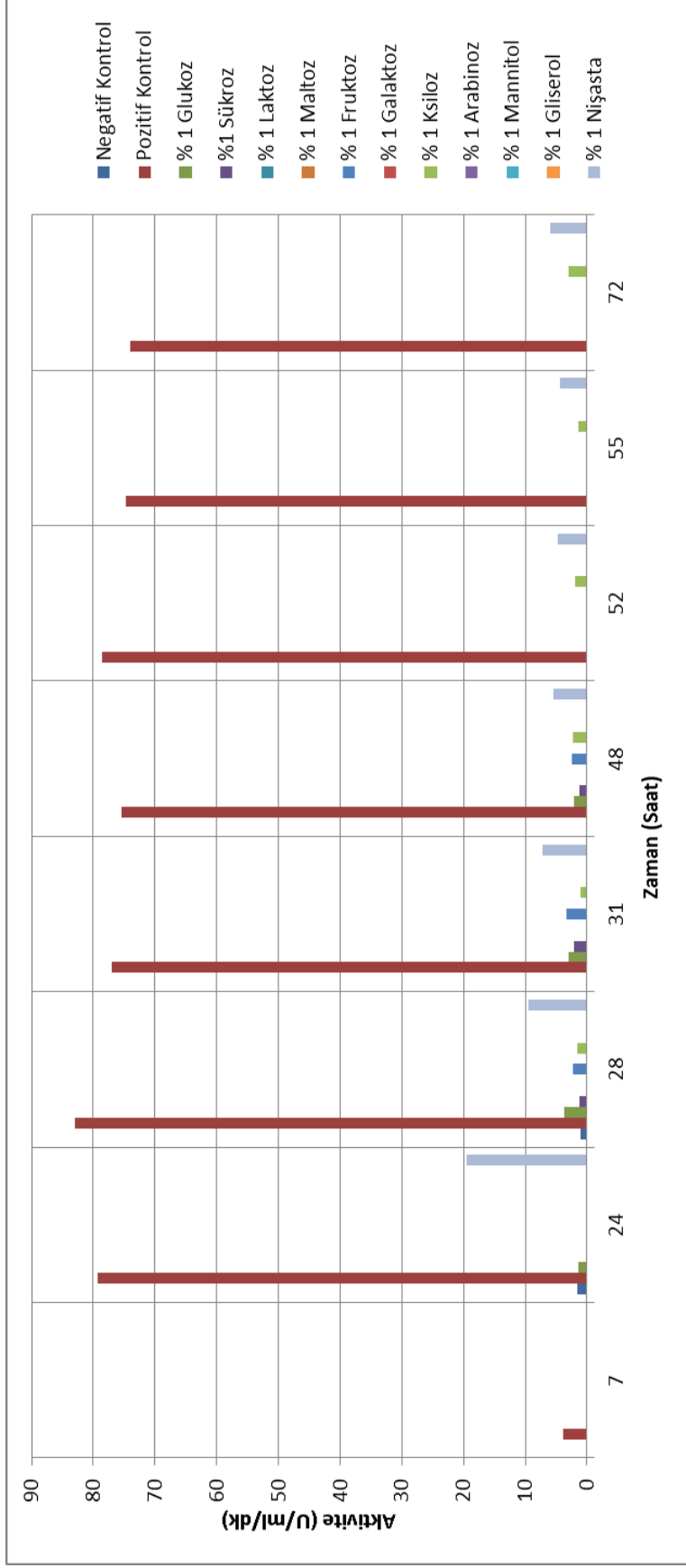
Farklı karbon kaynaklarının proteaz üretimine etkilerinin irdelendiği bu çalışmada negatif kontrol olarak kullanılan ve süt tozu içermeyen yalnızca maya özütü ve Proteoz pepton içeren Horikoshi besi yerinde hiç aktivite gözlenmemesi, ortama eklenen karbon kaynaklarından yalnızca süt tozunun proteaz üretimini önemli ölçüde uyarması nedeniyle *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının üretimi için besi yerinde karbon kaynağı olarak süt tozunun kullanımına karar verildi.

Tablo 6.6: Farklı karbon kaynaklarının *Bacillus* sp. P22 alkale proteazı üretimi üzerine etkisinin irdelendiği çalışmada 24. saat sonunda elde edilen hücre büyümesi, aktivite ve göreceli aktivite değerleri. Negatif kontrol: Süt tozu içermeyen Horikoshi besi yeri; Pozitif kontrol: % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri.

Karbon Kaynağı	Hücre Büyümesi (A <sub>600</sub> )	Aktivite (U/ml/dk)	Göreceli Aktivite (%)
Negatif Kontrol	4,22	1,49	1,88
Pozitif Kontrol	3,94	79,29	100
% 1 Glikoz	4,98	1,44	1,82
% 1 Sükroz	5,74	0	0
% 1 Laktoz	5,28	0	0
% 1 Maltoz	6,02	0	0
% 1 Fruktoz	6,07	0	0
% 1 Galaktoz	6,21	0	0
% 1 Ksiloz	5,04	0	0
% 1 Arabinoz	4,68	0	0
% 1 Mannitol	4,83	0	0
% 1 Gliserol	5,81	0	0
% 1 Nişasta	4,97	19,45	24,5



Şekil 6.15: Farklı karbon kaynaklarının *Bacillus* sp. P22 soyunun büyümesi üzerine etkisi. Negatif kontrol: Süt tozu içermeyen Horikoshi besi yeri; Pozitif kontrol: % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri.



Şekil 6.16: Farklı karbon kaynaklarının *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazı üretimi üzerine etkisi. Negatif kontrol: Süt tozu içermeyen Horikoshi besi yeri; Pozitif kontrol: % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri.

### 6.2.6. Çeşitli Organik Azot Kaynaklarının Alkalen Proteaz Üretimi Üzerine Etkileri

Bu çalışmada; % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri içeriğindeki % 0,5 maya özütü ve % 0,5 Proteoz pepton yerine, besi yerine % 1 oranında katılan çeşitli organik azot kaynaklarının hücre büyümesi ve alkalen proteaz üretimi üzerine etkileri irdelendi. Pozitif kontrol olarak % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri, negatif kontrol olarak ise maya özütü ve Proteoz pepton içermeyen Horikoshi besi yeri kullanıldı. 72 saat boyunca hücre büyümesi ve proteolitik aktivitenin izlendiği kültürlerde en yüksek hücre büyümesi maya özütünün kullanıldığı besi yerlerinde (% 1 maya özütü ile % 0,5 N-Z amin A ve % 0,5 maya özütü içeren besi yerleri) kaydedilirken; en düşük hücre büyümesi % 1 et özütü veya üre içeren besi yerleri ile hiç azot kaynağı içermeyen ve negatif kontrol olarak kullanılan besi yerinde belirlendi. Azot kaynağı olarak N-Z amin A'nın tek başına kullanıldığı besi yerinde gözlenen üreme miktarının, maya özütü ile birlikte kullanılan besi yerinde gözlenene görece % 55-75 daha az olduğu saptandı. Maya özütünün tek başına % 1 oranında veya % 0,5 oranında maya özütünün % 0,5 N-Z amin A ile birlikte kullanıldığı besi yerlerinde üreme miktarlarında önemli bir fark görülmedi (Şekil 6.17).

Çalışmada negatif kontrol olarak kullanılan ve yalnızca süt tozu içeren Horikoshi besi yerinde gözlenen alkalen proteaz ativitiesinin, pozitif kontrol olarak kullanılan ve süt tozuna ek olarak, maya özütü ve Proteoz pepton içeren Horikoshi besi yerinde gözlenenden yaklaşık % 65 daha az olduğu görüldü. Maya özütünün % 1 oranında, % 0,5 maya özütü ve % 0,5 Proteoz pepton yerine kullanılmasının proteaz üretiminin gecikmesine neden olduğu, ancak elde edilen en yüksek aktivite değerinde önemli bir değişikliğe yol açmadığı belirlendi. Buna karşın, proteoz peptonun tek başına % 1 oranında kullanıldığı besi yerinde elde edilen proteaz ativitiesinin, maya özütü ve Proteoz peptonun birlikte kullanıldığı besi yerine görece % 80 daha düşük olduğu gözlemlendi. % 1 oranında et peptonu veya soytonun proteaz üretimini Proteoz peptona görece yaklaşık % 60-65 daha iyileştirdiği görüldü. % 1 tripton veya % 0,5 N-Z amin A ve % 0,5 maya özütünün kullanıldığı besi yerlerinin alkalen proteaz üretimi üzerine etkilerinin, maya özütünün % 1 oranında kullanıldığı besi yeri ile benzer olduğu görüldü. Buna karşın, N-Z amin A'nın tek başına kullanıldığı besi yerinde elde edilen proteaz ativitiesi, maya özütü ile birlikte kullanılabildiğine görece % 35-50 daha düşük bulundu. Besi yerinde azot kaynağı olarak et

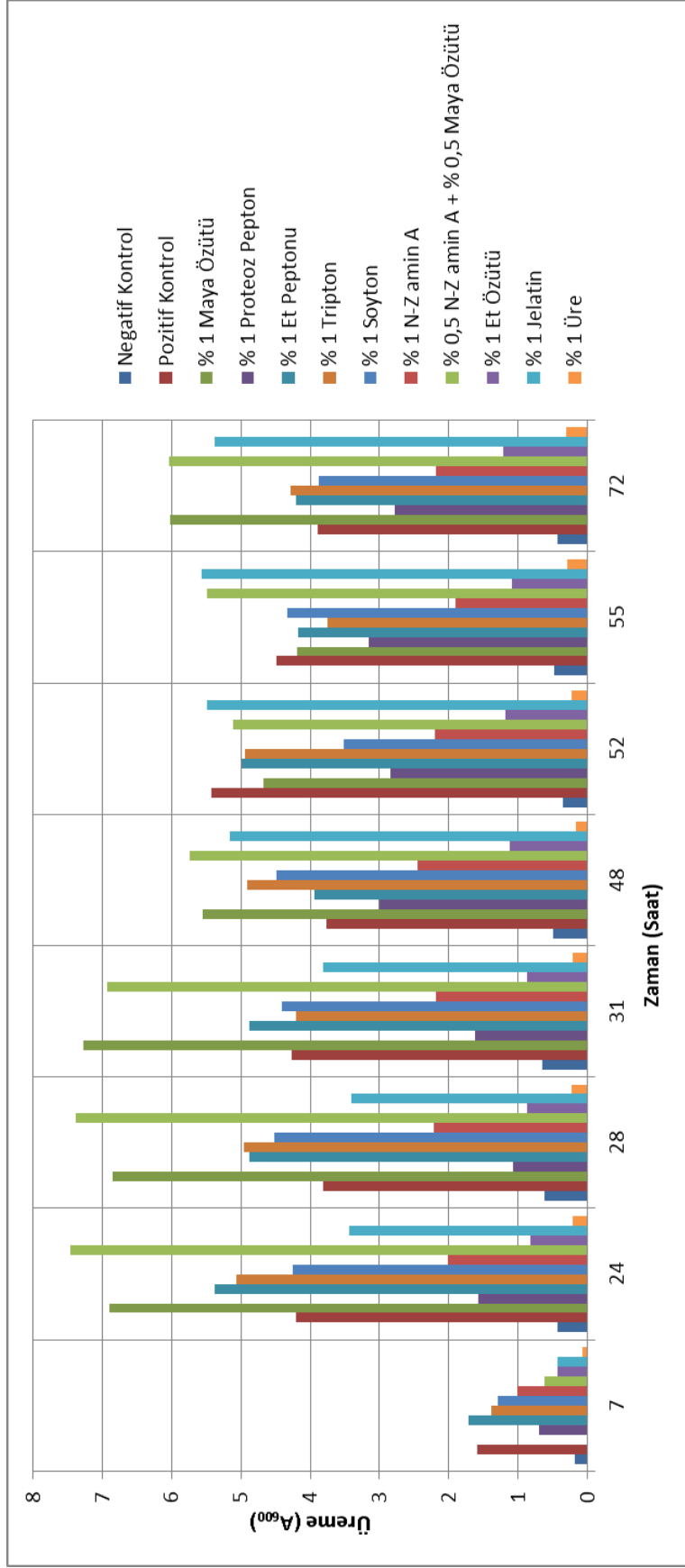
özütü veya jelatin kullanımının proteaz üretimini önemli ölçüde etkilemediği; üre kullanımının ise yaklaşık % 65 azalmaya neden olduğu görüldü (Şekil 6.18).

Farklı organik azot kaynaklarının *Bacillus* sp. P22 alkalin proteazının üretimi üzerine etkilerinin irdelendiği bu çalışma sonucunda; besi yerinde azot kaynağı olarak % 0.5 maya özütü ve % 0,5 Proteoz pepton kullanımının sürdürülmesine karar verildi.

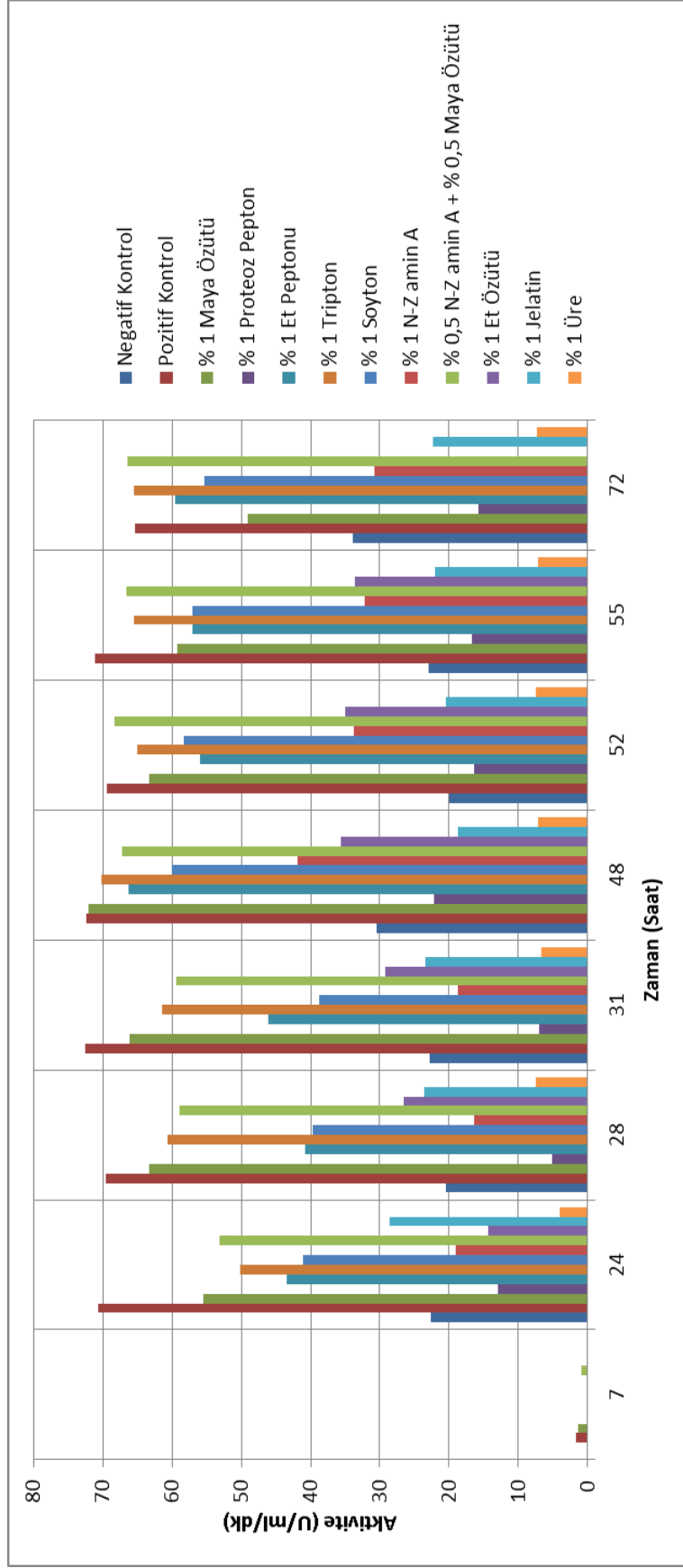
Tablo 6.7: Farklı organik azot kaynaklarının *Bacillus* sp. P22 alkalin proteazı üretimi üzerine etkisinin irdelendiği çalışmada 24. saat sonunda elde edilen hücre büyümesi, aktivite ve göreceli aktivite değerleri. Negatif kontrol: Maya özütü ve Proteoz pepton içermeyen % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri; Pozitif kontrol: % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri.

Organik Azot Kaynağı	Hücre Büyümesi (A <sub>600</sub> )	Aktivite (U/ml/dk)	Göreceli Aktivite (%)
Negatif Kontrol	0,43	22,66	32
Pozitif Kontrol	4,2	70,61	100
% 1 Maya Özütü	6,89	55,54	78,6
% 1 Proteoz Pepton	1,57	12,98	18,3
% 1 Et peptonu	5,37	43,47	61,5
% 1 Tripton	5,07	50,12	70,9
% 1 Soyton	4,25	41,02	58,1
% 1 N-Z amin A	2,01	18,99	26,9
% 0,5 N-Z amin A + % 0,5 Maya Öz.	7,45	53,06	75,1
% 1 Et Özütü	0,82	14,33	20,3
% 1 Jelatin	3,43	28,58	40,4
% 1 Üre	0,21	4,02	5,7





Şekil 6.17: Farklı organik azot kaynaklarının *Bacillus* sp. P22 soyunun büyümesi üzerine etkisi. Negatif kontrol: Maya özütü ve Proteoz pepton içermeyen Horikoshi besi yeri; Pozitif kontrol: % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri.



Şekil 6.18: Farklı organik azot kaynaklarının *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazı üretimi üzerine etkisi. Negatif kontrol: Maya özü ve Proteoz pepton içermeyen Horikoshi besi yeri; Pozitif kontrol: % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri.

### 6.2.7. Çeşitli İnorganik Azot Kaynaklarının Alkalen Proteaz Üretimi Üzerine Etkileri

% 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri içeriğindeki % 0,5 maya özütü ve % 0,5 Proteoz pepton yerine, besi yerine % 1 oranında eklenen çeşitli inorganik azot kaynaklarının hücre büyümesi ve alkalen proteaz üretimi üzerine etkilerinin irdelendiği bu çalışmada kültürler 72 saat boyunca hücre büyümesi ve proteolitik aktivite açısından izlendi ve sonuçlar Şekil 6.19 ve Şekil 6.20’de gösterildi. Pozitif kontrol olarak süt tozu, maya özütü ve Proteoz pepton içeren Horikoshi besi yerinin, negatif kontrol olarak ise maya özütü ve Proteoz pepton içermeyen Horikoshi besi yerinin kullanıldığı bu çalışmada; pozitif kontrol dışındaki kültürlerin tümünde üremenin çok düşük olduğu görüldü.  $A_{600}$  değerleri pozitif kontrol olarak kullanılan besi yerinde 5.0 düzeylerindeyken, % 1 asparajin içeren besi yerinde 2.0, diğer besi yerlerinde ise 0,2 – 0,5 düzeylerinde belirlendi (Şekil 6.19).

Proteaz üretiminin, pozitif kontrol olarak kullanılan % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yerinde 7. saatten itibaren başladığı ve en yüksek düzeylerine eriştiği 24. saatten 72. saatin sonuna dek bu düzeylerde (75-82 U/ml/dk) kaldığı; azot kaynağı içermeyen negatif besi yerinde ise proteaz üretiminin 24. saatten sonra belirginleşmeye başladığı, ancak enzimatik aktivitenin pozitif kontrole görece ancak % 30 düzeylerinde olduğu (25-35 U/ml/dk) belirlendi (Şekil 6.20).

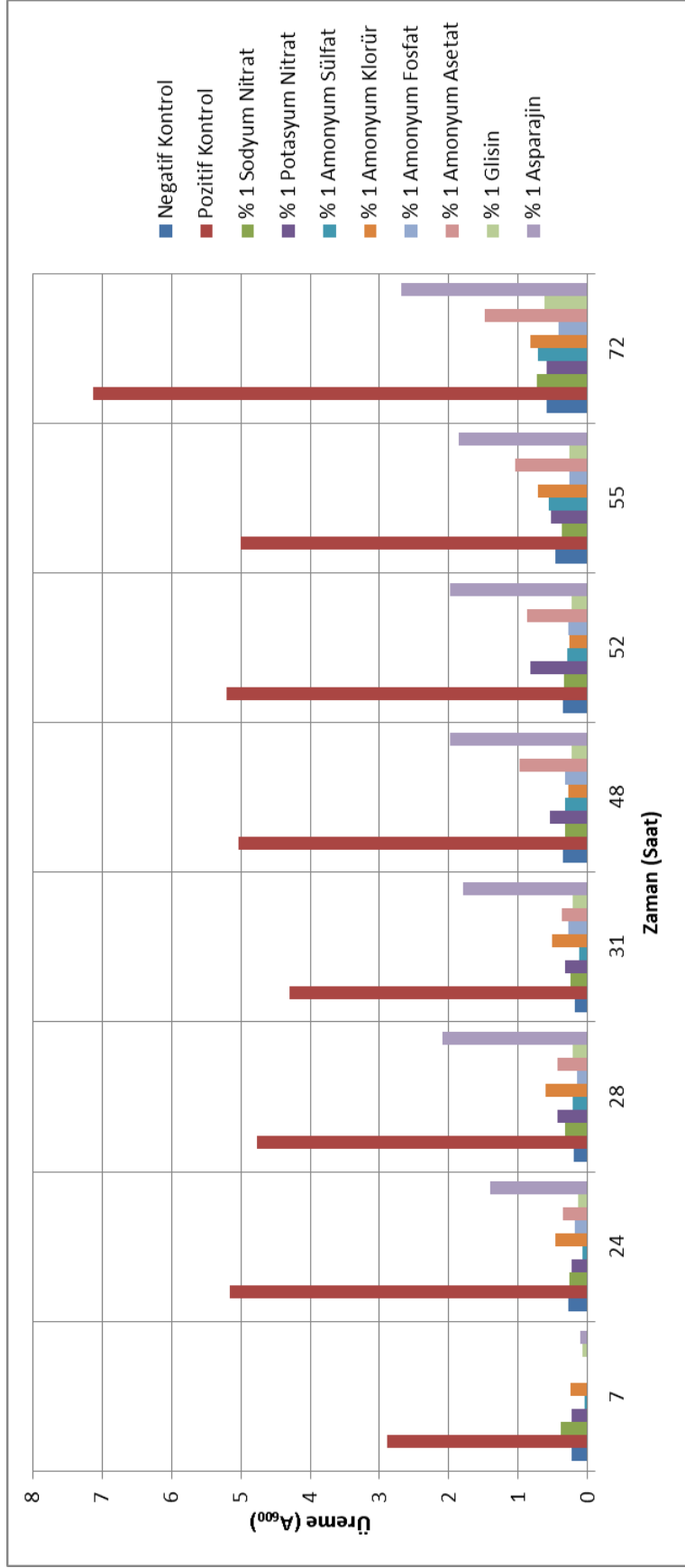
Kullanılan inorganik azot kaynaklarından, yalnızca, sodyum nitrat, potasyum nitrat, amonyum sülfat, amonyum klorür ve asparajin ile belirgin düzeylerde proteolitik aktivite saptanırken; diğerleri (amonyum fosfat, amonyum asetat ve glisin) ile dikkate değer bir aktivite belirlenemedi (Şekil 6.20). İnorganik azot kaynağı olarak sodyum nitrat ve potasyum nitrat içeren besi yerlerinde alkalen proteaz aktivitesinin (30 – 38 U/ml/dk) pozitif kontrolde elde edilen aktivite değerinin (73 – 82 U/ml/dk) yaklaşık % 40’ı kadar olduğu; benzer şekilde asparajin içeren besi yerinde gözlenen alkalen proteaz aktivitesinin (34 – 45 U/ml/dk) de pozitif kontrole görece yaklaşık % 50 daha düşük olduğu belirlendi. İnorganik azot kaynağı olarak amonyum sülfat ve amonyum klorürün kullanıldığı besi yerlerinde elde edilen proteolitik aktivitenin (20 – 30 U/ml/dk) ise, pozitif kontrolde elde edilenin ancak yaklaşık % 30’u kadar olduğu görüldü.

İnorganik azot kaynaklarının *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının üretimi üzerine etkilerinin irdelendiği bu çalışma sonucunda; besi yerine azot kaynağı olarak

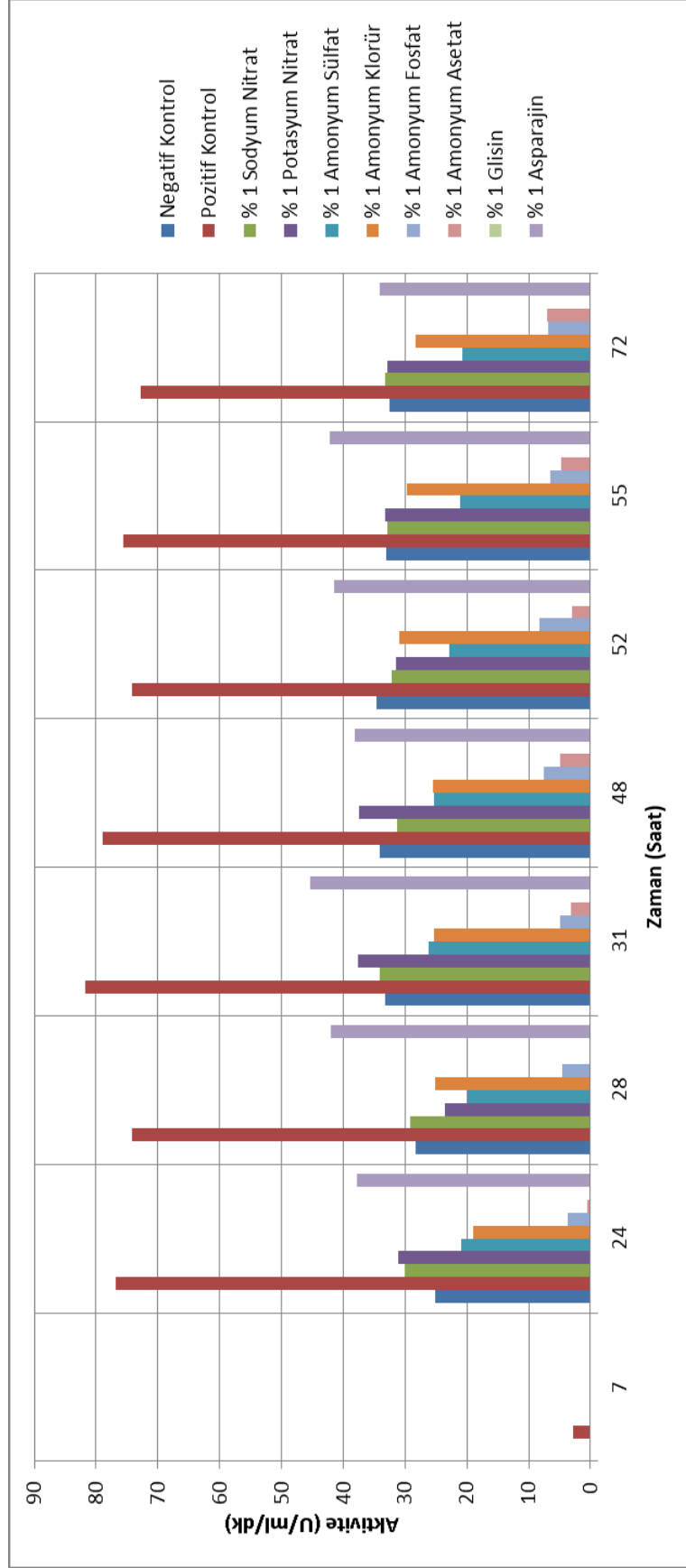
eklenen tuzların alkale proteaz üretimini artırmadığı görüldü. Azot içeren tuzların kullanıldığı besi yerlerinde elde edilen proteolitik aktivite değerlerinin, ancak azot kaynağı içermeyen ve negatif kontrol olarak kullanılan besi yerinde elde edilen aktivite değeri kadar olduğu belirlendi (Şekil 6.20).

Tablo 6.8: Farklı inorganik azot kaynaklarının *Bacillus* sp. P22 alkale proteazı üretimi üzerine etkisinin irdelendiği çalışmada 24. saat sonunda elde edilen hücre büyümesi, aktivite ve göreceli aktivite değerleri. Negatif kontrol: Maya özütü ve Proteoz pepton içermeyen Horikoshi besi yeri; Pozitif kontrol: % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri.

İnorganik Azot Kaynağı	Hücre Büyümesi (A <sub>600</sub> )	Aktivite (U/ml/dk)	Göreceli Aktivite (%)
Negatif Kontrol	0,28	25,15	32,7
Pozitif Kontrol	5,15	76,8	100
% 1 Sodyum Nitrat	0,27	30,0	39,1
% 1 Potasyum Nitrat	0,24	31,07	40,4
% 1 Amonyum Sülfat	0,08	20,94	27,2
% 1 Amonyum Klorür	0,47	18,9	24,6
% 1 Amonyum Fosfat	0,18	3,61	4,7
% 1 Amonyum Asetat	0,35	0,54	0,7
% 1 Glisin	0,14	0	0
% 1 Asparajin	1,4	37,81	49,2



Şekil 6.19: Farklı inorganik azot kaynaklarının *Bacillus* sp. P22 soyunun büyümesi üzerine etkisi. Negatif kontrol: Maya özütü ve Proteoz pepton içermeyen Horikoshi besi yeri; Pozitif kontrol: % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri.



Şekil 6.20: Farklı inorganik azot kaynaklarının *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazı üretimi üzerine etkisi. Negatif kontrol: Maya özütü ve Proteoz pepton içermeyen Horikoshi besi yeri; Pozitif kontrol: % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri.

### 6.2.8. Çeşitli Metal Tuzlarının Alkalen Proteaz Üretimi Üzerine Etkileri

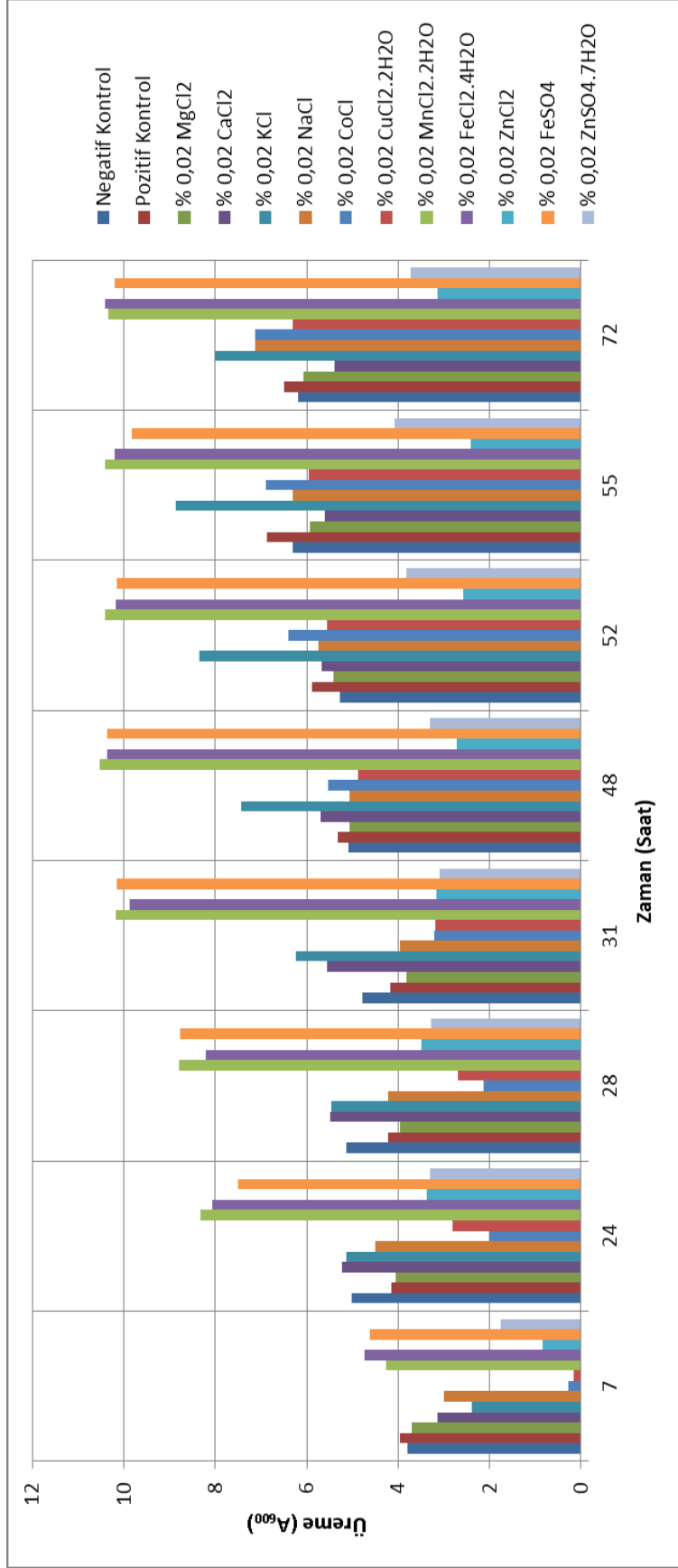
Metal tuzlarının *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının üretimi üzerine etkilerinin irdelendiği bu çalışmada; Horikoshi besi yeri içeriğinde bulunan % 0,02  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  yerine aynı oranda farklı metal tuzlarının eklendiği kültürlerde hücre büyümesi ve alkalen proteaz aktivitesi 72 saat boyunca izlendi ve sonuçlar Şekil 6.21 ve Şekil 6.22'de gösterildi. Çalışmada % 0,02  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  içeren Horikoshi besi yeri pozitif; içermeyen besi yeri negatif kontrol olarak kullanıldı. Besi yerinden  $MgSO_4$ 'ın çıkarılmasının hücre büyümesini etkilemediği (Şekil 6.21), buna karşın proteaz aktivitesini % 15 düşürdüğü gözlemlendi (Şekil 6.22).  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  yerine  $MnCl_2$ ,  $FeCl_2$  ve  $FeSO_4$  kullanımının hücre büyümesini önemli ölçüde artırdığı, buna karşın proteaz üretimini bütünüyle inhibe ettiği görüldü. Benzer şekilde besi yerine eklenen  $KCl$ 'ün de hücre büyümesini % 30'a kadar artırdığı ancak, proteaz üretimini önemli ölçüde (yaklaşık % 80) baskıladığı belirlendi. Besi ortamına eklenen  $CaCl_2$ 'ün üreme üzerine etkisi olmamasına karşın, proteaz üretimini % 80 oranında baskıladığı görüldü.  $CoCl_2$  ve  $CuCl_2$ 'ün hücre büyümesini yavaşlattığı, ancak kültürün 40. saatinden sonra üremenin, pozitif kontrolde enzimatik aktivitenin yüksek olduğu düzeylere eriştiği; buna karşın, proteaz üretiminin  $CoCl_2$  ile bütünüyle baskılanırken;  $CuCl_2$  ile üremeye paralel olarak arttığı ve üremenin normal düzeylere eriştiği 48. saatten sonra pozitif kontrolde görülen aktivitenin % 60-75'inin elde edildiği gözlemlendi. Besi yerinde  $ZnCl_2$  kullanımının büyüme % 20-55;  $ZnSO_4$  kullanımının ise yaklaşık % 20 azalttığı; proteaz üretimini ise  $ZnCl_2$ 'ün bütünüyle,  $ZnSO_4$ 'ın ise % 75 baskıladığı görüldü. Besi yerinde  $MgSO_4$  yerine  $NaCl$  ve  $MgCl_2$  kullanılmasının hücre büyümesi üzerinde belirgin bir etkisi görülmezken, alkalen proteaz üretiminde % 10 oranında azalma belirlendi (Şekil 6.21 ve Şekil 6.22).

Besi yeri ortamına eklenen metal tuzlarının *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının üretimi üzerine etkilerinin irdelendiği bu çalışma sonucunda; besi yerinde % 0,02 oranında  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  kullanımının alkalen proteaz üretimini hiç tuz içermeyen ortama görece % 15 artırdığı, denenen diğer tuzların etkisinin ise proteaz üretimini baskılamak yönünde olduğu görüldüğünden, üretim ortamında, daha önce olduğu gibi, % 0,02  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  kullanımına karar verildi.

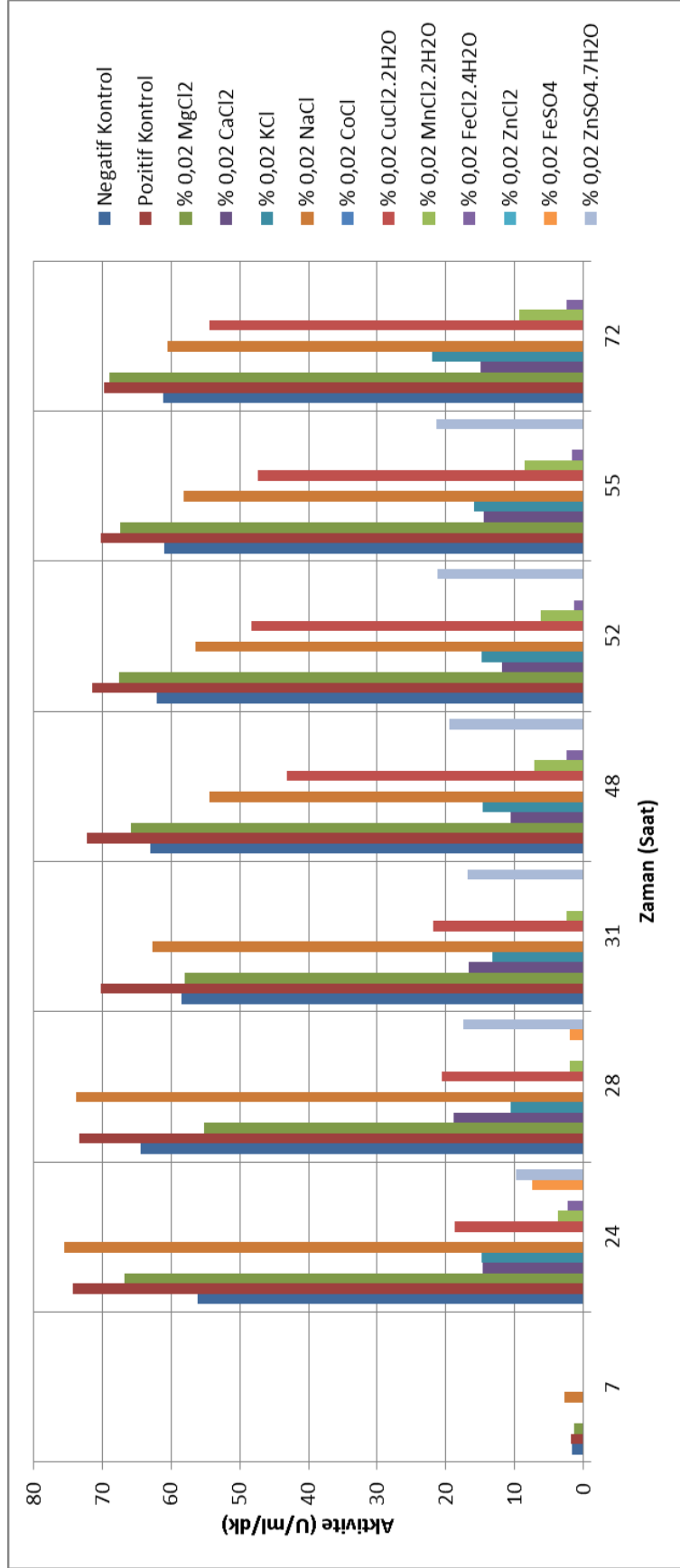
Tablo 6.9: Farklı metal tuzlarının *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazı üretimi üzerine etkisinin irdelendiği çalışmada 24. saat sonunda elde edilen hücre büyümesi, aktivite ve göreceli aktivite değerleri. Negatif kontrol: % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O içermeyen Horikoshi besi yeri; Pozitif kontrol: % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O içeren Horikoshi besi yeri.

Metal Tuzları	Hücre Büyümesi (A <sub>600</sub> )	Aktivite (U/ml/dk)	Göreceli Aktivite (%)
Negatif Kontrol	5,01	56,14	75,6
Pozitif Kontrol	4,14	74,23	100
MgCl <sub>2</sub>	4,06	66,68	89,8
CaCl <sub>2</sub>	5,23	14,74	19,8
KCl	5,13	14,88	20
NaCl	4,49	75,49	101
CoCl <sub>2</sub>	1,98	0	0
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,82	18,77	25,2
MnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	8,31	3,7	4,9
FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	8,07	2,35	3,61
ZnCl <sub>2</sub>	3,37	0	0
FeSO <sub>4</sub>	7,51	7,55	10,1
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,31	9,81	13,2





Şekil 6.21: Farklı metal tuzlarının *Bacillus* sp. P22 soyunun büyümesi üzerine etkisi. Negatif kontrol: % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O içermeyen Horikoshi besi yeri; Pozitif kontrol: % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O içeren Horikoshi besi yeri.



Şekil 6.22: Farklı metal tuzlarının *Bacillus* sp. P22 alkalin proteazı üretimi üzerine etkisi. Negatif kontrol: % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O içermeyen Horikoshi besi yeri; Pozitif kontrol: % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O içeren Horikoshi besi yeri.

### 6.2.9. *Bacillus* sp. P22 Alkalen Proteaz Üretim Besi Yeri Bileşen Kompozisyonunun Belirlenmesi

Buraya kadar yapılan, *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının üretimi için besi yeri bileşenlerinin optimize edildiği çalışmalar sonucunda, % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri (Besi yeri 12) optimal proteaz üretimi için seçildi. Bu bölümde gerçekleştirilen çalışma; besi yeri içeriğinde farklı fosfat ve sülfat tuzlarının kullanılmasının yanı sıra, optimizasyon çalışmaları sırasında proteaz üretimini etkilediği görülen bazı azot ya da karbon kaynakları ile metal tuzlarının, seçilen besi yeri içeriği ile bir arada kullanımının alkalen proteaz üretimi üzerine etkilerini irdelemek amacıyla planlandı. Sonuçlar Şekil 6.23 ve Şekil 6.24'te görülmektedir.

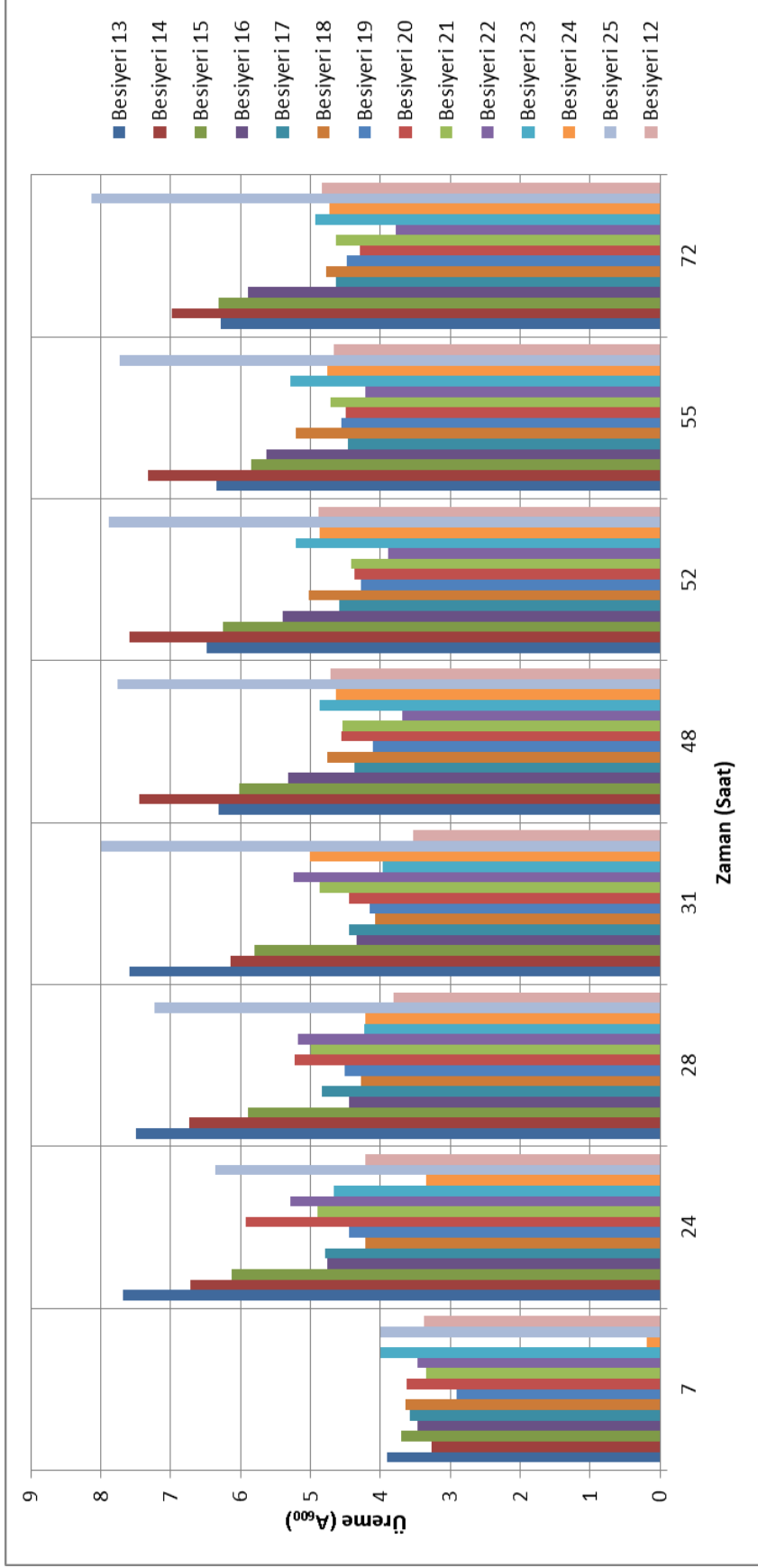
Horikoshi besi yerinde bulunan % 0,5 maya özütü ve % 0,5 Proteoz pepton miktarlarının, her ikisi için de, % 1'e çıkarılmasının proteaz üretimini 24-31. saatlerde yaklaşık % 20 azalmasına neden olduğu görüldü (Şekil 6.24; besi yeri 13). Besi ortamında maya özütü ve Proteoz peptona ek olarak jelatin (% 1) kullanımının proteaz üretimini % 10'a kadar artırdığı (Şekil 6.24; besi yeri 14), tripton (% 2) veya asparajin (% 1) kullanımının ise, sırasıyla, yaklaşık % 8 ve % 15 oranında azalttığı gözlemlendi (Şekil 6.24; besi yeri 25 ve besi yeri 15).

Horikoshi besi yeri içeriğine ek olarak % 0,02 NaCl kullanımının alkalen proteaz üretimini etkilemediği, ancak miktarın % 0,5'e çıkarılmasının proteaz üretimini % 57'ye kadar düşürdüğü belirlendi (Şekil 6.24; besi yeri 22 ve besi yeri 23). Besi ortamında fosfat kaynağı olarak  $K_2HPO_4$ 'ın yanı sıra  $KH_2PO_4$ 'ın da kullanılmasının proteaz üretimini önemli ölçüde etkilemediği (Şekil 6.24; besi yeri 16), potasyum fosfat tuzları yerine sodyum fosfat tuzlarının kullanımının ise özellikle 24-31. saatlerde önemli ölçüde azalmaya neden olduğu görüldü.  $Na_2HPO_4$ 'ın tek başına kullanıldığı durumda % 22,  $NaH_2PO_4$  ile birlikte kullanıldığı durumda ise % 50'ye kadar azalma belirlendi (Şekil 6.24; besi yeri 17 ve besi yeri 18). Benzer şekilde, besi ortamına % 0,25 oranında  $(NH_4)_2SO_4$  eklenmesinin de aynı saatlerdeki proteaz üretiminde yaklaşık % 30 azalmaya neden olduğu görüldü (Şekil 6.24; besi yeri 21). Besi yerine eklenen % 0,25 oranındaki  $KNO_3$  proteaz üretiminde önemli bir değişikliğe neden olmazken, aynı miktardaki  $NaNO_3$ 'ün üretimde genel olarak tüm saatlerde % 35 oranında bir azalmaya yol açtığı gözlemlendi (Şekil 6.24; besi yeri 20 ve besi yeri 19). % 0,02  $CuCl_2$  eklenmesinin ise proteaz üretimini neredeyse bütünüyle inhibe ettiği görüldü (Şekil 6.24; besi yeri 24).

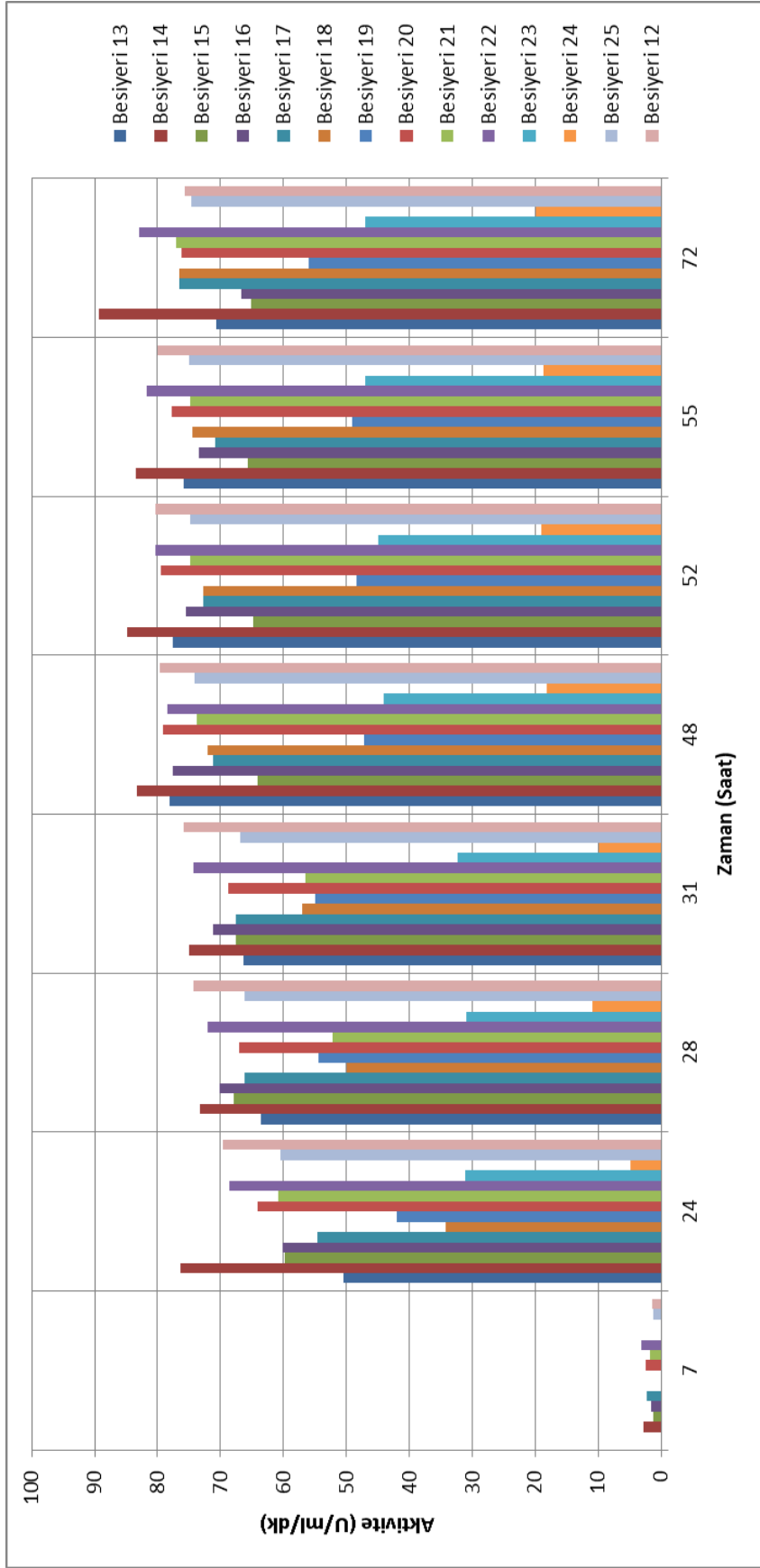
Gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda; % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yerine % 1 jelatin eklenmesiyle elde edilen 14 numaralı besi yerinin (% 1 süt tozu, % 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 1 jelatin, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yerine görece enzim üretimini % 10 artırdığı belirlendiğinden, besi yeri optimizasyonuna yönelik son çalışmanın bu besi yeri temelinde gerçekleştirilmesi kararlaştırıldı.

Tablo 6.10: *Bacillus* sp. P22 alkalen proteaz üretim besi yeri bileşen kompozisyonunun belirlendiği çalışmada inkübasyonun 24. saati sonunda elde edilen hücre büyümesi, aktivite ve göreceli aktivite değerleri. Besi yeri (B) 12: % 1 süt tozu içeren Horikoshi (% 1 süt tozu + % 0,5 maya özütü + % 0,5 Proteoz pepton + % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O); B13: % 1 maya özütü+% 1 Proteoz pepton; B14: % 1 jelatin; B15: % 1 asparajin; B16: % 0,05 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; B17: % 0,1 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; B18: % 0,1 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; B19: % 0,25 NaNO<sub>3</sub>; B20: % 0,25 KNO<sub>3</sub>; B21: % 0,25 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; B22: % 0,02 NaCl; B23: 0,5 NaCl; B24: % 0.02 CuCl<sub>2</sub>; B25: % 2 Tripton.

Besi yeri	Hücre Büyümesi (A <sub>600</sub> )	Aktivite (U/ml/dk)	Göreceli Aktivite (%)
Besi yeri 13	7,68	50,52	72,5
Besi yeri 14	6,72	76,31	109,6
Besi yeri 15	6,13	59,75	85,8
Besi yeri 16	4,76	60,07	86,2
Besi yeri 17	4,79	54,64	78,4
Besi yeri 18	4,21	34,24	49,1
Besi yeri 19	4,45	41,93	60,2
Besi yeri 20	5,93	64,09	92
Besi yeri 21	4,9	60,79	87,3
Besi yeri 22	5,29	68,66	98,6
Besi yeri 23	4,66	31,12	44,7
Besi yeri 24	3,34	48,4	6,9
Besi yeri 25	6,36	60,8	86,7
Besi yeri 12	4,22	69,61	100



Şekil 6.23: *Bacillus* sp. P22 alkalen proteaz üretim besi yeri bileşen kompozisyonunun belirlendiği çalışmada gözlenen 72 saatlik hücre büyümesi grafiği. Besi yeri (B) 12: Horikoshi (% 1 süt tozu + % 0,5 maya özütü + % 0,5 Proteoz pepton + % 0,1  $K_2HPO_4$  + % 0,02  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ); B13: % 1 maya özütü+% 1 Proteoz pepton; B14: % 1 jelatin; B15: % 1 asparajın; B16: % 0,05  $KH_2PO_4$ ; B17: % 0,1  $Na_2HPO_4$ ; B18: % 0,1  $Na_2HPO_4+NaH_2PO_4$ ; B19: % 0,25  $NaNO_3$ ; B20: % 0,25  $KNO_3$ ; B21: % 0,25  $(NH_4)_2SO_4$ ; B22: % 0,02  $NaCl$ ; B23: 0,5  $NaCl$ ; B24: % 0.02  $CuCl_2$ ; B25: % 2 Tripton.



Şekil 6.24: *Bacillus* sp. P22 alkalen proteaz üretim besi yeri bileşen kompozisyonunun belirlendiği çalışmada gözlenen 72 saatlik alkalen proteaz aktivitesi grafiği. Besi yeri (B) 12: Horikoshi (% 1 süt tozu + % 0,5 maya özütü + % 0,5 Proteoz pepton + % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + % 0,02 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O); B13: % 1 maya özütü+% 1 Proteoz pepton; B14: % 1 jelatin; B15: % 1 asparajın; B16: % 0,05 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; B17: % 0,1 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; B18: % 0,1 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; B19: % 0,25 NaNO<sub>3</sub>; B20: % 0,25 KNO<sub>3</sub>; B21: % 0,25 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; B22: % 0,02 NaCl; B23: 0,5 NaCl; B24: % 0,02 CuCl<sub>2</sub>; B25: % 2 Tripton.

### 6.2.10. *Bacillus* sp. P22 Alkalen Proteaz Üretim Besi Yeri Bileşen Derişimlerinin Belirlenmesi

Yapılan bu son çalışmada, 14 numaralı besi yeri bileşenlerinin miktarlarının optimize edilmesi amaçlandı. Sonuçlar Şekil 6.25 ve Şekil 6.26'da gösterildi.

Şekil 6.25 ve Şekil 6.26 besi yeri 12'de standart (% 1 süt tozu içeren), Şekil 6.25 ve Şekil 6.26 besi yeri 14'te ek olarak % 1 jelatin içeren standart Horikoshi besi yerleri görülmektedir. Buna göre; jelatin içeren besi yerindeki hücre büyümesinin içermeyene görece % 40 daha fazla olduğu ve enzim üretiminin de yaklaşık % 10 arttığı belirlendi. Besi yerindeki jelatin miktarının % 0,5'e düşürülmesinin (besi yeri 33) hücre büyümesini 48. saatten sonra yaklaşık % 50 artırdığı, buna karşın enzim üretiminin ilk 31 saatte % 27, 48. saatten sonra ise % 6 daha düşük olduğu belirlendi. Besi yerinde kullanılan jelatinin % 2'ye çıkarılmasının (besi yeri 34) ilk 31 saatteki hücre büyümesini % 60'a kadar azalttığı, sonraki saatlerde üremenin % 1 süt tozu içeren besi yeri ile aynı değerlere ulaşmasına karşın, enzim üretiminin tüm saatlerde yaklaşık % 60 daha az olduğu görüldü.

Horikoshi besi yerinden süt tozunun bütünüyle çıkarılmasının (besi yeri 26) hücre büyümesini 0,1-0,5 A<sub>600</sub> düzeylerine düşürdüğü ve enzim üretimini tümüyle inhibe ettiği; süt tozunun % 0,5 oranında kullanılmasının (besi yeri 27) ise, hücre büyümesini ortalama % 40-50 oranında düşürdüğü, buna karşın en fazla enzim üretiminin 48-72. saatler arasında ve % 1 süt tozu içeren (besi yeri 12) görece yaklaşık % 70 az olduğu belirlendi. Süt tozunun besi yerinde % 2 oranında kullanılmasının (besi yeri 28) ilk 31 saatteki hücre büyümesini yaklaşık % 50'ye; 48-72. saatlerde ise % 25'e kadar düşürdüğü; enzim üretimini de ilk 31 saatte % 50-77, 48. saatten sonra ise % 29 azalttığı görüldü.

Horikoshi besi yerinde % 0,5 oranında kullanılan maya özütünün, besi yerinden bütünüyle çıkarıldığı (besi yeri 29) ve % 1 oranında kullanıldığı (besi yeri 30) çalışmalarda enzim üretiminin önemli ölçüde etkilendiği görüldü. Maya özütü içermeyen besi yerinde, ölçülebilir enzim aktivitenin alındığı 48-72. saatlerde hücre büyümesinin yaklaşık % 40, enzim üretiminin de % 80'den fazla azaldığı belirlendi. Maya özütünün % 1'e çıkarıldığı durumda; hücre büyümesinin ilk 31 saatte % 20; enzim üretiminin 24. saatte % 63, 28-31. saatlerde ise % 47 daha az olduğu; üremenin 48. saatten sonra % 0,5 maya özütü içeren 14 numaralı besi yeri ile

aynı değerlere ulaşmasına karşın, enzim üretiminin % 27 daha düşük olduğu gözlemlendi.

Proteoz pepton miktarının % 0,5'ten % 1 çıkarılmasının (besi yeri 32) üremede % 17'lik bir düşüőe yol açarken, enzim üretimini % 28 düşürdüğü; besi yerinden tümüyle çıkarılmasının (besi yeri 31) ise; üremeyi % 22 azaltırken, enzim üretimini % 41 azalttığı bulundu.

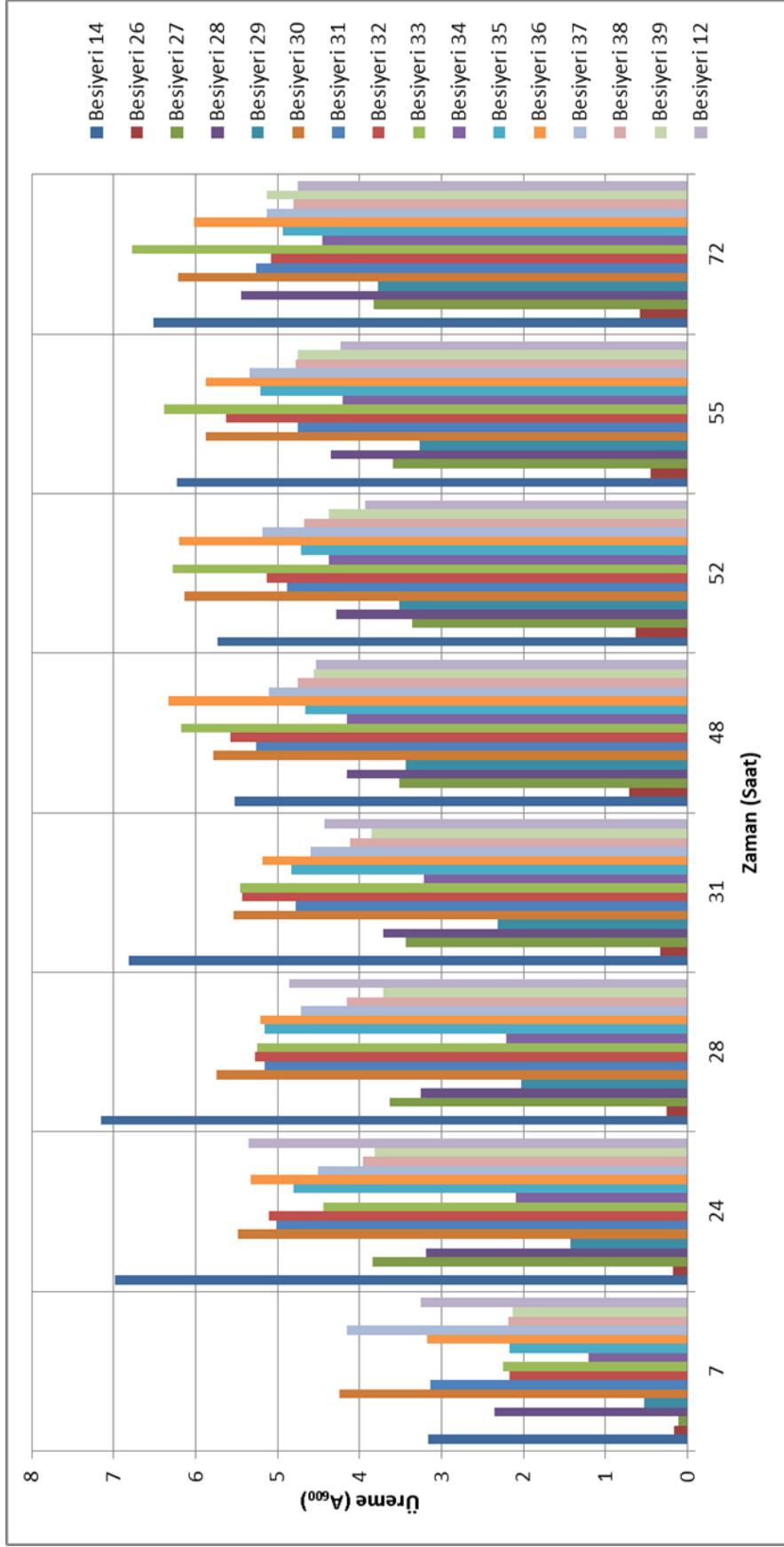
Besi yerinde fosfat kaynağı olarak kullanılan  $K_2HPO_4$  miktarları % 0 - 0,3 aralığında denendi. Hiç  $K_2HPO_4$  içermeyen besi yerinde (besi yeri 35) hücre büyümesi tüm çalışma boyunca ortalama 4.9  $A_{600}$  değerlerinde kalırken; enzim üretimi 14,38 U/ml/dak'dan 30,40 U/ml/dak'ya kadar sürekli bir artış gösterdi. Bu değerler % 0,1  $K_2HPO_4$  içeren 14 numaralı besi yeri ile karşılaştırıldığında; üremenin ortalama % 25; enzim üretiminin ise % 82 (24. saat) ile % 65 (72. saat) daha az olduğu bulundu. % 0,3  $K_2HPO_4$  kullanılan besi yerinde (besi yeri 36) ise; hücre büyümesi çalışmanın ilk yarısında (24-31. saatler) % 25 daha azken, ikinci yarıda (48-72. saatler) % 4 artmış olmasına karşın, enzim üretimi tüm çalışma boyunca % 21 daha düşük bulundu.

Alkale proteaz üretim besi yerinde bulunan son parametre  $MgSO_4$ 'ın besi ortamından çıkarılmasının (besi yeri 37) hücre büyümesini % 23, enzim üretimini % 30 azalttığı görüldü.  $MgSO_4$  derişiminin 10 kez arttırılması (% 0,2) (besi yeri 38); ilk 31 saatteki hücre büyümesini % 42, enzim üretimini % 46 azaltırken; 48. saatten sonra hücre büyümesindeki azalma % 21, enzim üretiminde ise % 31 oldu. Besi yerinde kullanılan  $MgSO_4$  derişiminin % 0,5'e çıkarılmasının (besi yeri 39); hücre büyümesini 24-31. saatlerde % 46, 48-72. saatlerde ise % 21 azalttığı görüldü. Enzim üretiminde 24. saatte % 65 azalma belirlenirken; 28-55. saatler arasında proteaz üretiminin aynı düzeylerde kaldığı, ancak % 0,02  $MgSO_4$  içeren besi yerine görece ortalama % 46 daha düşük olduğu, 72. saatte ise proteaz üretimindeki azalmanın % 35 düzeyinde olduğu gözlemlendi.

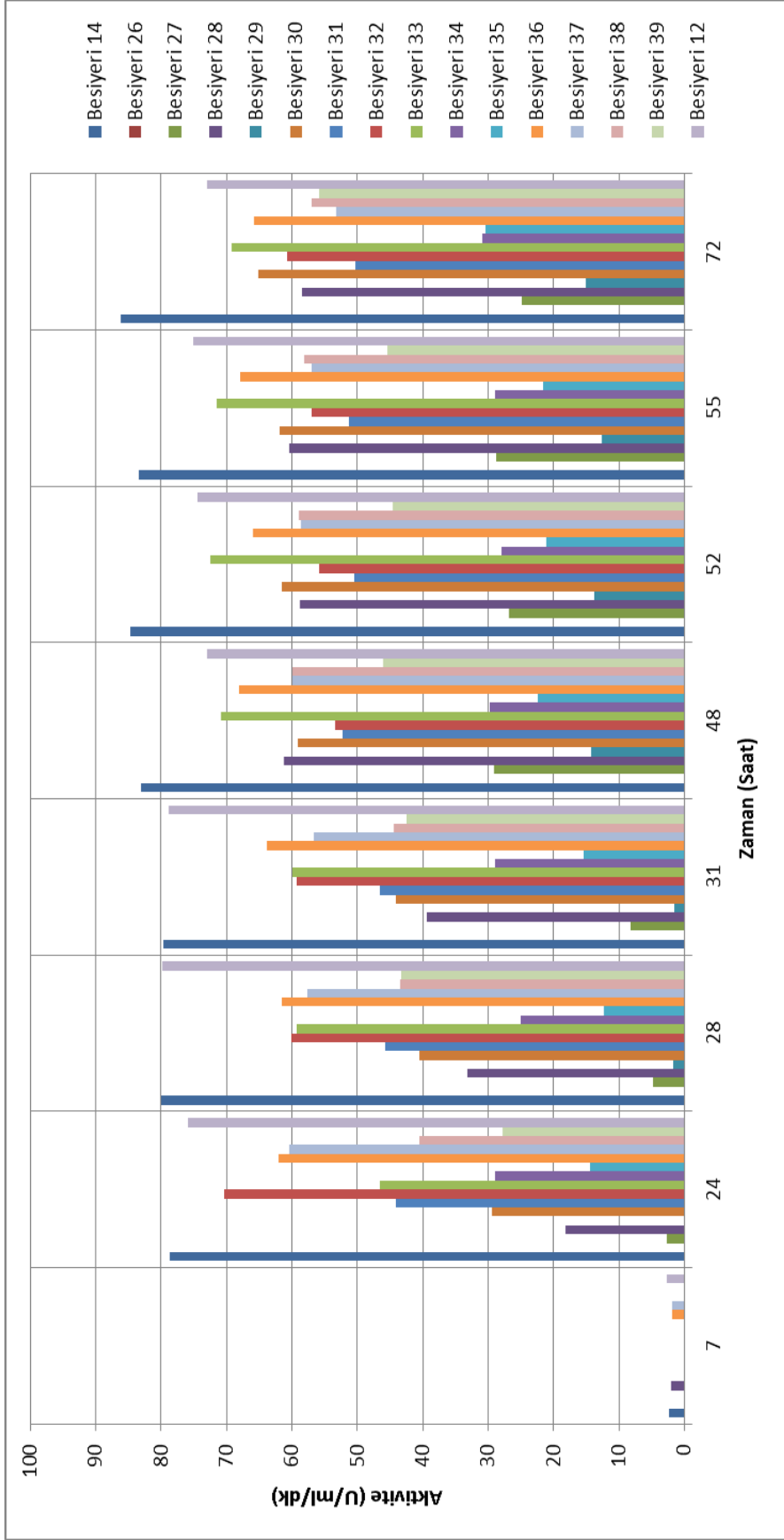


Tablo 6.11: *Bacillus* sp. P22 alkalen proteaz üretim besi yeri bileşen derişimlerinin belirlendiği çalışmada inkübasyonun 24. saati sonunda elde edilen hücre büyümesi, aktivite ve göreceli aktivite değerleri. Besi yeri 12: % 1 süt tozu içeren Horikoshi (% 1 süt tozu + % 0,5 maya özütü + % 0,5 Proteoz pepton + % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O); Besi yeri 14: Horikoshi + % 1 jelatin. Diğer besi yeri bileşenleri için Bkz. Tablo 5.3; sayfa 54.

Besi yeri	Hücre Büyümesi (A <sub>600</sub> )	Aktivite (U/ml/dk)	Göreceli Aktivite (%)
Besi yeri 14	6,99	78,66	107,7
Besi yeri 26	0,18	0	0
Besi yeri 27	3,84	2,75	3,63
Besi yeri 28	3,19	18,18	23,9
Besi yeri 29	1,43	0	0
Besi yeri 30	5,49	29,35	38,7
Besi yeri 31	5,02	44,05	58,1
Besi yeri 32	5,1	70,29	92,7
Besi yeri 33	4,44	46,5	61,3
Besi yeri 34	2,09	28,9	38,1
Besi yeri 35	4,81	14,38	18,9
Besi yeri 36	5,33	62,01	81,8
Besi yeri 37	4,5	60,34	79,5
Besi yeri 38	3,96	40,57	53,5
Besi yeri 39	3,81	27,77	36,6
Besi yeri 12	5,35	75,81	100



Şekil 6.25: *Bacillus* sp. P22 alkalin proteaz üretim besiyeri bileşen derişimlerinin belirlendiği 72 saatlik hücre büyümesi grafiği. Besiyeri 12: Horikoshi (% 1 süt tozu + % 0,5 maya özütü + % 0,5 Proteoz pepton + % 0,1  $K_2HPO_4$  + % 0,02  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ); Besiyeri 14: Horikoshi + % 1 jelatin. Diğer besiyeri bileşenleri için Bkz. Tablo 5.3; sayfa 54.



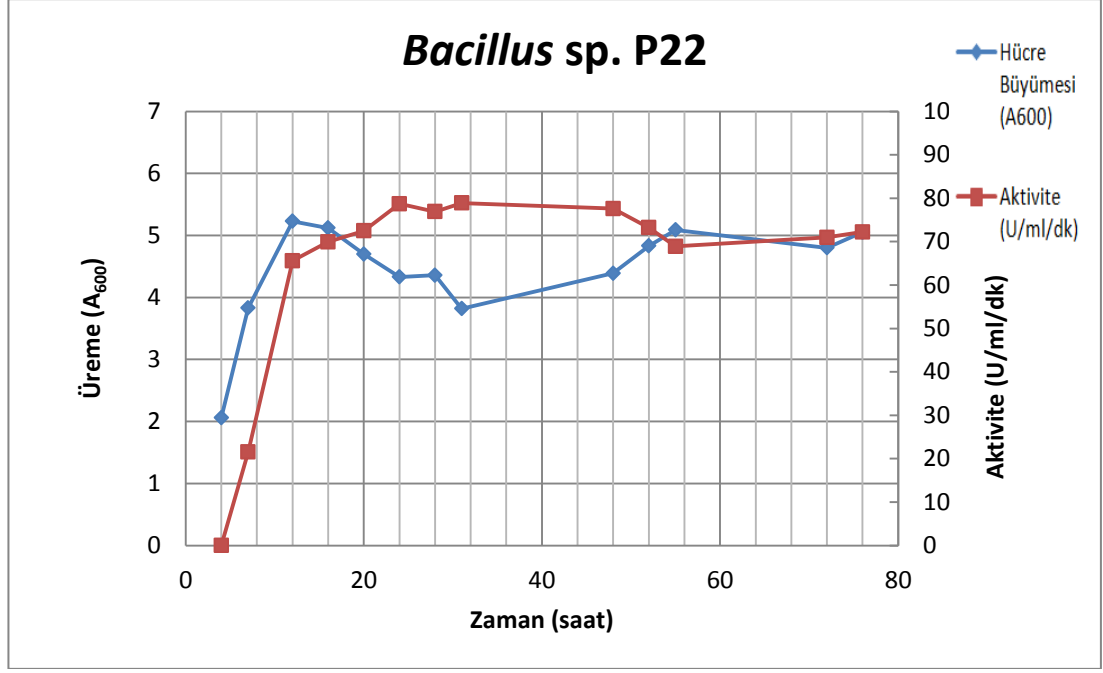
Şekil 6.26: *Bacillus* sp. P22 alkalin proteaz üretim besi yeri bileşen derişimlerinin belirlendiği çalışmada gözlenen 72 saatlik alkalin proteaz aktivitesi grafiği. Besi yeri 12: Horikoshi (% 1 süt tozu + % 0,5 maya özütü + % 0,5 Proteoz pepton + % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + % 0,02 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O); Besi yeri 14: Horikoshi + % 1 jelatin. Diğer besi yeri bileşenleri için Bkz. Tablo 5.3; sayfa 54.

% 1 süt tozu ve % 1 jelatin içeren 14 numaralı Horikoshi besi yeri temel alınarak gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda; besi yeri bileşenlerinin ortamdan çıkarılması ya da miktarlarının azaltılması veya artırılmasının hücre büyümesini çoğunlukla, alkalen proteaz üretimini ise her zaman azalttığı görüldü. Bu nedenle; 14 numaralı besi yeri (% 1 süt tozu, % 0,5 maya zt, % 0,5 Proteoz pepton, % 1 jelatin, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) *Bacillus* sp. alkalen proteazının üretimi için optimal besi yeri olarak seçildi. Ancak, bu besi yeri ile gerçekleştirilen çalışmalarda enzim üretimindeki artışın en fazla % 10 düzeylerinde olması ve kromatografi çalışmalarında jelatinden kaynaklanabilecek sorunların indirgenmesi amacıyla, *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının saflaştırma çalışmalarında 12 numaralı besi yerinin (% 1 süt tozu, % 0,5 maya zt, % 0,5 Proteoz pepton, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) kullanılmasına karar verildi.

### **6.3. *Bacillus* sp. P22'nin Zamana Bağlı Hücre Büyümesi ve Alkalen Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi**

Bu alışma, besi yeri bileşenleri ve inkübasyon koşullarının optimizasyonu çalışmalarının tamamlanmasından sonra, *Bacillus* sp. P22'nin optimal koşullarda büyüme ve enzim aktivitesinin gözlemlenmesi amacıyla gerçekleştirildi.

Bölüm 5.2.3.'de ayrıntıları verilen Şekilde kültüre alınan bakteri suşunun hücre büyümesi ve enzim aktivitesi 76 saate kadar takip edildi. *Bacillus* sp. P22'nin, inkübasyonun 12. saatinde en yüksek hücre büyümesi değerine (A<sub>600</sub>= 5,32) sahip olduğu, 24 ve 48 saatleri arasında 4,00–4,50 A<sub>600</sub> değerlerinde seyrederken inkübasyonun sonunda yaklaşık 5,00 A<sub>600</sub> değerine sahip olduğu gözlendi. En yüksek enzim aktivitesine beklenen Şekilde 24. saat sonunda rastlanırken (78 U/ml/dk), inkübasyonun sonlandırıldığı 76. saate kadar 78-70 U/ml/dk aralığında alkalen proteaz aktivitesi gözlendi. *Bacillus* sp. P22'nin hücre büyümesi ve enzim aktivitesi grafiği Şekil 6.27'de verildi.



Şekil 6.27: *Bacillus* sp. P22 soyunun % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yerinde zamana bağlı hücre büyümesi ve alkalen proteaz aktivitesi grafiği.

## 6.4. *Bacillus* sp. P22 Alkalen Proteazının Büyük Ölçekte Üretimi ve Saflaştırılması

### 6.4.1. *Bacillus* sp. P22 Hücre Kültürünün Hazırlanması ve Kültür Üst Sıvısının Toplanması

Enzim saflaştırma çalışmalarında kullanılmak üzere belirlenen şartlarda toplam 1500 ml kültür başlatıldı. İnkübasyonun 24. saatinde durdurulan kültürlerden üst sıvı toplanarak enzim saflaştırma çalışmalarına geçildi.

### 6.4.2. *Bacillus* sp. P22 Alkalen Proteazının Saflaştırılması

- Amonyum Süfat Derişimi ve Tampon İçeriğinin Belirlenmesi

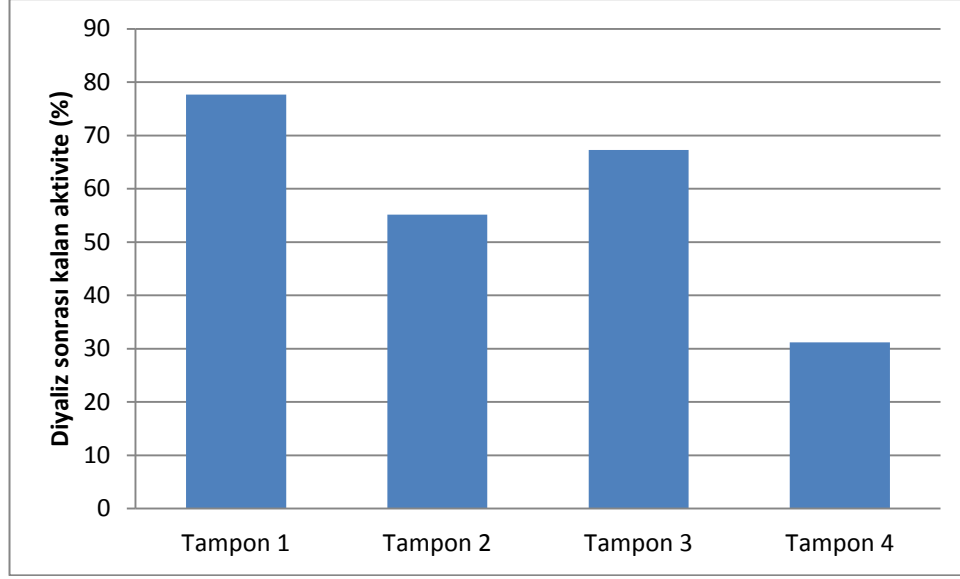
Enzimin saflaştırma amacıyla büyük hacimde üretilmesinden önce, saflaştırmanın ilk basamağını oluşturan amonyum sülfat çöktürmesinde kullanılacak tuz derişiminin ve kısmen saf enzimin kararlı olduğu tampon içeriğinin belirlenmesi amacıyla ön çalışmalar gerçekleştirildi. Bu amaçla; 24. saat sonunda toplanan hücre kültürünün + 4 °C 7.000 rpm’de 20 dakika santrifüjlenmesi ile elde edilen kültür üst

sıvısının iki kat 3MM Whatman kağıttan geçirilmesiyle elde edilen süzöntü dört eşit hacime ayrılarak amonyum sülfat çöktürmesine alındı.

% 20, 40, 60 ve 80 tuz konsantrasyonları ile tek basamakta çöktürülen kültür üst sıvılarının + 4 °C 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenmesi ile elde edilen peletler 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 tampon ile çözüldükten sonra, üst sıvılar ise doğrudan aktivite testine alındı. Azalan tuz konsantrasyonu ile üst sıvıda artan alkalen proteaz aktivitesi, % 80'in altındaki amonyum sülfat konsantrasyonlarında enzimin iyi çökmediğine işaret etti. P22 alkalen proteazının saflaştırılmasında tek basamakta % 80 amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmasına karar verildi.

Çöktürme adımını izleyen diyaliz basamağında ve sonraki saflaştırma aşamalarında kullanılacak tampon içeriğinin belirlenmesi amacıyla, içerikleri Bölüm 2.2.4.2'de verilen dört ayrı tampon hazırlanarak, *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının en kararlı olduğu tamponun seçilmesi hedeflendi. İlk paragrafta tarif edildiği şekilde hazırlanan kültür üst sıvısı % 80 amonyum sülfat çöktürmesine alındı. Çöktürme işlemi sonrasında dört eşit hacime ayrılan üst sıvının santrifüjlenmesiyle elde edilen peletler farklı içeriklere sahip tamponlar içinde çözüldükten sonra + 4 °C'ta geceboyu diyalize alındı. Diyaliz öncesi ve diyaliz sonrasında alınan örneklerle aktivite testleri gerçekleştirildi.

Diyaliz öncesi aktivite değerleri % 100 kabul edilerek, diyaliz işleminden sonra kalan aktiviteler değerlendirildi (Şekil 6.28). Koruyucu içermeyen 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 tamponuna (Tampon 4) karşı gerçekleştirilen diyaliz sonucunda P22 alkalen proteazının % 70 aktivite kaybına uğradığı, buna karşın, aynı tampon içine eklenen % 15 gliserol ve 7 mM  $\beta$ ME'ün (Tampon 1) başlangıç enzim aktivitesini % 78 oranında koruduğu belirlendi. Saflaştırma çalışmalarında % 15 gliserol ve 7 mM  $\beta$ ME içeren 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 kullanımına karar verildi.



Şekil 6.28: *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının % 80 amonyum sülfat ile çöktürülmesinden sonra farklı tamponlara karşı geceboyu gerçekleştirilen diyalizi sonrasında kalan alkalen proteaz aktiviteleri. *Tampon 1*: 50 mM Tris-HCl, % 15 Gliserol, 7 mM  $\beta$ -ME, pH 8.0; *Tampon 2*: 50 mM Tris-HCl, 7 mM  $\beta$ -ME, 2 mM  $CaCl_2$ , pH 8.0; *Tampon 3*: 50 mM Tris-HCl, % 15 Gliserol, 7 mM  $\beta$ -ME, 2 mM  $CaCl_2$ , pH 8.0; *Tampon 4*: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0.

- DEAE Sefaroz İyon Değiştirici ve Sefakril S-100 Jel Filtrasyon Kromatografileri

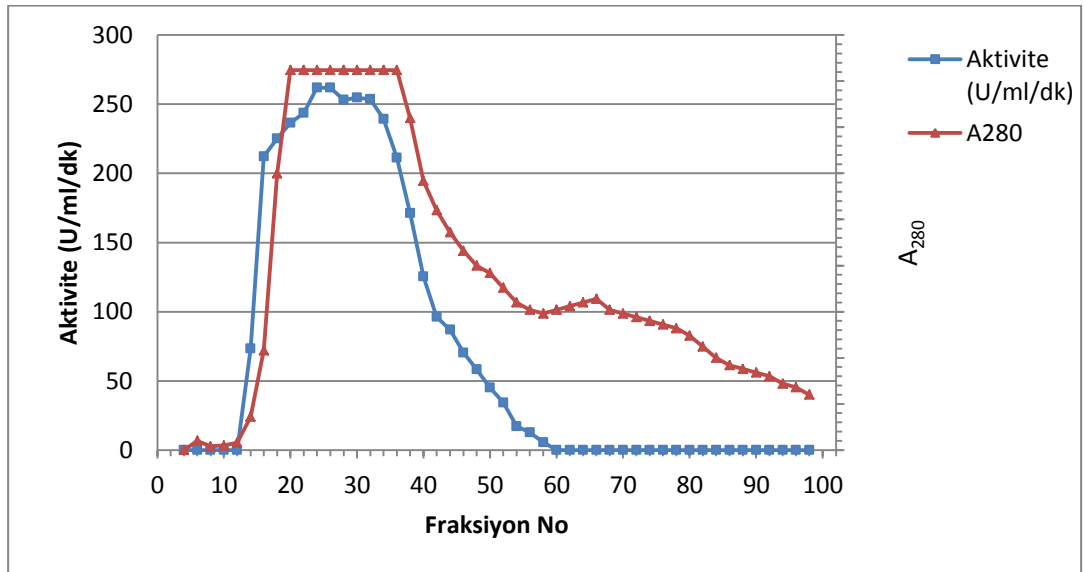
*Bacillus* sp. P22 alkalen proteazı amonyum sülfat çöktürmesini takiben uygulanan DEAE Sefaroz iyon değiştirici ve Sefakril S-100 jel filtrasyon kromatografileri ile üç basamakta kısmen saflaştırıldı.

Saflaştırmanın her basamağında elde edilen örneklerin toplam protein miktarları Bradford yöntemi ile, proteaz aktiviteleri, kazeinin substrat olarak kullanıldığı alkalen proteaz aktivite testi ile belirlendi. Toplam aktivite, protein konsantrasyonu, spesifik aktivite ve saflaştırma verimi hesaplanarak, alkalen proteaz saflaştırma tablosu oluşturuldu (Tablo 6.12).

Bölüm 5.2.4.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanan hücre kültürü, inkübasyonun 24. saati sonunda durdurularak toplandı. Kültürün + 4 °C 7.000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmesi ile elde edilen kültür üst sıvısı iki kat 3MM Whatman kağıttan geçirilerek süzüldü. Süzme sonrası toplam protein miktarı 145,5 mg; spesifik aktivite 456 U/mg ölçüldü.

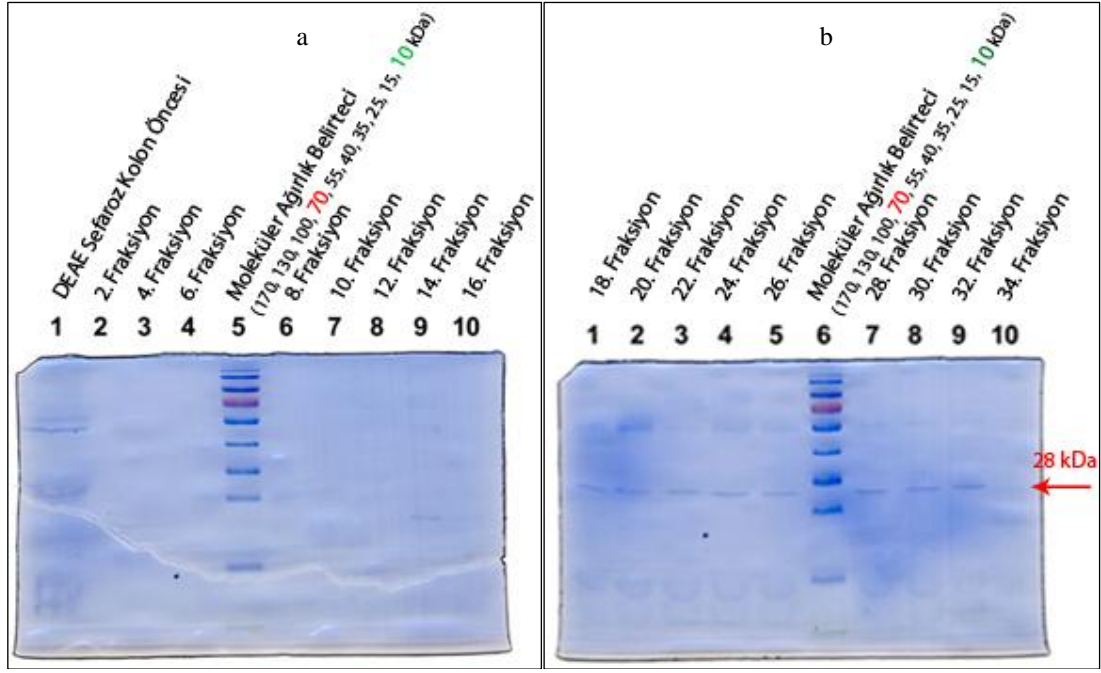
Elde edilen süzüntüye son konsantrasyonu % 80 olacak şekilde amonyum sülfat eklenerek + 4 °C'ta gece boyu düşük hızda karıştırıldı. Ertesi gün + 4 °C'ta 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj sonrası elde edilen pelet - 20 °C'a kaldırıldı.

Saflaştırmanın diyaliz basamağında bir önceki adımda elde edilen amonyum sülfat çökeleği 50 mM Tris-HCl, % 15 Gliserol, 7 mM  $\beta$ -ME, pH 8.0 tamponu içinde çözüldü. Bu aşamada 66 mg toplam protein ve 480 U/mg spesifik aktivite belirlendi. Çözülen pelet diyaliz membranına aktarıldı ve aynı tampona karşı gece boyu düşük hızda karıştırılarak diyalize alındı. Ertesi sabah tampon değiştirilerek 2 saat süreyle diyaliz işlemine devam edildi. Diyalizin ardından gerçekleştirilen aktivite ve Bradford testleri ile bu aşamada 56,16 mg toplam protein ve 499 U/mg spesifik aktivite saptandı. + 4 °C'ta Akuazid ile 48 saat konsantre edilen örneğin + 4 °C 10.000 rpm'de 10 dakika boyunca iki kez santrifüjlenmesiyle elde edilen ham özütte 47,5 mg toplam protein ve 525 U/mg spesifik aktivite belirlendi. Ham özütün tek seferde iyon değiştirici kolona yüklenmesiyle elde edilen protein fraksiyonlarının aktivite değerleri belirlendi ve SDS-PAGE analizi gerçekleştirildi (Şekil 6.29 ve 6.30).



Şekil 6.29: DEAE Sefaroz iyon değiştirici kromatografi ile elde edilen fraksiyonların A<sub>280</sub> ve alkalen proteaz aktivitesi grafiği.

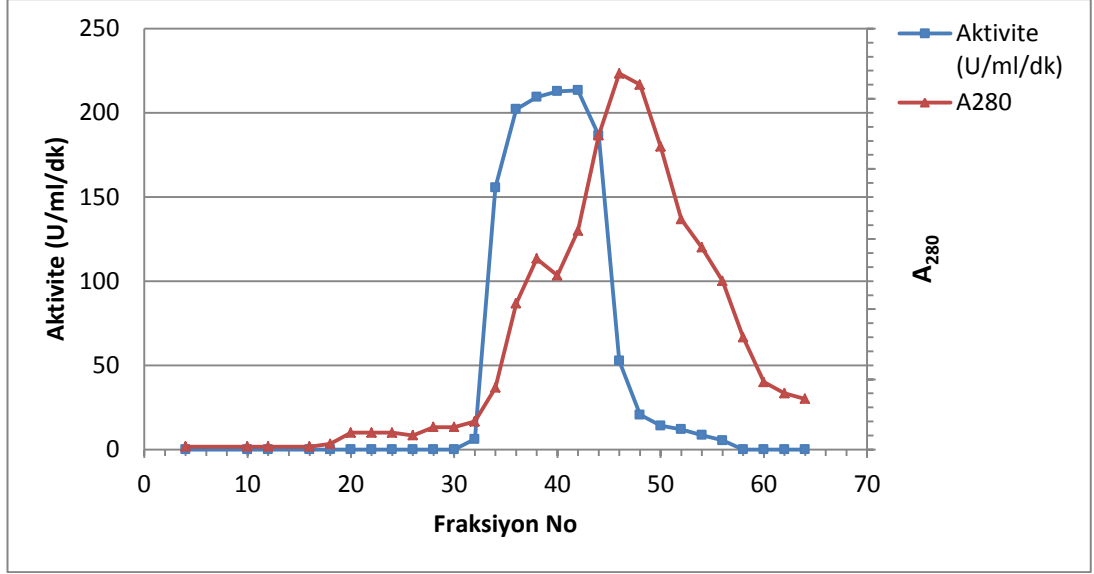




Şekil 6.30: DEAE Sefaroz iyon değiştirici kromatografi ile elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE profilleri. a) Birinci jel, b) İkinci jel.

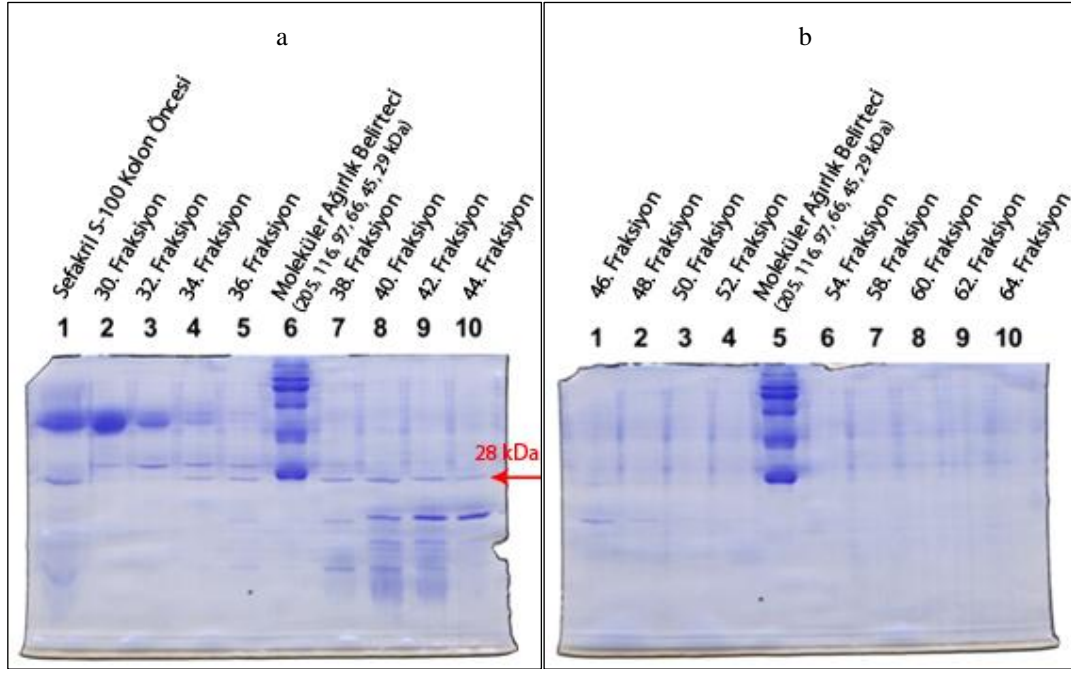
DEAE Sefaroz iyon değiştirici matris kullanılarak gerçekleştirilen saflaştırma işlemi ile elde edilen aktif fraksiyonlar (15-44 numaralı fraksiyonlar) saflık dereceleri de gözetilerek tek havuzda toplandı (Şekil 6.33). Ancak, fraksiyonlarla gerçekleştirilen protein elektroforezlerinden, yapılan çeşitli denemeler sonucunda çok iyi jeller elde edilemediğinden, fraksiyonların tek havuzda toplanması sürecinde daha çok aktivite sonuçları göz önüne alındı. Saflaştırmanın bu aşamasında toplam protein miktarı ile spesifik aktivite, sırasıyla, 21,84 mg ve 998 U/mg olarak hesaplandı.

İyon değiştirici kolon kromatografisi sonrasında oluşturulan havuz + 4 °C'ta 72 saat Akuazid ile konsantre edildikten sonra gece boyu diyalize alınarak Sefakril S-100 jel filtrasyon kolonuna yüklenmeye hazır hale getirildi. Bu aşamada 6,29 mg toplam protein ve 3025 U/mg spesifik aktivite saptandı ve bu rnek Sefakril S-100 kolonuna yüklendi.



Şekil 6.31: Sefakril S-100 jel filtrasyon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların A<sub>280</sub> ve alkalen proteaz aktivitesi grafiği.

Jel filtrasyon kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlar aktivite testleri ve SDS-PAGE analizleri ile değerlendirildikten sonra 35-44. fraksiyonlar tek havuzda birleştirilerek nitelendirme çalışmalarında kullanıldı. Jel filtrasyon kromatografisinden elde edilen protein fraksiyonlarının aktivite ve A<sub>280</sub> grafikleri Şekil 6.31’de, fraksiyonların SDS-PAGE profilleri Şekil 6.32’de verildi.



Şekil 6.32: Sefakril S-100 jel filtrasyon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE profilleri. a) Birinci jel, b) İkinci jel.

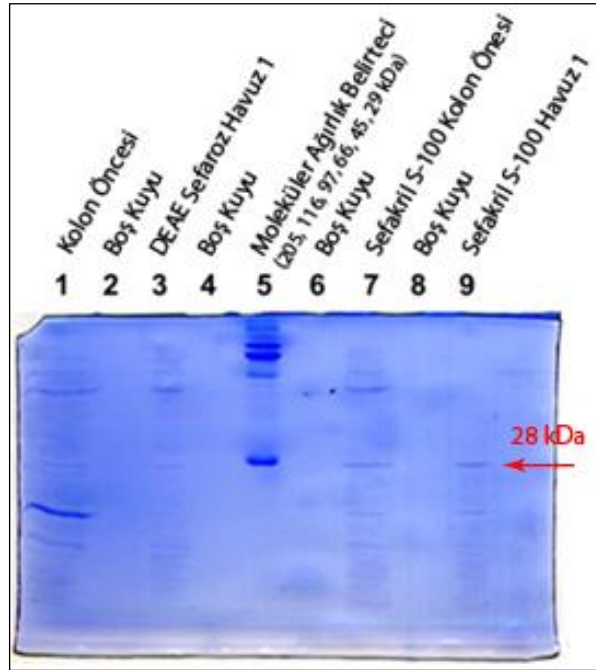
Sefakril S-100 kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlardan uygun bulunanları nitelendirme çalışmalarında kullanılmak üzere tek havuzda toplandı (Şekil 6.33). Bu aşamada 1,05 mg toplam protein ile 6414 U/mg spesifik aktivite saptandı.

*Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının saflaştırma sürecinde elde edilen verilerden yola çıkılarak saflaştırma tablosu hazırlandı (Tablo 6.12).

Tablo 6.12: *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının saflaştırma tablosu.

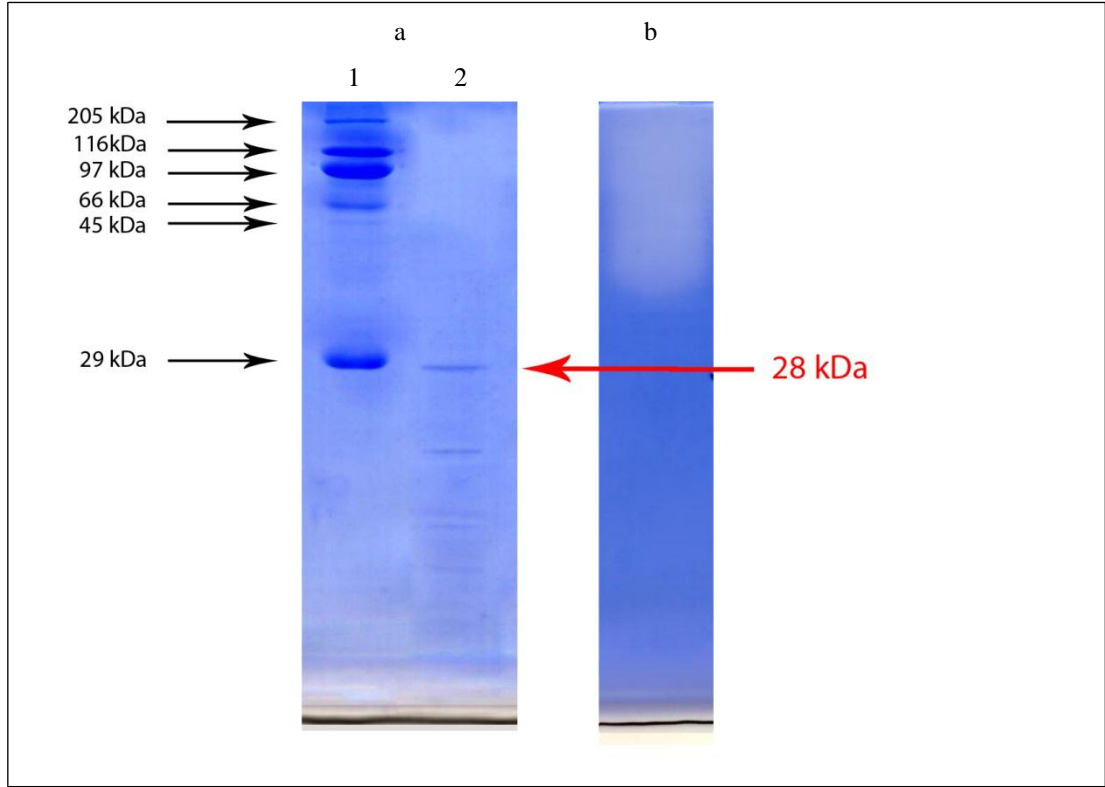
	Toplam Aktivite (U)	Top. Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Oranı	Verim (%)
Amonyum Sülfat Pelet	31665	66,00	480	1,00	100
Diyaliz Sonrası	28050	56,16	499	1,04	89
DEAE kolon Öncesi	24946	47,50	525	1,09	79
DEAE Sefaroz Havuz 1	21801	21,84	998	2,08	69
Sefakril S-100 Havuz 1	6730	1,05	6414	13,36	21

Enzimin saflaşma profilinin ve moleküler ağırlığının yeniden değerlendirilmesi amacıyla, kromatografiler sonrası oluşturulan havuzlar kolon öncesi örnekler eşliğinde SDS-PAGE'e yüklendi (Şekil 6.33). Aktif fraksiyonların toplanmasıyla elde edilen havuzlarda yaklaşık 28 kDa ağırlığında beliren bant enzim aktivitesiyle ilişkilendirildi.



Şekil 6.33: İyon değiştirici ve moleküler elek kromatografileri öncesi protein örnekleri ile sonrasında oluşturulan havuzların SDS-PAGE profilleri.

Enzim aktivitesinin kaynağı olan bandın belirlenmesi amacıyla, jel filtrasyon kromatografisinden elde edilen havuz, % 0,1 oranında jelatin içeren akrilamit jele yüklenerek zimogram analizi gerçekteştirildi (Şekil 6.34). Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; zimogram jeline yaklaşık 28 kDa ağırlığındaki protein bandına paralel bir hidroliz bandı gözlenmezken, Coomassie mavisini ile boyanan jelde daha büyük belirgin bir protein bandı görünmemesine karşın, daha ağır bir moleköl ile ilişkilendirilebilecek bir hidroliz zonu oluştuğu saptandı.

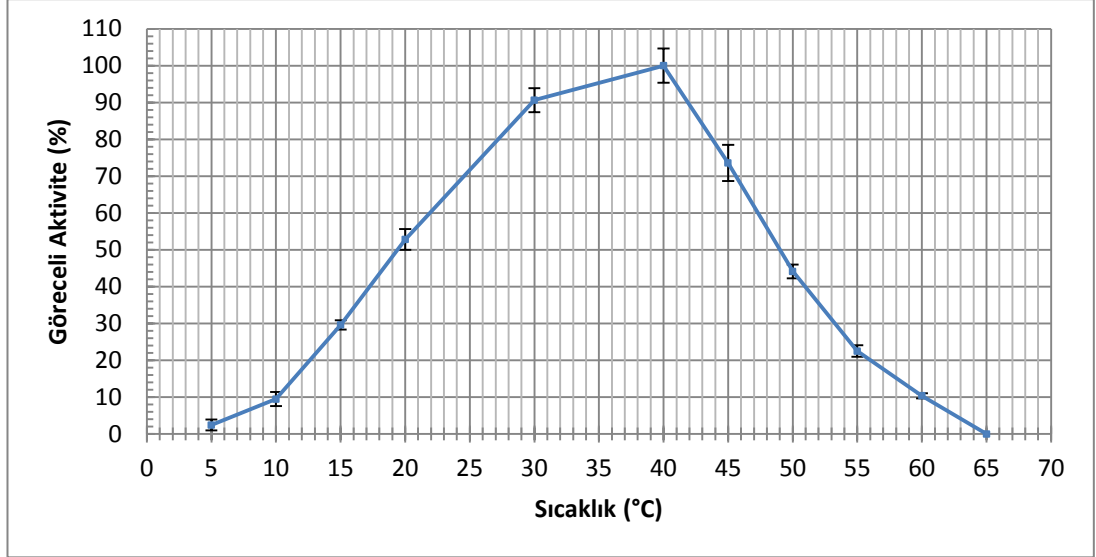


Şekil 6.34: *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının moleküler elek kromatografisi ile saflaştırılması sonrasında oluşturulan protein havuzunun SDS-PAGE profili ve zimogram analizi. a) SDS-PAGE profili. Kuyu 1, moleküler ağırlık belirteci, kuyu 2 moleküler elek kromatografisi sonucu oluşturulan protein havuzu, b) Zimogram analizi.

## 6.5. *Bacillus* sp. P22 Alkalen Proteazının Nitelendirilmesi

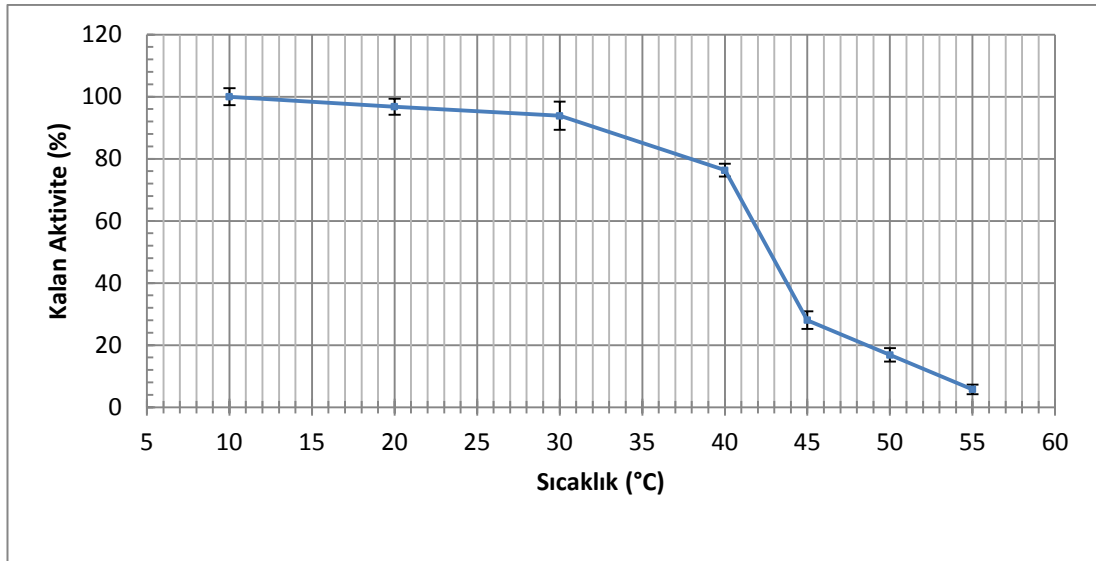
### 6.5.1. Optimal Reaksiyon Sıcaklığı ve Sıcaklık Kararlılığının Belirlenmesi

*Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının optimal reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi için 5, 10, 15, 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60 ve 65 °C sıcaklık değerlerinde standart aktivite testleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda enzimin optimal tepkime sıcaklığının 40 °C olduğu görüldü (Şekil 6.35). Bu sıcaklıktaki aktivite değeri % 100 kabul edilerek diğer sıcaklıklardaki göreceli aktiviteler hesaplandı. Enzimin 30 °C'ta aktivitesinin 40 °C'takine görece % 10; 45 °C'takinin ise yaklaşık % 30 daha düşük olduğu belirlendi. Takip eden nitelendirme çalışmalarında aktivite testleri 40 °C sıcaklıkta gerçekleştirildi.



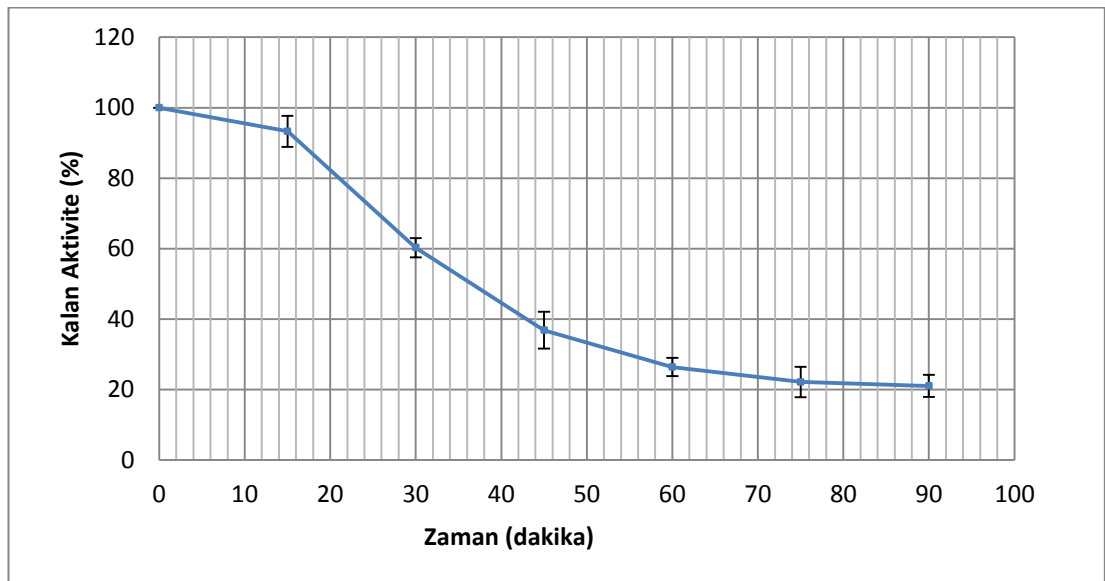
Şekil 6.35: *Bacillus* sp. P22 alkalin proteazının optimal reaksiyon sıcaklığı grafiği.

Enzim 10-55 °C aralığında 15 dakika bekletildikten sonra aktivite testine alınarak kararlı olduğu sıcaklık aralığı belirlendi. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra doğrudan test edilen örneğin aktivite değeri % 100 kabul edilerek kalan aktiviteler hesaplandı ve sıcaklık kararlılığı grafiği çizildi (Şekil 6.36). 10-30 °C aralığında enzim aktivitesinin büyük ölçüde, 40 °C'ta ise yaklaşık % 80'inin korunduğu, 45 °C'ın üzerindeki sıcaklıklarda ise önemli derecede azaldığı görüldü.



Şekil 6.36: *Bacillus* sp. P22 alkalin proteazının sıcaklık kararlılığı grafiği.

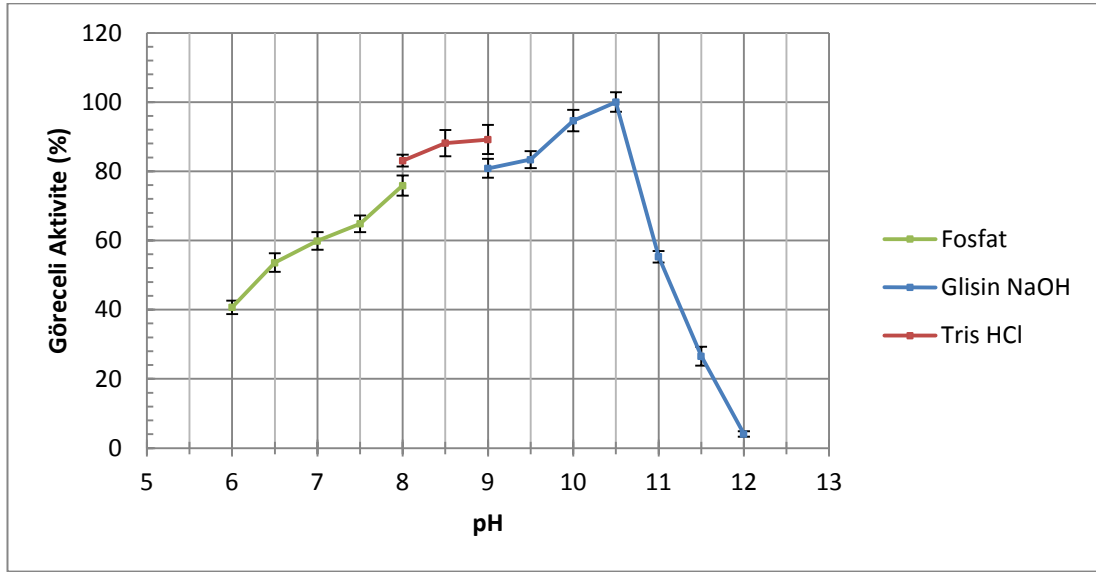
*Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının 30 °C sıcaklıkta zamana bağlı kararlılığının belirlenmesi amacıyla, yeterli miktarda 1/25 enzim dilüsyonu 30 °C sıcaklıkta inkübe edilerek düzenli aralıklarla örnek alındı ve standart aktivite testleri yapıldı. Doğrudan aktivite testine alınan örneğin aktivite değeri % 100 kabul edilerek bu değere görece kalan aktiviteler hesaplandı. Enzimin bu sıcaklıktaki inaktivasyon grafiği Şekil 6.37’de verildi. *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının 30 °C sıcaklıkta 15. dakikada aktivitesinin % 90’ını, 30. dakikada ise % 60’ını koruduğu gözlemlendi. 45. dakikadan itibaren proteolitik aktivitenin önemli ölçüde yitirildiği, aktivitedeki bu düşüşün 75. dakikada % 20 düzeylerinde sabitlendiği görüldü.



Şekil 6.37: *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının 30 °C’teki inaktivasyon eğrisi.

### 6.5.2. Optimal Reaksiyon pH’sı ve pH Kararlılığının Belirlenmesi

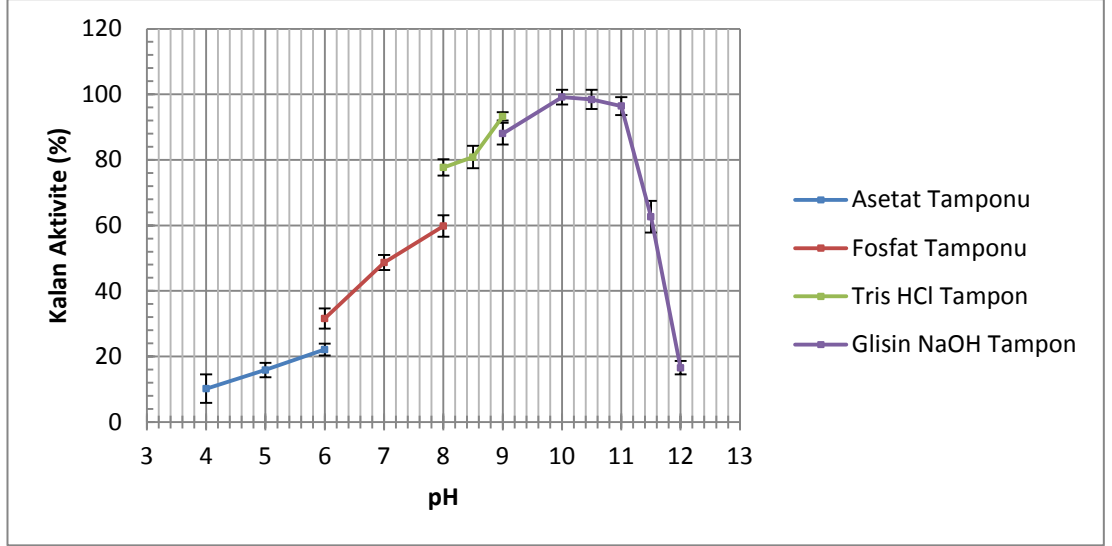
Farklı pH değerlerinde (pH 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5 ve 12) hazırlanan tamponlar kullanılarak gerçekleştirilen aktivite testleri sonucunda, *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının optimal çalışma pH’sının belirlendiği bu çalışmada, kısmen saflaştırılmış enzimin optimal reaksiyon pH’sının 10.5 olduğu görüldü (Şekil 6.38). Bu pH değerindeki aktivite % 100 kabul edilerek göreceli aktiviteler saptandı. *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının pH 8-10.5 aralığında aktivitesinin önemli ölçüde korunduğu (% 80-100), 10.5’in üzerindeki pH değerlerinde enzim aktivitesinin hızla düşerek pH 12’de yaklaşık 0 olduğu gözlemlendi.



Şekil 6.38: *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının optimal reaksiyon pH grafiği.

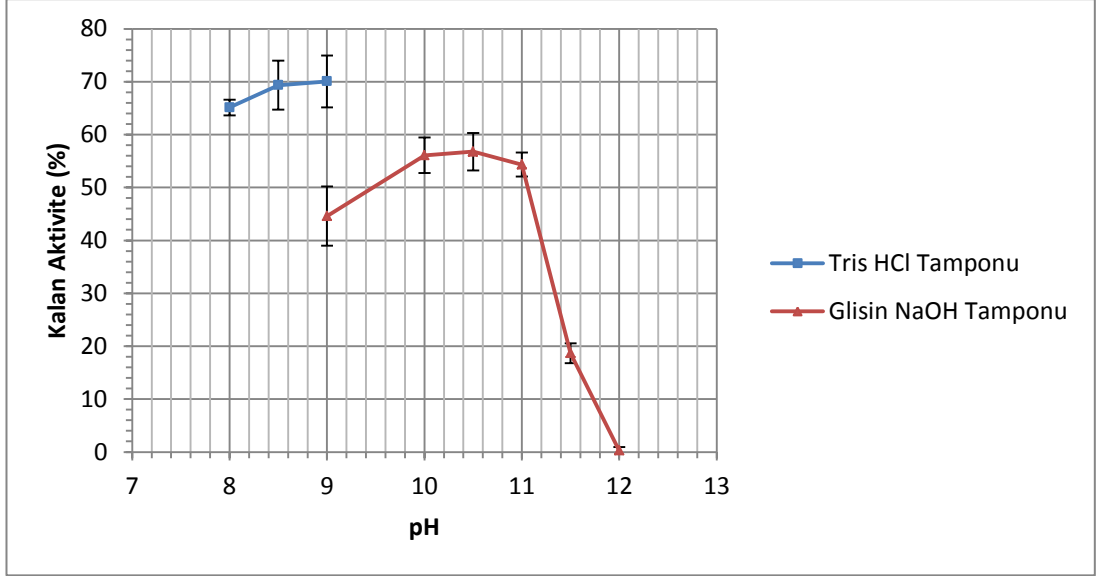
*Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının pH kararlılığının belirlenmesi amacıyla; kısmen saflaştırılmış enzim belirlenen pH değerlerinde (pH 4, 5, 6, 7, 8, 8.5, 9, 10, 10.5, 11, 11.5, 12) hazırlanan tamponlarla + 4 °C'ta 18 saat (Şekil 6.39) ve 1 hafta (Şekil 6.40) süreyle bekletildikten sonra optimal tepkime koşullarında standart aktivite testleri yapıldı. Doğrudan test edilen enzimin aktivite değerleri % 100 kabul edilerek kalan aktiviteler belirlendi. + 4 °C'ta 18 saat sonunda elde edilen bulguların değerlendirilmesiyle, enzimin pH 9-11 aralığında kararlı olduğu gözlemlendi. pH 11.5 değerinde enzim aktivitesinin % 40'ının, pH 12'de ise % 80'den fazlasının yitirildiği belirlendi (Şekil 6.39).





Şekil 6.39: *Bacillus* sp. P22 alkalin proteazının +4 °C'ta 18 saatlik pH kararlılığı grafiği.

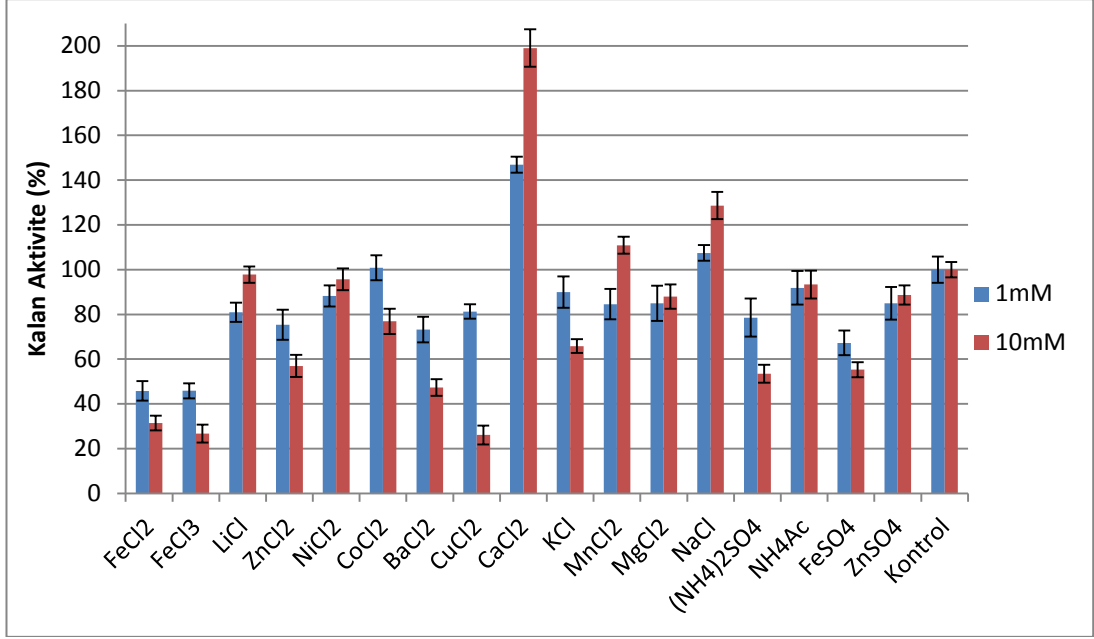
Belirlenen pH değerlerinde hazırlanan tamponlar ile bir hafta boyunca + 4 °C'ta bekletilen enzim örneklerinin kalan aktivite değerleri, doğrudan test edilen örneğin aktivite değeri % 100 kabul edilerek hesaplandı (Şekil 6.40). pH 8.5 ve pH 9 Tris-HCl tamponu ile + 4 °C'ta bir hafta bekletilen *Bacillus* sp. P22 alkalin proteazının aktivitesinin % 70, pH 8.0'de ise % 65 oranında korunduğu belirlendi. Bununla birlikte pH 9, 10, 10.5, 11, 11.5 ve 12 glisin-NaOH tamponlarında bekletilen enzim örneklerinin bir hafta sonundaki aktivite değerlerinin daha düşük olduğu gözlemlendi. pH 9 glisin-NaOH tamponunda bir hafta inkübasyon sonunda proteolitik aktivitenin yaklaşık % 55 oranında kaybedildiği, pH 10, 10.5 ve 11 değerlerindeki glisin-NaOH tamponlarda inkübasyon sonunda enzim aktivitesinin yaklaşık % 55'inin korunduğu, artan pH değerlerinde ise proteolitik aktivitenin önemli ölçüde yitirildiği belirlendi.



Şekil 6.40: *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının +4 °C'ta bir haftalık pH kararlılığı grafiği.

### 6.5.3. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkileri

Çeşitli metal tuzlarının 1 ve 10 mM son konsantrasyonda kullanıldığı çalışma ile metal iyonlarının alkalen proteaz aktivitesine etkileri incelendi. Metal iyonları ile 30 °C'ta 30 dakika süreyle yüzleştirilen enzim örneklerinin kalan aktiviteleri, metal içermeden aynı şartlar altında inkübe edilerek aktivitesi belirlenen kontrole görece değerlendirildi (Şekil 6.41, Tablo 6.13). Buna göre; 1 mM  $Ca^{+2}$  iyonunun enzim aktivitesini yaklaşık % 40 artırdığı,  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu 10 katına çıkarıldığında ise proteolitik aktivitenin pozitif kontrole oranla yaklaşık % 100 artış gösterdiği belirlendi.  $Na^{+}$  iyonlarının 1 ve 10 mM konsantrasyonlarda enzim aktivitesini sırasıyla % 7 ve % 29 artırdığı,  $Mn^{+2}$  iyonlarının ise 10 mM konsantrasyonda enzim aktivitesini yaklaşık % 10 artırdığı gözlemlendi.  $Fe^{+2}$  ile  $Fe^{+3}$  iyonlarının her iki konsantrasyonda,  $Cu^{+2}$ ,  $Ba^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  iyonlarının ise 10 mM konsantrasyonda alkalen proteaz aktivitesini % 45-75 oranlarında inhibe ettiği saptandı. Bununla birlikte,  $NH_4Ac$  iyonlarının her iki konsantrasyonunun,  $LiCl$  ve  $NiCl_2$  iyonlarının 10 mM,  $CoCl_2$ 'ün ise 1 mM konsantrasyonlarının enzim aktivitesini önemli ölçüde etkilemediği belirlendi.



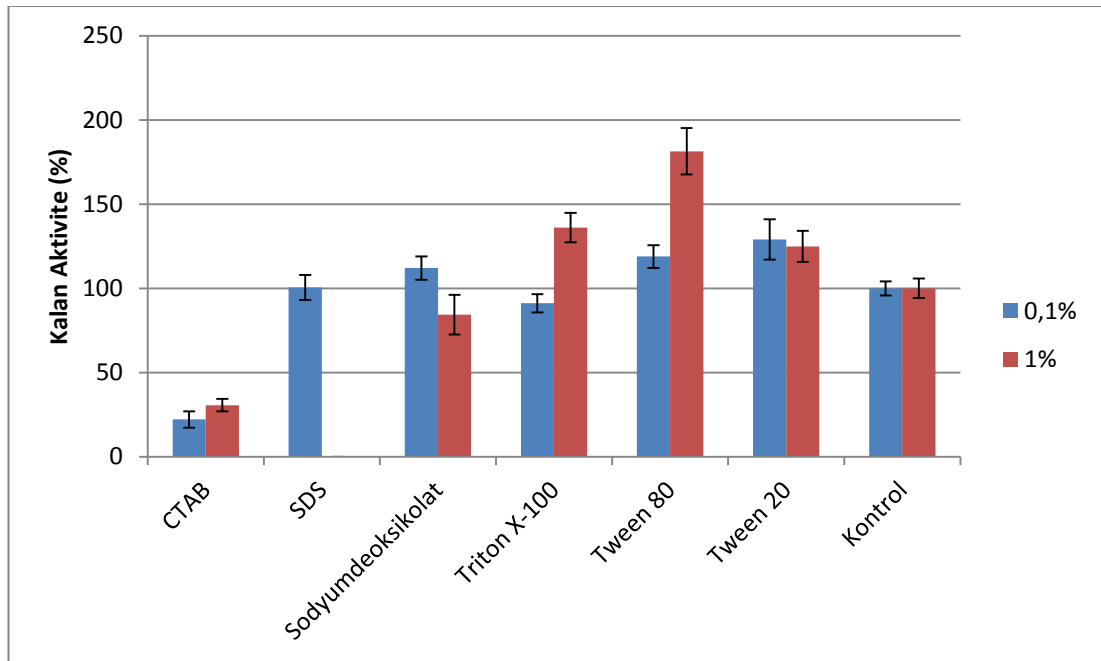
Şekil 6.41: Çeşitli metal tuzlarının *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının aktivitesi üzerine etkileri.

Tablo 6.13: Çeşitli metal tuzlarının *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının aktivitesi üzerine etkileri.

Metal Tuzu	Kalan Aktivite (%)	
	1 mM	10 mM
Kontrol	100,0	100,0
FeCl <sub>2</sub>	45,8	31,4
FeCl <sub>3</sub>	45,9	26,7
LiCl	80,9	97,8
ZnCl <sub>2</sub>	75,4	57,0
NiCl <sub>2</sub>	88,3	95,7
CoCl <sub>2</sub>	100,8	76,9
BaCl <sub>2</sub>	73,2	47,3
CuCl <sub>2</sub>	81,3	26,1
CaCl <sub>2</sub>	146,9	199,0
KCl	89,9	65,8
MnCl <sub>2</sub>	84,5	110,9
MgCl <sub>2</sub>	85,0	88,0
NaCl	107,5	128,6
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	78,6	53,4
NH <sub>4</sub> Ac	91,9	93,3
FeSO <sub>4</sub>	67,2	55,3
ZnSO <sub>4</sub>	84,9	88,7

#### 6.5.4. Deterjanların Enzim Aktivitesine Etkileri

Çeşitli deterjanlar ile 30 °C'ta 30 dakika inkübe edilen enzim örnekleri aktivite testine alındı. Elde edilen aktivite değerleri deterjan içermeksizin aynı koşullar altında inkübe edilen örneğin aktivite değerine görece değerlendirildi ve kalan aktivite hesaplandı (Şekil 6.42, Tablo 6.14). Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; % 0,1 ve % 1 final derişimlerinde Tween 80'in, enzim aktivitesini, sırasıyla, % 19 ve % 81; aynı derişimlerde Tween 20'nin ise, sırasıyla, % 29 ve % 25 oranlarında artırdığı saptandı. Triton X-100'ün % 1 konsantrasyonda alkale proteaz aktivitesini % 36 oranında yükselttiği, bununla birlikte % 0,1 konsantrasyonda enzim aktivitesini % 9 oranında inhibe ettiği belirlendi. Sodyum deoksikolatın ise enzim aktivitesini % 0,1 derişimde % 12 artırırken, % 1 derişimde % 16 inhibe ettiği görüldü. CTAB'ın her iki derişimde de enzim aktivitesini büyük oranda (% 70-80) inhibe ettiği gözlemlendi. *Bacillus* sp. P22 alkale proteazının % 0,1 SDS varlığından etkilenmediği, ancak SDS konsantrasyonunun on katına çıkması sonucunda proteolitik aktivitenin tamamen yitirildiği gözlemlendi.



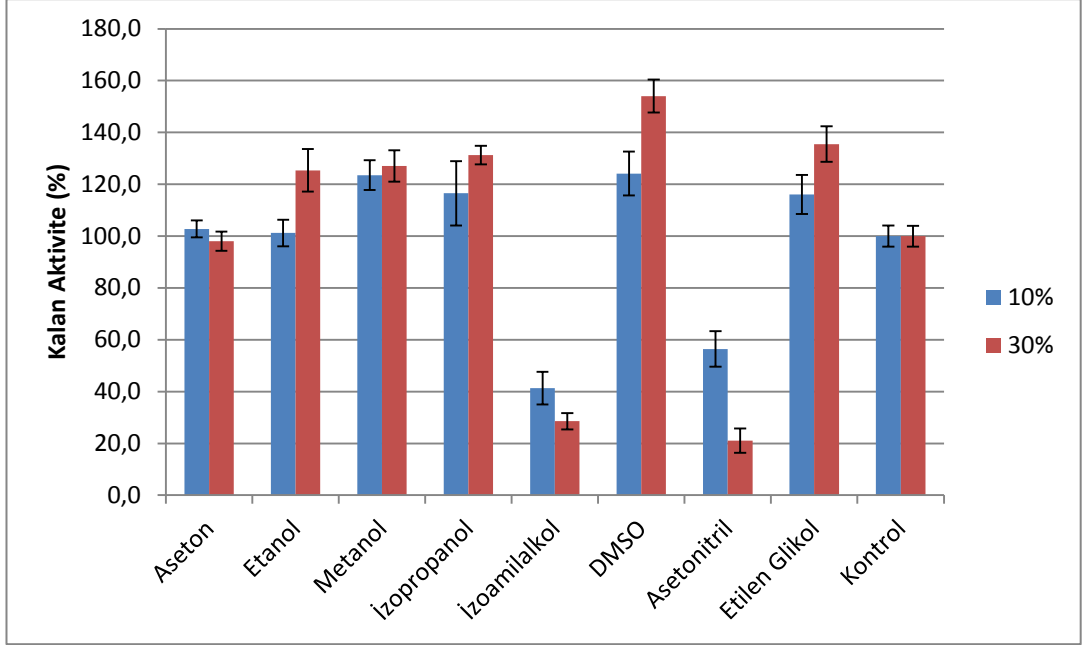
Şekil 6.42: Çeşitli deterjanların *Bacillus* sp. P22 alkale proteazının aktivitesi üzerine etkileri.

Tablo 6.14: Çeşitli deterjanların *Bacillus* sp. P22 alkalin proteazının aktivitesi üzerine etkileri.

Deterjan	Kalan Aktivite (%)	
	% 0,1	% 1
Kontrol	100,0	100,0
CTAB	22,1	30,6
SDS	100,4	0
Soydumdeoksikolat	112,0	84,3
Triton X-100	91,1	136,0
Tween 80	118,9	181,4
Tween 20	129,0	124,9

### 6.5.5. Organik Çözücülerin Enzim Aktivitesine Etkileri

% 10 ve 30 oranında organik çözücü ile 30 °C'ta 30 dakika inkübe edilen enzim örneklerinin kalan aktiviteyi çözücü içermeden aynı şartlarda inkübe edilen enzimin aktivite değerine göreceli olarak belirlendi. Sonuçlar Şekil 6.43 ve Tablo 6.15'de verildi. İzoamilalkolün % 10 ve % 30 final konsantrasyonlarda kullanımı sonucunda enzim aktivitesinin, sırasıyla, yaklaşık % 60 ve % 70 oranlarında inhibe olduğu gözlenirken, benzer şekilde, asetonitrilin her iki konsantrasyonda da alkalin proteaz aktivitesini, sırasıyla, % 45 ve % 80 oranında inhibe ettiği gözlemlendi. % 10 derişimde etanol ile % 10 ve % 30 derişimde asetonun proteolitik aktiviteyi hemen hiç etkilemediği belirlenirken, % 10 derişimde metanol, izopropanol, DMSO ve etilen glikolün proteolitik aktiviteyi yaklaşık % 20 oranında artırdığı saptandı. DMSO konsantrasyonunun üç katına çıkması ile enzim aktivitesinin % 54 yükseldiği, benzer şekilde % 30 oranında etanol, metanol ve izopropanol kullanımının ise enzim aktivitesini yaklaşık % 30 artırdığı gözlemlendi. % 30 etilen glikol varlığında ise proteolitik aktivitenin % 35 oranında yükseldiği belirlendi.



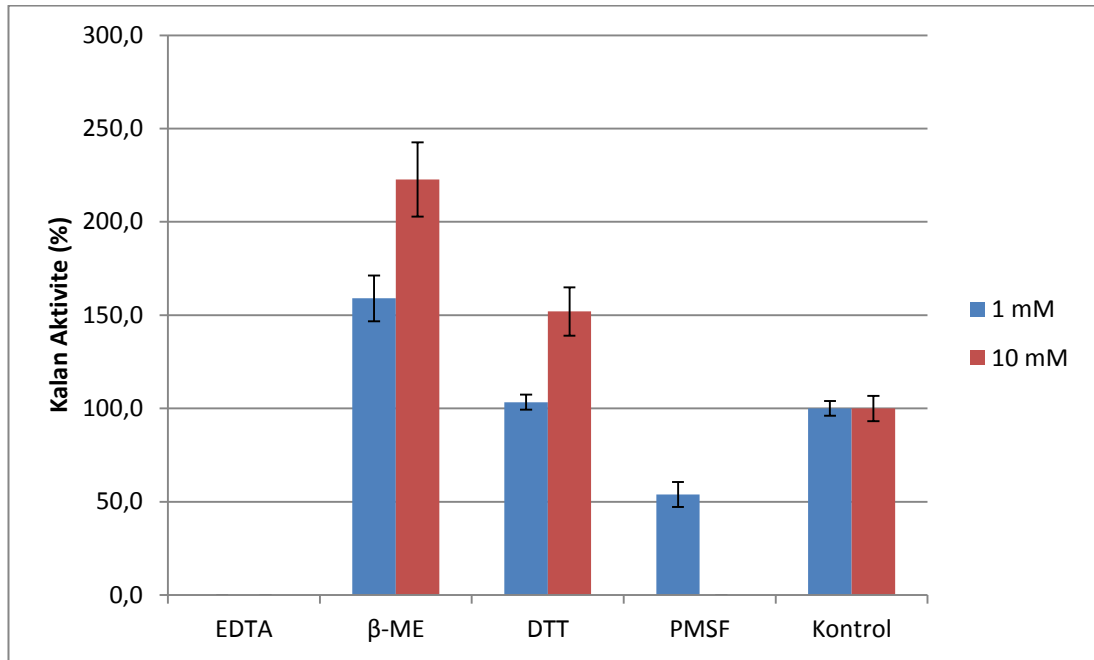
Şekil 6.43: Çeşitli Organik çözücülerin *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının aktivitesi üzerine etkileri.

Tablo 6.15: Çeşitli organik çözücülerin *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının aktivitesi üzerine etkileri.

Organik Çözücü	Kalan Aktivite (%)	
	% 10	% 30
Kontrol	100,0	100,0
Aseton	102,8	98,0
Etanol	101,2	125,4
Metanol	123,5	127,0
İzopropanol	116,5	131,3
İzoamilalkol	41,3	28,6
DMSO	124,1	154,0
Asetonitril	56,4	21,1
Etilen Glikol	116,0	135,5

### 6.5.6. Çeşitli Kimyasal Maddelerin Enzim Aktivitesine Etkileri

1 ve 10 mM son konsantrasyonda EDTA,  $\beta$ -ME, DTT ve PMSF ile 30 °C sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilen enzimin aktivite değerleri, kimyasal madde içermeden aynı şartlarda inkübe edilen enzime görece değerlendirilerek kalan aktivite belirlendi (Şekil 6.44 ve Tablo 6.16). EDTA'nın 1 ve 10 mM derişimde enzim aktivitesini tamamen; PMSF'nin 1 mM derişimde % 46, 10 mM derişimde ise % 100 inhibe ettiği gözlemlendi. 1 mM DTT *Bacillus* sp. P22 alkalin proteazının aktivitesini etkilemezken, 1 mM  $\beta$ ME'ün % 59 artırdığı belirlendi. 10 mM DTT'nin proteolitik aktivite üzerindeki etkisi % 52 oranında artış olarak belirlenirken, 10 mM  $\beta$ -ME'ün ise aktiviteyi % 123 artırdığı gözlemlendi.



Şekil 6.44: Çeşitli kimyasal maddelerin *Bacillus* sp. P22 alkalin proteazının aktivitesi üzerine etkileri.

Tablo 6.16: Çeşitli kimyasal maddelerin *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının aktivitesi üzerine etkileri.

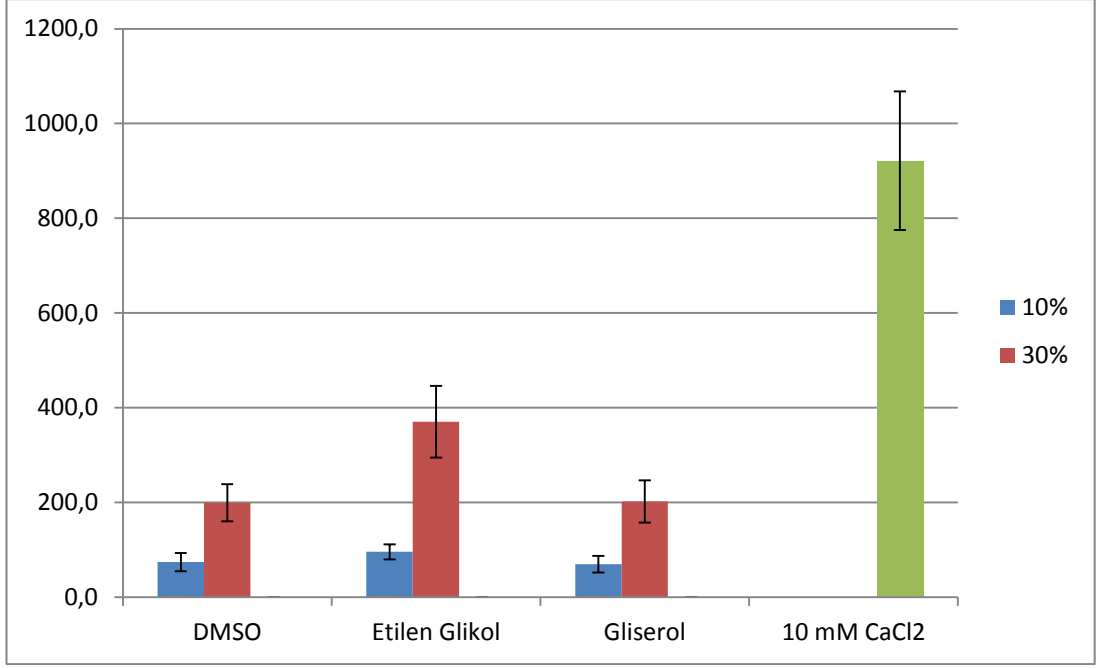
Kimyasal Madde	Kalan Aktivite (%)	
	1 mM	10 mM
EDTA	0	0
PMSF	53,9	0
$\beta$ -ME	159,0	222,8
DTT	103,4	152,0
Kontrol	100,0	100,0

### 6.5.7. Stabilizatörlerin Enzimin Sıcaklık Kararlılığına Etkileri

% 10 ve 30 konsantrasyonlarda DMSO, etilen glikol veya gliserol, 10 mM derişimde  $\text{CaCl}_2$  içeren enzim örneği 50 ve 60 °C'ta 15 dakika inkübe edildi. Stabilizatör içermeyen ve aynı şartlarda inkübe edilen enzim örneğinin aktivite değeri % 100 kabul edilerek kalan aktivite hesaplandı (Şekil 6.45, Şekil 6.46 ve Tablo 6.17).

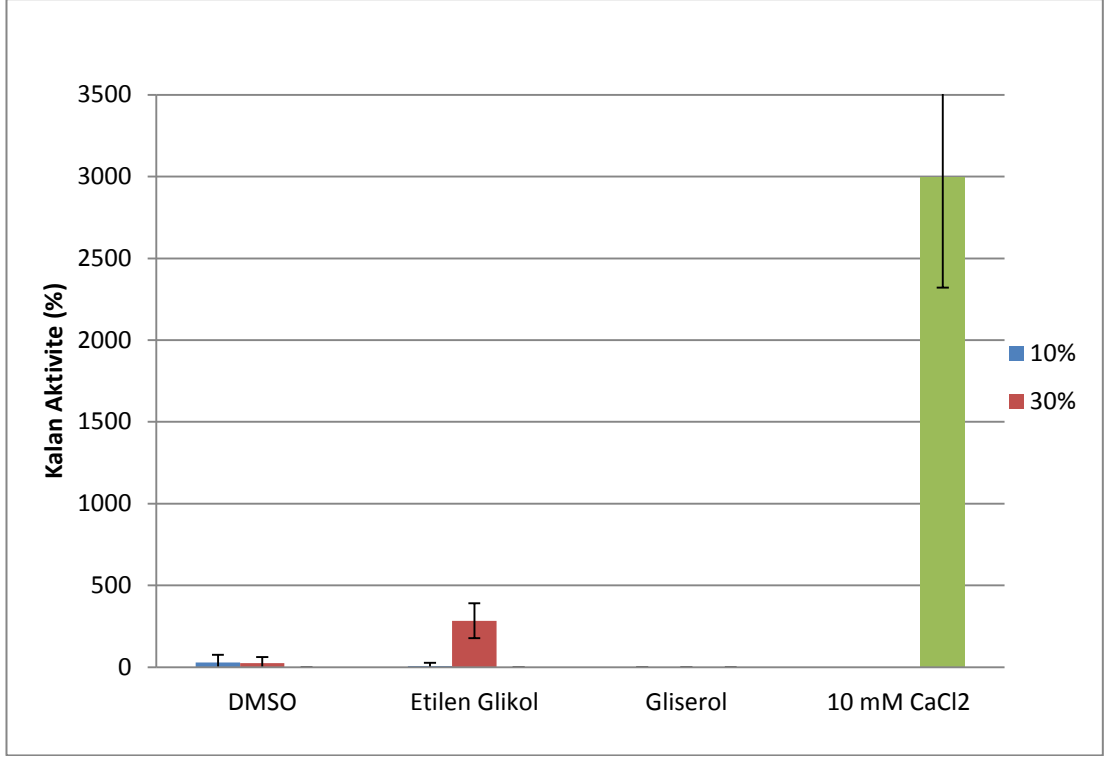
50 °C sıcaklıkta % 30 DMSO ve % 30 gliserol varlığında enzim aktivitesinin iki katına çıktığı gözlemlendi. Bununla birlikte % 30 etilen glikolün enzim aktivitesini yaklaşık 4 kat artırdığı ve 10 mM  $\text{CaCl}_2$ 'ün proteolitik aktiviteyi dokuz kata kadar yükselttiği saptandı (Şekil 6.45, Tablo 6.17).  $\text{CaCl}_2$ 'ün enzimin sıcaklık kararlılığı üzerine etkisinin kullanılan diğer stabilizatörlerden çok daha fazla olduğu gözlemlendi.





Şekil 6.45: Çeşitli stabilizatörlerin 50 °C'ta 15 dakika inkübasyon sonunda *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının aktivitesi üzerine etkileri.

60 °C'ta 10 mM CaCl<sub>2</sub> varlığında enzim aktivitesinin diğer tüm stabilizatörlerden oldukça yüksek olduğu saptandı. Bu sıcaklıkta 15 dakika inkübasyon sonunda % 30 etilen glikolün aktiviteyi yaklaşık 3 kat artırdığı, 10 mM CaCl<sub>2</sub>'ün ise proteolitik aktiviteyi 30 kata kadar yükselttiği gözlemlendi. Buna karşın, % 10 ve % 30 DMSO ile 15 dakika sonunda enzim aktivitesinin ancak % 25 – 30'unun kaldığı, % 10 ve 30 gliserol ile % 10 EG varlığında ise tümüyle inhibe olduğu görüldü (Şekil 6.46, Tablo 6.17).



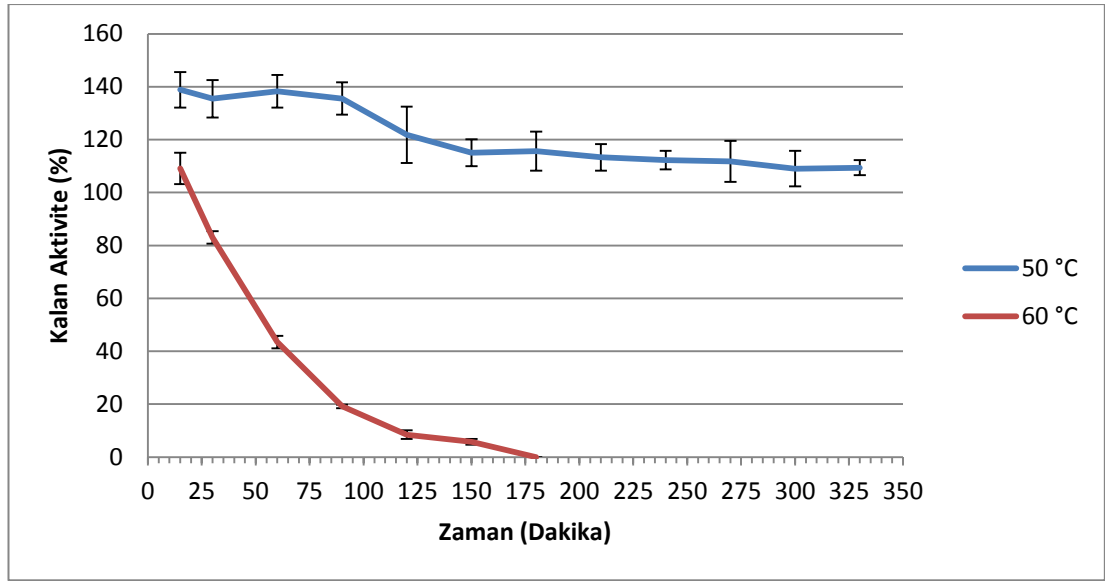
Şekil 6.46: Çeşitli stabilizatörlerin 60 °C'ta 15 dakika inkübasyon sonunda *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının aktivitesi üzerine etkileri.

Tablo 6.17: Çeşitli stabilizatörlerin *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının aktivitesi üzerine etkileri.

Stabilizatör	Kalan Aktivite (%)	
	50 °C	60 °C
% 10 DMSO	74,5	29,9
% 30 DMSO	199,7	25,4
% 10 Etilen Glikol	95,9	7,5
% 30 Etilen Glikol	370,4	283,6
% 10 Gliserol	69,8	0
% 30 Gliserol	202,2	0
10 mM CaCl <sub>2</sub>	921,6	2993,3
Kontrol	100	100

CaCl<sub>2</sub>'ün sıcaklık kararlılığına olumlu etkisinden yola çıkarak, 10 mM CaCl<sub>2</sub> varlığında 50 ve 60 °C sıcaklıklarda enzimin zamana bağlı sıcaklık kararlılığı çalışıldı. Son konsantrasyonda 10 mM CaCl<sub>2</sub> içeren enzim örneği belirtilen sıcaklıklarda 350 dakika boyunca inkübe edildi. Düzenli aralıklarla alınan örneklerle standart aktivite testleri yapıldı. Doğrudan aktivite testine alınan ve CaCl<sub>2</sub> içermeyen enzim örneğinin aktivite değerlerine görece kalan aktiviteler hesaplandı. Elde edilen

bulgular değerlendirildiğinde (Şekil 6.47 ve Tablo 6.18), 50 °C sıcaklıkta enzim aktivitesinin çok büyük oranda korunduğu gözlemlendi. İlk 90 dakikada aktivitenin kontrole görece yaklaşık % 40, sonraki saatlerde ise yaklaşık % 10 yüksek olduğu belirlendi. 50 °C'ta yaklaşık 6 saat inkübasyon sonucunda enzim aktivitesinde kontrole görece herhangi bir azalma gözlenmedi. 60 °C'ta inkübe edilen enzimin ise, 45 dakika sonunda aktivitesinin % 20'sini, 90 dakika sonunda % 80'ini kaybettiği, 175. dakika sonunda ise aktivitenin sıfırlandığı belirlendi.



Şekil 6.47: *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının 10 mM CaCl<sub>2</sub> varlığında zamana bağlı sıcaklık kararlılığı grafiği.

Tablo 6.18: 10 mM CaCl<sub>2</sub>'nin 50 ve 60 °C sıcaklıklarda *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazı üzerine zamana bağlı etkileri.

Zaman (Dakika)	Kalan Aktivite (%)	
	50 °C	60 °C
15	138,9	109,1
30	135,4	83
60	138,3	43,5
90	135,5	19,2
120	121,8	8,5
150	115	5,8
180	115,7	0
210	113,3	0
240	112,3	0
270	111,8	0
300	109	0
330	109,4	0
Kontrol	100	100

## 7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tüm biyokimyasal süreçlerin temelinde yer alan enzimler, moleküllerin degrade edilmesi, kimyasal enerjinin korunması ve dönüştürülmesi ve öncül moleküllerden biyolojik makromoleküllerin biyosentezi gibi yüzlerce tepkimenin gerçekleştirilmesinde rol oynamaktadır.

Enzimlerin sergiledikleri olağanüstü katalitik işlev sentetik veya inorganik katalizörlerin sahip olduğundan çok daha etkilidir; sulu çözeltilerde belirli sıcaklık ve pH koşullarında çalışan enzimler substratlarına karşı yüksek derecede özgüllük göstererek kimyasal tepkimeleri büyük ölçüde hızlandırmaktadır [Lehninger, 2008].

Proteazlar peptit bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir ve hücresel metabolik süreçlerde sahip oldukları önemli işlevlerin yanında çeşitli endüstriyel uygulamalarda giderek artan kullanımlarından dolayı en önemli hidrolitik enzim sınıfı haline gelmiştir [Sundararajan et al., 2011].

Dünya enzim pazarında yaklaşık % 60 pay sahibi olan proteazlar deterjan, deri işleme, gıda ve ilaç sanayilerinde geniş uygulama alanına sahiptir. Pek çok mikroorganizmanın proteaz üretebildiği bilinse de günümüzde ticari olarak satışa sunulan alkalin proteazların çok büyük kısmı *Bacillus* sp. kaynaklıdır. *Bacillus* cinsinin büyük miktarda alkalin proteaz üretebilmesi, bu enzimlerin yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde dikkate değer kararlılık ve proteolitik aktivite sergilemesi bu cinsin en önemli endüstriyel enzim kaynağı olmasını sağlamıştır [Yang et al., 2013], [Vijayaraghavan et al., 2013], [Pillai et al., 2011].

Farklı mikrobiyal kaynaklardan alkalin proteaz üretiminde kullanılacak özel besi yerleri tanımlanmamıştır. Her organizma ya da soy maksimum enzim üretimi için kendi özel koşullarına gereksinim duymaktadır. Besi yerindeki kaynakların tükenmesi, besi yeri kompozisyonu, çözülmüş oksijen, H<sup>+</sup> iyonu gibi çevresel stresler proteaz üretimini etkilemektedir [Beg and Gupta, 2003].

Farklı karbon ve azot kaynakları ile divalen metal iyonlarının fermentasyon ortamına eklenmesi ile bu değişkenlerin alkalin proteaz üretimine olan etkilerinin değerlendirildiği pek çok çalışma mevcuttur. Ayrıca pH, sıcaklık, çalkalama hızı, havalandırma ve aşılama oranı gibi faktörlerin de optimizasyonu yoğun biçimde çalışılmaktadır [Chu, 2007].

Bu tez çalışması kapsamında *Bacillus* sp. P22 soyundan alkalen proteaz üretim koşulları optimize edilmiş, enzim kısmen saflaştırılmış ve nitelendirilmiştir.

Besi yeri ve inkübasyon koşullarının optimizasyonu çalışmalarına enzim üretiminin en verimli olduğu % 1 süt tozu içeren Horikoshi [Horikoshi, 1996] besi yeri temelinde başlanmış, karbon ve azot kaynakları, metal tuzları, inkübasyon sıcaklığı, besi yeri pH'sı, havalandırma ve çalkalama oranı ile aşılama miktarının alkalen proteaz üretimine olan etkileri irdelenmiştir.

*Bacillus* sp. P22 bir ve iki aşamalı olarak sıvı ve katı stoklardan hazırlanan ön kültürler ile canlandırılmış, farklı canlandırma yöntemlerinin alkalen proteaz üretimi üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir. En verimli enzim üretimi, – 20 ve – 80 °C sıvı stoklarından 37 °C sıcaklıkta bir aşamalı olarak hazırlanan ön kültürler kullanılarak büyütülen kültürlerde elde edilmiştir. İki aşamada hazırlanan ön kültürler ile aşılama kültürlerindeki enzim üretimi buna kıyasla oldukça düşük bulunmuştur. LB agar besi yerinde + 4 °C'ta saklanan *Bacillus* sp. P22 hücrelerinin kullanılmasıyla hazırlanan kültürlerde ise enzim aktivitesinin % 25 daha az olduğu belirlenmiştir.

İnkübasyon sıcaklığı enzim üretimindeki bir başka kritik parametredir ve organizmadan organizmaya farklılık göstermektedir. Sıcaklığın enzim biyosentezi ile olan bağlantısı açık şekilde aydınlatılamamış olmakla birlikte, *Bacillus*larda sıcaklık ve oksijen alımı üzerinden kontrol edildiği bilinen, enzim üretimi ve enerji metabolizması arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir [Kumar and Takagi, 1999].

Enzim üretiminin gerçekleştirileceği inkübasyon sıcaklığı büyük ölçüde enzimin kaynağı olan mikroorganizmayla ilgilidir. Örneğin, ksilanaz ürettiği bilinen termofilik bir fungus olan *S. thermophilum*'un optimal büyüme sıcaklığı 45 °C, *Aspergillus oryzae*'nin optimal büyüme sıcaklığı ise 30 °C'tır. Mezofilik sıcaklık aralığının (20-45 °C) dışında enzim üretiminde düşüşler ortaya çıkmaktadır [Thanapimmetha et al., 2012].

Literatürde yer alan çalışmalara bakıldığında alkalofilik *Bacillus* soylarının mezofilik sıcaklıkları tercih ettikleri, optimal büyüme sıcaklıklarının 30-37 °C aralığında olduğu görülmektedir [Banerjee et al., 1999], [Mabrouk et al., 1999].

Optimal alkalen proteaz üretiminin 30-35 °C inkübasyon sıcaklıklarında gerçekleştirildiği çalışmalar olmakla birlikte [Joo et al., 2004], [Potumarthi and Jetty, 2007], daha yüksek sıcaklıklarda en verimli enzim üretiminin gerçekleştirildiği

çalışmalar da bulunmaktadır. Rai ve Mukherjee (2010) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Bacillus subtilis* DM04 soyunun 50 °C inkübasyon sıcaklığında optimal enzim üretimini gerçekleştirdiği rapor edilmiştir [Rai and Mukherjee, 2010].

Bu tez çalışmasında *Bacillus* sp. P22'nin optimal enzim üretimini gerçekleştirdiği sıcaklık 30 °C olarak belirlenmiştir. En yüksek hücre büyümesi 45 °C'ta gözlenmekle birlikte, bu sıcaklıkta enzim üretimi son derece düşük seviyelerde kalmıştır.

Alkalofilik mikroorganizmaların hücre büyümesi ve enzim üretimi fermentasyon ortamının pH'sına sıkı sıkıya bağlıdır. Besi yeri pH'sı pek çok enzimatik süreci etkilediği gibi çeşitli bileşenlerin hücre zarından taşınmasında da önemli bir etkidir. Alkalofillerden yüksek seviyede enzim üretilmesi için kullanılacak besi yerinin pH değeri fermentasyon boyunca pH 7.5'un üzerinde tutulmalıdır. Alkalen proteaz üretiminde kullanılacak besi yeri pH'sının karbonatlar ile ayarlanması sık başvurulan bir yöntemdir. Amonyum iyonlarının fermentasyon ortamına eklenmesinin asiditeyi artırdığı, amino asitler veya peptitler gibi organik azot kaynaklarının metabolize edilmesinin ise pH'yi yükselttiği bilinmektedir. pH değerinde görülen düşüş asidik ürünlerin üretiminden de kaynaklanabilmektedir. Enzim biyosentezi ve azot kaynaklarının kullanımı arasındaki bağlantıdan yola çıkılarak, fermentasyon esnasındaki pH değişimleri proteaz üretiminin kinetikleri ile ilişkilendirilebilir [Moon and Parulekar, 1991], [Aunstrup, 1980].

Bu tez çalışmasında *Bacillus* sp. P22 soyu 30 °C inkübasyon sıcaklığında iki farklı pH değerinde (pH 7.0 ve 10.0) hazırlanan % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yerinde büyütülerek, besi yeri pH'sının enzim üretimine olan etkileri irdelenmiştir. Nötral pH'daki besi yerinde optimal enzim üretimi (80 U/ml/dk) gerçekleştirilmiş, pH 10.0 besi yerinde ise oldukça düşük düzeyde (17 U/ml/dk) enzim aktivitesi elde edilmiştir.

Nilegaonkar ve arkadaşları *Bacillus cereus* MCM B-326 soyu alkalen proteazının üretim koşullarını optimize ettikleri çalışmada, 30 °C sıcaklık ve pH 9.0'da en verimli enzim üretimini gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir [Nilegaonkar et al., 2006].

Benzer bir çalışmada Moorthy ve Baskar, alkalofilik bir *Bacillus* sp. üyesi ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında, pH 11.0 gibi oldukça yüksek bir pH değerinde optimal enzim üretimi saptadıklarını rapor etmişlerdir [Moorthy and Baskar, 2013].

Aşılama oranı mikrobiyal fermentasyon sürecindeki bir diğer önemli değişkendir. Yüksek oranda aşılama, besi yerinde bulunan besin maddeleri için rekabet oluşacağından dolayı enzim üretimini geciktirebilmektedir. Düşük oranda aşılama sonucunda ise fermentasyon ortamında çok az sayıda hücre bulunacağından dolayı enzim biyosentezi düşük seviyelerde kalacaktır. Aşılama oranı optimize edilmesi gereken bir fermentasyon parametresi olarak kabul edilmektedir [Yalemtesfa et al., 2010].

Bu tez çalışmasında ön kültür aşılama miktarının optimizasyonu amacıyla % 1, 2, 5, 10 ve 20 oranları kullanılarak hazırlanan kültürlerdeki enzim üretimi irdelenmiştir. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; % 1 aşılama oranının *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının üretimi için en uygun aşılama oranı olduğu, % 2, 5, 10 ve 20 aşılama oranlarıyla hazırlanan kültürlerde ise enzim üretiminin, % 1 aşılama oranına kıyasla, sırasıyla, % 5, 15, 20 ve 30 daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Reddy ve arkadaşları, *Bacillus* sp. RKY3 soyundan alkalen proteaz üretimini optimize ettikleri çalışmada çeşitli karbon ve azot kaynakları ile % 1, 2 ve 3 aşılama oranının enzim biyosentezine olan etkilerini irdelenmiştir. Bu çalışmada aşılama oranının artmasıyla enzim üretiminin yükseldiği belirlenmiş, optimal aşılama miktarının % 3 olduğu ve bunun üzerindeki oranlarda aşılamanın enzim üretimini etkilemediği bildirilmiştir [Reddy et al., 2008].

Uyar ve Baysal % 10, 15, 20, 25 ve 30 gibi daha yüksek oranda aşılama miktarlarının *Bacillus* sp. alkalen proteazı üretimine olan etkilerini irdelenmiştir. Bu çalışmada % 20 ve 25 aşılama oranları enzim üretimi için optimal değerler olarak bildirilmiş, bunun üzerindeki oranlarda enzim üretiminin azaldığı saptanmıştır [Uyar ve Baysal, 2003].

Havalandırma oranı fermentasyon ortamındaki çözülmüş oksijeni ifade etmektedir. Çeşitli havalandırma oranları, çalkalama hızları veya oksijence zengin ya da oksijen içermeyen gaz fazları (uygun hava-oksijen/hava-azot karışımları) kullanılarak farklı çözülmüş oksijen profilleri oluşturulabilmektedir. Çalkalama hızında meydana gelen değişimler ise erlende ya da biyoreaktörde besi yeri ile havanın karışmasının niteliğini etkileyecektir. Oksijen miktarı büyüme üzerine etkili olduğu gibi proteaz sentezi için de kritik öneme sahiptir [Kumar and Takagi, 1999].

Bu tezde, inkübasyon koşullarının optimize edildiği çalışmalar kapsamında farklı havalandırma oranları ve çalkalama hızlarında enzim üretimleri gerçekleştirilmiştir. 1/3, 1/5, 1/8 ve 1/10 havalandırma oranlarıyla hazırlanan hücre



kültürlerinde, besi yeri/erlen oranının 1/5 ve üzerinde olduğu koşullarda proteaz üretiminin en yüksek ve birbirleriyle benzeşik değerlerde (ortalama 80 U/ml/dk) olduğu; 1/3 havalandırma oranında ise proteaz üretiminin diğer kültürlerle görece yaklaşık % 25 daha düşük olduğu görülmüştür.

*Bacillus* sp. P22 alkalin proteazının üretiminde 150, 200 ve 250 rpm çalkalama hızları denenerek, optimal çalkalama hızı belirlenmiştir. Enzim üretimi için ideal çalkalama hızının 200 rpm olduğu gözlenmiştir. 150 rpm gibi düşük çalkalama hızında büyütülen kültürün enzim üretiminde yaklaşık % 50 düşüş gözlenirken, 250 rpm'de % 25 kayıp olduğu saptanmıştır.

Çeşitli havalandırma oranları ve çalkalayıcı hızlarının enzim üretimine olan etkilerinin biyoreaktör düzeyinde incelendiği bir çalışmada, 1/2, 1/3 ve 1/4 besi yeri/erlen oranları ile 200, 300 ve 400 rpm çalkalayıcı hızları kullanılmıştır. Bu çalışmada 1/3 havalandırma oranı ve 300 rpm çalkalayıcı hızı ile optimal enzim üretiminin gerçekleştiği, 300 rpm'nin altındaki ve üstündeki çalkalayıcı hızlarında enzim biyosentezinin havalandırma oranından bağımsız olarak düşüş gösterdiği bildirilmiştir [Potumarthi and Jetty, 2007].

Bir enzimin üretimi üretici organizmanın büyüme fazıyla doğrudan ilişkilidir. *Bacillus* türlerinde proteaz sentezi tamamen veya kısmen indüklenebilir özelliktedir ve ekspanansiyel fazdan durağan faza geçiş sırasında işleyen sayısız karmaşık mekanizma ile kontrol edilmektedir. Büyümenin durağan fazında hücre dışı proteaz üretiminin bir çok bakteri türünde tipik bir özellik olduğu bilinmektedir [Ferrero et al. 1996], [Olivera et al. 2006], [Bhaskar et al. 2007].

*Bacillus* sp. P22 optimal inkübasyon şartları altında, inkübasyonun 24. saatinde maksimum enzim üretimini gerçekleştirmektedir; enzim biyosentezinin en yüksek olduğu bu zaman hücre büyümesinin durağan fazının erken evrelerine denk gelmektedir. Tez çalışması kapsamında *Bacillus* sp. P22 hücre gelişimi ve alkalin proteaz üretimi 76 saate kadar takip edilmiş, alkalin proteaz üretiminin inkübasyonun çok ileri saatlerinde bile aynı düzeylerde devam ettiği gözlenmiştir.

Besi yeri ve inkübasyon koşullarının optimizasyonu çalışmaları sonucunda; nötral pH'ya sahip % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yerinin (% 0,5 maya özütü, % 0,5 Proteoz pepton, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) *Bacillus* sp. P22 soyunun – 20 °C hücre stoğunun 37 °C sıcaklıkta LB besi yerinde bir aşamalı olarak büyütülmesiyle elde edilen ön kültür ile % 1 oranında aşılması ve kültürün 1/5

havalandırma oranı ve 200 rpm çalkalayıcı hızında, 30 °C'ta inkübe edilmesi kararlaştırılmıştır.

Çeşitli çalışmalarda [Sen and Satyanarayana, 1993], [Phadatare et al.,1993], [Tsuchiya et al., 1997], [Malathi and Chakraborty, 1991] karbon kaynağı olarak laktoz, maltoz, sükroz ve fruktoz gibi şekerlerin kullanımı sonucunda enzim üretiminde artış kaydedilmiş, ancak bu karbon kaynaklarının besi yeri içeriğine yüksek konsantrasyonda eklenmesi enzim sentezini baskılamıştır. Asetik asit, metil asetat ve sitrik asit gibi organik asitlerin alkali pH'da proteaz üretimini desteklediği bilinmektedir. Glikozun katabolit represyona yol açarak proteaz üretimini baskıladığı pek çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Ancak Zamost ve arkadaşları enzim üretimindeki bu baskılanmayı hızlı hücre büyümesinden kaynaklanan pH düşüşü ile ilişkilendirmiştir [Zamost et al., 1990].

Uyar ve Porsuk (2011) tarafından bir *Bacillus* sp. alkalin proteazı ile gerçekleştirilen çalışmada, karbon kaynağı olarak % 1 süt tozu kullanımı ile en yüksek düzeyde proteolitik aktivite elde edilmiş, süt tozu konsantrasyonunun artışı ile alkalin proteaz aktivitesinin inhibe olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada süt tozundan sonra en yüksek aktivite % 1 nişasta varlığında belirlenmiştir [Uyar ve Porsuk, 2011]. Benzer şekilde, *Bacillus* sp. P22 alkalin proteazının üretim koşullarının optimizasyonu çalışmalarında da en yüksek aktivite karbon kaynağı olarak % 1 süt tozu kullanımı sonucunda gözlenmiş, süt tozu konsantrasyonunun % 1'den daha düşük veya yüksek olduğu durumlarda proteolitik aktivitede önemli oranda düşüş kaydedilmiştir. Ek olarak *Bacillus* sp. P22 alkalin proteazının üretiminde denenen karbon kaynakları arasında süt tozundan sonra en iyi aktivite % 1 nişasta içeren besi yerinde belirlenmiştir.

Bu bulguların aksine, Chauhan ve Gupta (2001), *Bacillus* sp RGR-14 soyu ile gerçekleştirdikleri çalışmada, karbon kaynağı olarak nişasta kullanımı ile en yüksek alkalin proteaz aktivitesine ulaşırken, bunu sırasıyla mannitol, maltoz ve gliserolün takip ettiğini rapor etmişlerdir. Yine aynı çalışmada fruktoz, glikoz, mannoz, sükroz ve laktoz gibi kolay metabolize edilebilir basit şekerlerin karbon kaynağı olarak kullanımı sonucu çok düşük seviyede alkalin proteaz aktivitesi gözlemlendiği bildirilmiştir [Chauhan and Gupta, 2001]. Besi yerine karbon kaynağı olarak basit karbonhidratların eklenmesi sonucu enzim üretiminin inhibisyonu yönünde benzer sonuçlar Chi ve arkadaşları (2007) tarafından da elde edilmiş, bu çalışmada

çözülebilir nişasta ve mısır nişastası ile en verimli sonuçların alındığı bildirilmiştir [Chi et al., 2007].

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen besi yeri optimizasyonu çalışmalarında karbon kaynağı olarak glikoz, sükroz, fruktoz ve ksiloz kullanımı sonucunda alkalin proteaz üretiminin % 90 oranında inhibe olduğu; laktoz, maltoz, galaktoz, mannitol, arabinoz, gliserol kullanımı ile ise enzim üretiminin tamamen baskılandığı görülmüştür.

Pek çok araştırmacı tarafından elde edilen bu bulguların aksine, *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 ile, karbon kaynağı olarak laktoz ve glikoz kombinasyonu kullanımı ile en verimli enzim üretiminin gerçekleştirildiği bir çalışma da literatürde mevcuttur [Mabrouk et al., 1999].

Mikroorganizmalar inorganik ve organik azotu metabolize ederek amino asit, nükleik asit, protein ve hücre duvarı bileşenlerinin üretiminde kullanırlar. Alkalin proteazlar % 15,6 oranında azot içermektedir ve üretimleri fermentasyon ortamındaki azot ve karbon kaynaklarına bağlı bulunmaktadır. Alkalin proteaz üretimi için kompleks azot kaynakları gerekli olmakla birlikte, her mikroorganizmanın özgül bir başka azot kaynağına daha ihtiyaç duyduğu bilinmektedir [Kole et al., 1988].

İnorganik azot kaynaklarının kullanımı sonucunda düşük seviyede enzim üretimi gerçekleştiği, amino asitler gibi kolay metabolize edilen azot kaynakları ile amonyum iyonları varlığında alkalin proteaz üretiminin baskılandığı rapor edilmiştir. Glisin proteaz üretimini inhibe ettiği, kazamino asitlerin de alkalin proteaz üretimine benzer etkiler gösterdiği bildirilmiştir [Kumar and Takagi, 1999].

*Bacillus* sp. P22 alkalin proteazının üretimi çalışmalarında besi yerine ilave edilen organik azot kaynaklarından % 1 maya özütü, % 0,5 maya özütü ve % 0,5 N-Z amin A kombinasyonu ile % 1 tripton öne çıkmıştır. Bununla birlikte % 0,5 maya özütü ve % 0,5 Proteoz pepton kombinasyonu ile en yüksek seviyede enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Proteoz pepton tek başına % 1 oranında kullanıldığında ise alkalin proteaz üretiminin çok düşük seviyelerde kaldığı saptanmıştır. Elde edilen proteolitik aktivite değerlerinde maya özütü ve pepton karışımını, sırayla, maya özütü, maya özütü ve N-Z amin A kombinasyonu, et peptonu, soyton ve jelatin izlemiştir. % 0,5 maya özütü ve % 0,5 Proteoz pepton kombinasyonuna ek olarak % 1 oranında jelatin kullanıldığında enzim üretiminin yaklaşık % 10 artış gösterdiği edinilen diğer bir bulgudur.

Shivanand ve Jayaraman bir *Bacillus* sp. proteazının üretim koşullarını optimize ettikleri çalışmalarında, azot kaynağı olarak maya özütü, pepton, et özütü, malt özütü, tripton, kazein ve jelatin kullanmış, en verimli üretimi maya özütü ve pepton kombinasyonu ile elde ettiklerini rapor etmişlerdir [Shivanand and Jayaraman, 2009].

Haloalkalofilik bir *Bacillus* üyesi ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada besi yeri içeriğine kazamino asitler, jelatin, pepton, maya özütü gibi azot kaynakları ilave edilerek alkalen proteaz üretimine etkileri irdelenmiştir. Optimal enzim üretimi kazamino asitlerin kullanımını sonucunda görülmüş, bundan sonraki en yüksek aktiviteyi, sırasıyla, jelatin, pepton ve maya özütü kombinasyonu vermiştir [Patel et al., 2005].

Tez çalışması kapsamında inorganik azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkileri incelenmiş, besi yerine eklenen sodyum nitrat, potasyum nitrat, amonyum sülfat, amonyum fosfat gibi inorganik azot kaynaklarının enzim üretimini baskıladığı kaydedilmiştir. Aynı çalışmada azot kaynağı olarak denenilen aminoasitlerden glisin enzim üretimini tamamiyle inhibe ettiği, asparajinin ise yarı yarıya azalttığı belirlenmiştir.

*Bacillus aquimaris* VITP4 soyu ile gerçekleştirilen bir çalışmada, inorganik azot kaynağı olarak kullanılan amonyum klorür, amonyum nitrat ve amonyum karbonatın enzim üretimini ciddi şekilde baskıladığı bildirilirken [Shivanand ve Jayaraman, 2009], yine çeşitli *Bacillus* sp. üyeleriyle gerçekleştirilen benzer çalışmalarda potasyum nitrat, amonyum sülfat ve amonyum fosfat gibi inorganik azot kaynaklarının proteolitik aktiviteyi inhibe ettiği raporlanmıştır [Wang et al., 2008], [Çalık ve ark., 2003].

Bununla birlikte, *Bacillus licheniformis* TD4 soyunun organik ve inorganik azot kaynaklarını etkin biçimde kullanarak alkalen proteaz ürettiği bilinmektedir. Bu soy ile gerçekleştirilen çalışmada potasyum nitrat, sodyum nitrat, amonyum klorür ve üre gibi inorganik azot kaynakları ile kazamino asitler, pepton ve soya küspesi gibi organik azot kaynaklarının besi yerine eklenmesi sonucunda birbirine oldukça yakın seviyede proteolitik aktivite izlendiği rapor edilmiştir [Suganthi and Mageswari, 2013].

Optimal alkalen proteaz üretimi için kalsiyum, kobalt, bakır, bor, demir, magnezyum, mangan ve molibden gibi divalen metal iyonlarının fermentasyon ortamında bulunması gerekmektedir. Bununla beraber, enzimi üreten organizmaya

özgül olarak gümüş veya çinko gibi metallerin de gerekliliği bilinmektedir. Pek çok çalışmada potasyum kaynağı olarak potasyum fosfat kullanılmaktadır. Potasyum fosfat aynı zamanda fermentasyon ortamında tampon görevi de görmektedir. Potasyum konsantrasyonunun artışı ile enzim üretiminin inhibe olduğu bildirilmiştir. Fermentasyon ortamına eklenen ağır metal iyonlarının da enzim üretimini inhibe ettiği bilinmektedir [Kumar and Takagi, 1999].

Bu tez çalışmasında magnezyum, mangan, kalsiyum, sodyum, potasyum, kobalt, çinko ve demir gibi metal tuzlarının alkalen proteaz üretimine etkileri irdelenmiş, optimal enzim üretiminin % 0,02  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  kullanımı ile gerçekleştiği belirlenmiştir. Kobalt, demir ve çinko gibi ağır metal iyonlarının besi yerine ilave edilmesi sonucunda enzim biyosentezi büyük oranda baskılanmıştır. Besi yerine  $MgSO_4$  yerine  $MgCl_2$  veya  $NaCl$  eklenmesi ile enzim üretiminin yaklaşık % 10 azaldığı görülmüştür. % 0,02  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ile birlikte % 0,5  $NaCl$  varlığında enzim üretiminin yarı yarıya düşüş gösterdiği, % 0,02  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 'a ek olarak aynı oranda  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  kullanımı ile alkalen proteaz biyosentezinin önemli derecede inhibe olduğu saptanmıştır. Besi yerinde hiçbir metal tuzu bulunmadığı durumda ise, enzim aktivitesinin optimal koşullara oranla % 75'inin korunduğu gözlenmiştir.

Potasyum kaynağı olarak kullanılan  $K_2HPO_4$ 'ın besi yerinden çekildiği durumda enzim üretimi % 80 oranında azalmış, optimal üretimin gerçekleştirildiği % 0,1'in üzerindeki konsantrasyonlarda ise enzim üretimi % 20 düşmüştür.

Liu ve Fang *Bacillus sphaericus* DS11 soyundan proteaz üretimini çalışmışlar ve gerçekleştirdikleri optimizasyon çalışmasında üç metal tuzunun enzim üretimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, fermentasyon ortamına çeşitli konsantrasyonlarda  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $NaCl$  ve  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  ayrı ayrı eklenmiş, optimal üretimin  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  varlığında sergilendiği saptanmıştır [Liu et al, 2010].

Benzer bir çalışmada Uyar ve arkadaşları çeşitli metal tuzlarının *Bacillus cereus* CA15 proteazının üretimine etkisini irdelenmiş, optimal enzim üretimini  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ile elde ederken,  $NaCl$  varlığında optimale çok yakın düzeyde üretim gözlemlediklerini bildirmiştir. Bu çalışmada ayrıca, fermentasyon ortamında tuz bulunmadığı durumda da yüksek düzeyde enzim üretimi gözlenmiştir [Uyar ve Porsuk, 2011].

Bir başka çalışmada potasyum kaynağı olarak kullanılan  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ 'ın besi yerinden çekilmesi ile proteaz üretiminin % 65 oranında azaldığı bildirilmiştir [Li et al., 2012].

Pillai ve arkadaşları (2011)'nin bir *Bacillus* sp. alkalen proteazıyla gerçekleştirdiği besi yeri optimizasyonu çalışmasında, fermentasyon ortamına eklenen MgSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> ve BaCl<sub>2</sub> tuzlarının enzim üretimine etkileri incelenmiştir. Alkalen proteaz üretiminin CaCl<sub>2</sub> ve BaCl<sub>2</sub> varlığında artış gösterdiği, FeSO<sub>4</sub> varlığında ise inhibe olduğu rapor edilmiştir [Pillai et al., 2011].

Saflaştırma aşamasında, 24. saatinde durdurulan hücre kültürünün santrifüjlenmesiyle elde edilen üst sıvı enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. % 80 amonyum sülfat ile çöktürülen enzim birbirini takip eden diyaliz ve konsantrasyon adımlarından sonra kromatografi çalışmalarına alınmıştır. DEAE Sefaroz iyon değiştirici kolon kromatografisi ve Sefakril S-100 moleküler elek kromatografisi kullanılarak *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazı üç basamakta kısmen saflaştırılmıştır. Saflaştırma çalışmalarının her adımında toplam protein miktarı ve alkalen proteaz aktivitesi belirlenmiştir. Nitelendirme çalışmalarına alınan Sefakril Havuz 1'de 1,05 mg toplam protein, 6730 U toplam aktivite ve 6414 U/mg spesifik aktivite saptanmış, *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının % 21 verimle 13 kez saflaştırıldığı belirlenmiştir.

İyon değiştirici kromatografi ve jel filtrasyon kromatografisi protein saflaştırmada sıklıkla kullanılan yöntemlerdir. Maruthiah ve arkadaşları *Bacillus subtilis* AP-MSU6 proteazını, % 85 amonyum sülfat çöktürmesini takiben DEAE Sefaroz iyon değiştirici kromatografi ve Sefadeks G-75 jel filtrasyon kromatografisi ile iki basamakta % 23 verimle 27 kez saflaştırmışlardır [Maruthiah et al., 2013].

*Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının moleküler ağırlığının belirlenmesi amacıyla SDS-PAGE analizleri gerçekleştirilmiştir. Jel filtrasyon kromatografisi sonucunda elde edilen enzim havuzunun SDS-PAGE analizi sonucunda yaklaşık 28 kDa ağırlığında bir bant proteolitik aktiviteyle ilişkilendirilmiştir. Bu sonucun doğrulanması amacıyla yapılan ve substrat olarak ayırma jelinde % 0,1 oranında jelatin içeren zimogram analizinde, bu bant ile paralel bir hidroliz bandı gözlenmemiş; bununla birlikte daha ağır bir protein molekülü ile bağlantılı olması muhtemel bir hidroliz zonu saptanmıştır. Bu sonuç enzimin birden fazla sayıda alt birimi olabileceğini akla getirmektedir. Bu durum, β-ME içermeyen yükleme tamponu ile kaynatılmadan yüklenen proteinin, zimogram jelinde daha büyük görünmesini açıklayabilir. Bir diğer olasılık ise; zimogram jelinde bulunan substrat nedeniyle proteazın jeldeki yürümesinin gecikmesi olabilir. *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının moleküler ağırlığının belirlenmesi amacıyla, zimogram analizlerinin

substrat içermeyen jellerle yinelenmesi, ayrıca denatürleyici ve denatürleyici olmayan PAGE analizlerinin gerçekleştirilmesi planlanmaktadır.

Mikrobiyal alkalin proteazların moleküler ağırlıklarının 15-30 kDa arasında olduğu bilinmektedir [Kumar and Takagi, 1999].

Enzim, iki basamakta gerçekleştirilen kromatografi aşamasının ardından nitelendirme çalışmalarına alınmıştır. Bu çalışmalarda enzim çeşitli metaller, deterjanlar ve organik çözücülerle etkileştirilmiştir. Enzimin sıcaklık kararlılığı çalışmalarından elde edilen bulguların ışığında, enzimin endüstriyel süreçlere uyumluluğunun değerlendirilmesi amacıyla etkileşme koşulları, ticari bir deterjanın ortalama yıkama sıcaklığı ve süresi de gözetilerek 30 °C sıcaklık ve 30 dakika olarak belirlenmiştir.

*Bacillus* sp. alkalin proteazlarının 30-60 °C sıcaklık aralığında aktivite sergilediği ve pH 7.0-11.0 arasında aktif oldukları bilinmektedir. Bu pH aralığının dışında kalan pH değerlerinde enzimin üç boyutlu yapısının değişmesi ve yüklü amino asitler arasındaki elektrostatik etkileşimlerin bozulması sonucunda enzim aktivitesinde düşüşler ortaya çıktığı düşünülmektedir [Horikoshi, 1999], [Gupta et al., 2002], [Joo et al., 2006].

Nitelendirme çalışmalarının ilk aşamasında kısmen saflaştırılan enzimin optimal çalışma sıcaklığı ve pH'sının belirlenmesi amacıyla, 5-65 °C sıcaklık ve 6-12 pH aralığında aktivite testleri gerçekleştirilmiştir. *Bacillus* sp. P22 alkalin proteazının optimal çalışma sıcaklığı 40 °C, optimal çalışma pH'sı 10.5 olarak belirlenmiştir.

Ayrıca enzimin kararlı olduğu sıcaklık ve pH aralıkları da belirlenmiştir. *Bacillus* sp. P22 alkalin proteazının sıcaklık kararlılığının belirlenmesi amacıyla 10, 20, 30, 40, 45, 50 ve 55 °C sıcaklıklarda 15 dakika bekletilen enzim dilüsyonu optimal koşullarda aktivite testine alınmış, enzimin 10-30 °C sıcaklık aralığında başlangıç aktivitesinin % 90'ını, 40 °C'ta 15 dakika inkübasyondan sonra ise başlangıç aktivitesinin % 75'ini koruduğu saptanmıştır. 40 °C'ın üzerindeki sıcaklık değerlerinde ise enzim aktivitenin hızla yitirildiği gözlenmiştir.

30 °C sıcaklıkta enzimin zamana bağlı sıcaklık kararlılığı çalışılmış, 15. dakikada enzim aktivitede % 10, 30. dakikada % 40 kayıp belirlenirken, 60. dakikadan itibaren enzim aktivitesinin % 80 oranında yitirildiği görülmüştür.

Belirlenen pH değerlerinde hazırlanan tamponlar içinde + 4 °C'ta 18 saat ve bir hafta süreyle bekletilen enzim dilüsyonlarının kalan aktiviteleri optimal tepkime koşullarında belirlenerek enzimin kararlı olduğu pH aralığı irdelenmiştir. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; + 4 °C'ta 18 saat sonunda enzimin pH 8-11 aralığında aktivitesinin % 80'inin, bir hafta sonunda ise pH 8.5 ve 9'da yaklaşık % 70'inin korunduğu belirlenmiştir.

*Bacillus* sp. SSR1 alkalin proteazının optimal çalışma sıcaklığının 40 °C olduğu, bu sıcaklıkta 300 dakika inkübasyondan sonra bile aktivitesinin % 100 oranında korunduğu, enzimin pH 8-11 arasında kararlı olduğu bildirilmiştir [Singh et al., 2001].

Bhaskar ve arkadaşları *Bacillus proteolyticus* CFR3001 soyundan kısmen saflaştırdıkları alkalin proteazın optimal çalışma sıcaklığının 40 °C olduğunu, 60 °C'ta enzim aktivitesinin % 20'sinin yitirildiğini bildirmiştir [Bhaskar et al., 2007].

Daha yüksek pH ve sıcaklıklarda kararlı olan enzimler de bulunmaktadır. *Bacillus circulans* DZ100 alkalin proteazının optimal çalışma sıcaklığı ve pH'sının 85 °C ve 12.5 olarak saptandığı bir çalışmada, enzimin pH 9-12 aralığında aktivitesinin % 95'ini koruduğu bildirilmiştir. Enzimin pH 8'de 70 °C'ta 48 saat inkübasyon sonunda aktivitesini % 80 oranında koruduğu, pH 12.5'de 70, 80, 90 ve 100 °C'taki yarılanma ömrünün sırasıyla 18, 12, 4 ve 1 saat olduğu belirlenmiştir [Benkiar et al., 2013].

Proteazların, en yüksek seviyede proteolitik aktivite için divalen katyonlara gereksinim duydukları ve divalen metal iyonlarının enzimlerin sıcaklık kararlılığına etki ettiği bilinmektedir. Bununla birlikte ağır metal iyonlarının enzim aktivitesini inhibe ettiği gerçekleştirilen çalışmalarla gösterilmiştir [Kumar and Takagi, 1999].

Çeşitli metal iyonlarının enzim aktivitesine etkilerinin saptanması amacıyla 1 ve 10 mM son konsantrasyonlarda metal tuzları ile etkileştirilen enzim çözeltisi 30 °C'ta 30 dakika inkübe edildikten sonra optimal koşullarda aktivite testi yapılarak kalan aktiviteler belirlenmiştir.

Kısmen saflaştırılan *Bacillus* sp. P22 alkalin proteazının aktivitesi, 1 mM CaCl<sub>2</sub> varlığında % 40 artmış, CaCl<sub>2</sub> derişiminin 10 katına çıktığı durumda ise yaklaşık iki kat yükseliş göstermiştir. Proteolitik aktiviteye olan etkisinin yanında CaCl<sub>2</sub> enzimin sıcaklık kararlılığını da önemli düzeyde artırmıştır. 10 mM CaCl<sub>2</sub> varlığında 50 ve 60 °C sıcaklıklarda 15 dakika inkübe edilen enzimin kalan aktivitesi



belirlenmiş, stabilizatör içermeyen örneğe görece enzim aktivitesinin 50 °C'ta 9 ve 60 °C'ta 30 katına çıktığı belirlenmiştir. 10 mM CaCl<sub>2</sub> varlığında 50 °C'ta 330 dakika boyunca alkalin proteaz aktivitesi takip edilerek enzimin bu sıcaklıkta zamana bağlı sıcaklık kararlılığı irdelenmiştir. 120. dakikaya kadar enzim aktivitesinin % 85'inin, 330. dakika sonunda ise % 78'inin korunduğu saptanmıştır. Yapılan bir diğer çalışmayla 60 °C sıcaklıkta 10 mM CaCl<sub>2</sub> varlığında enzimin 175 dakika süreyle aktivitesi takip edilerek inaktivasyon eğrisi hazırlanmıştır. Bu sıcaklıkta enzim aktivitesinin 30. dakika sonunda % 75, 60. dakika sonunda % 40 ve 90. dakika sonunda ancak % 17 oranında korunduğu, 175. dakikada ise bütünüyle kaybolduğu gözlenmiştir.

Joshi ve Satyanarayana (2013) *Bacillus lehensis* alkalin proteazının 60 °C'taki sıcaklık kararlılığını glisin, gliserol, dekstran, PEG 4000 ve CaCl<sub>2</sub> gibi farklı stabilizatörler varlığında irdelenmiş, CaCl<sub>2</sub> bu sıcaklıkta enzimin sıcaklık kararlılığını en yüksek seviyede artıran stabilizatör olarak raporlanmıştır [Joshi and Satyanarayana, 2013].

Bu tez çalışmasında 10 mM MnCl<sub>2</sub> ve NaCl'ün *Bacillus* sp. P22 alkalin proteazının aktivitesini, sırasıyla, % 11 ve % 28 artırdığı belirlenirken, Fe<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup> ve Ba<sup>+2</sup> iyonlarının proteolitik aktiviteyi inhibe ettiği saptanmıştır.

Deng ve arkadaşları (2010) *Bacillus* sp. B001 alkalin proteazının proteolitik aktivitesinde 5 ve 10 mM CaCl<sub>2</sub> varlığında, sırasıyla, % 115 ve % 108 yükseliş kaydetmişlerdir. Aynı çalışmada 10 mM Fe<sup>+3</sup>, Fe<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+2</sup> ile enzim aktivitesinin, sırasıyla, % 95, % 46 ve % 66 oranında inhibe olduğu rapor edilmiştir [Deng et al., 2010].

*Bacillus subtilis* AP-MSU6 alkalin proteazının 0,5 M NaCl varlığında maksimum aktivite sergilediği bildirilmiştir [Maruthiah et al., 2013].

Bir *Bacillus* sp. serin alkalin proteazı ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada, kısmen saflaştırılan enzimin kalsiyum, magnezyum, mangan, çinko ve bakır gibi metal iyonları varlığında aktivitesi irdelenmiş, enzim aktivitesinin anılan metal iyonlarından hemen hiç etkilenmediği bildirilmiştir [Bhunia et al., 2013].

Bir enzimin çamaşır veya bulaşık deterjanlarında kullanıma uygunluğu, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında deterjan özellikteki kimyasallar ile uyumluluğuna önemli ölçüde bağlıdır. Bir çok çamaşır deterjanının pH değeri genellikle 9.0-12.0 arasında olduğundan, alkali pH'da yüksek kararlılık ve aktivite sergileyen proteazlar biyoteknolojik uygulamalarda, özellikle de deterjan endüstrisinde kullanıma oldukça

uygundur. Yıkama çözeltisinin pH'sı, yıkama sıcaklığı ve deterjan bileşimi deterjan proteazlarının performansını etkileyen unsurlardır. Bu nedenle ideal deterjan enziminin çeşitli yıkama sıcaklıklarında, yüzey aktif maddeler ve oksitleyici ajanlar varlığında uzun süre aktivite ve kararlılığını koruyabilmesi gerekmektedir [Haddar et al., 2009], [Banik and Prakash, 2004].

*Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının çeşitli deterjanlar varlığındaki aktivitesi değerlendirmiştir. Bu amaçla % 0,1 ve 1 konsantrasyonlarında CTAB, SDS, sodyumdeoksikolat, Triton X-100, Tween 80 ve Tween 20 ile 30 °C'ta 30 dakika inkübe edilen enzim dilüsyonlarının kalan aktiviteleri belirlenmiştir. % 1 Tween 80 varlığında enzim aktivitesinin % 81 oranında artış gösterdiği, aynı derişimde Tween 20 ve Triton X-100'ün proteolitik aktiviteyi, sırasıyla, % 25 ve % 36 artırdığı, % 0,1 konsantrasyonda Tween 80 ve Tween 20'nin ise enzim aktivitesini, sırasıyla, % 19 ve % 29 yükselttiği saptanmıştır.

Elde edilen bulgular literatürde yer alan çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur. *Bacillus licheniformis* NH1 alkalen proteazının % 1 Triton X-100 ve Tween 20 ile 40 °C'ta 1 saat inkübasyon sonunda aktivitesini koruduğu bildirilmiştir [Hmidet et al., 2009].

Jellouli ve arkadaşları saflaştırdıkları *Bacillus licheniformis* MP1 alkalen proteazını nitelendirdikleri çalışmalarında, enzimi çeşitli deterjanlar ile 40 °C'ta 1 saat inkübe ederek, % 5 Triton X-100, Tween 80 ve Tween 20 varlığında enzim aktivitesinin korunduğunu raporlamışlardır [Jellouli et al., 2011].

Katyonik bir deterjan olan CTAB, % 0,1 ve % 1 konsantrasyonda enzim aktivitesini % 70-80 oranında inhibe etmiş, % 1 SDS varlığında aktivite tamamen kaybolmuştur. Enzim aktivitesinin % 0,1 SDS varlığından etkilenmediği saptanmıştır.

El Hadj-Ali ve arkadaşları *Bacillus licheniformis* NH1 alkalen proteazının % 0,1 SDS ile 40 °C'ta 1 saat inkübasyon sonunda aktivitesini % 98 oranında koruduğunu, SDS oranının % 0,5 olduğu durumda ise proteolitik aktivitenin % 20'sinin kaybedildiğini bildirmiştir [El Hadj-Ali et al., 2007].

Triton X-100, Tween 80 ve Tween 20 gibi anyonik yüzey aktif maddeler varlığında 30 °C sıcaklıkta 30 dakika boyunca kararlılığını koruyan veya aktivitesinde % 81'e kadar artış gözlenen *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının düşük sıcaklıklarda aktif bir deterjan enzimi olarak kullanım potansiyeli bulunmaktadır.

Enzimlerin organik çözücüler içerisinde kullanımı, son yıllarda yeni bir biyokataliz sürecini ortaya çıkarmıştır. Proteazların sulu olmayan ortamlarda peptit ve ester sentezine olan uygunlukları, organik çözücüler içerisinde yüksek kararlılık ve aktivite sergileyen proteazlara olan ihtiyacı beraberinde getirmiştir. Ayrıca poliollerin enzimlerin sıcaklık kararlılığını ve saklanma sürelerini artırdığı bilinmektedir [Vulfson et al., 2001], [Fagain, 2003].

Çözücülerin enzim molekülünü çevreleyen su molekülleri ile etkileşmek yoluyla enzimatik aktiviteyi etkiledikleri bilinmektedir. Yüksek polar çözücüler katalitik aktivite için gerekli suyu enzimden uzaklaştırarak aktivite kaybına yol açmaktadır. Organik çözücünün polaritesi yükseldikçe enzim aktivitesinde düşüş gözlenmektedir. Subtilisin gibi *Bacillus* spp. proteazlarının hidrofilik çözücülere karşı toleransı bulunmamaktadır [Li et al., 2009].

Bu tez çalışmasında, çeşitli organik çözücüler varlığında aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kısmen saflaştırılmış enzim, % 10 ve 30 oranlarında aseton, etanol, metanol, izopropanol, izoamilalkol, DMSO, asetonitril ve etilen glikol ile 30 °C sıcaklıkta 30 dakika süreyle inkübe edildikten sonra aktivite testine alınarak kalan aktiviteler belirlenmiştir. DMSO'nun enzim aktivitesini % 10 ve % 30 konsantrasyonda, sırasıyla, % 24 ve % 54 oranlarında yükselttiği saptanmış, % 30 etanol, metanol ve izopropanol varlığında enzim aktivitesinin yaklaşık % 30 arttığı belirlenmiştir. İzoamil alkol ve asetonitrilin proteolitik aktiviteyi her iki konsantrasyonda da inhibe ettiği gözlenmiştir.

Elde edilen bulguları destekler nitelikte çalışmalar bulunmaktadır. *Bacillus koreensis* BK-P21A soyundan saflaştırılan alkalen proteaz ile % 50 oranında DMSO, etanol ve izopropanol varlığında sırasıyla % 100, % 104 ve % 124 kalan aktivite değerleri elde edildiği rapor edilmiştir [Anbu, 2013].

Literatürde yer alan bir başka çalışmada, 40 °C'ta bir saat süreyle % 50 oranında organik çözücüler ile inkübe edilen *Bacillus licheniformis* YP1A proteazının DMSO varlığında aktivitesini % 95 oranında koruduğu bildirilmiştir [Li et al., 2009].

Stabilize edici ajanların *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının sıcaklık kararlılığı üzerine etkilerinin irdelendiği çalışmalarda, % 10 ve 30 son derişimde DMSO, etilen glikol ve gliserol ile 50 °C sıcaklıkta 15 dakika inkübe edilen enzimin sıcaklık kararlılığının arttığı görülmüştür. % 30 DMSO ve gliserol varlığında enzim aktivitesinin iki kat, % 30 etilen glikol varlığında ise 3,6 kat arttığı belirlenmiştir.

Benzer şekilde % 30 etilen glikol ile 60 °C sıcaklıkta 15 dakika yüzleştirilen enzimin aktivitesini yaklaşık 3 kat artırdığı edinilen diğer bulgular arasındadır. Bununla beraber DMSO ve gliserol 60 °C sıcaklıkta enzimin sıcaklık kararlılığını artırıcı etki göstermemiştir.

Organik çözücülerin enzimin sıcaklık kararlılığına etkilerinin irdelendiği bir çalışmada, optimal çalışma sıcaklığı 50 °C olan *Oceanobacillus* sp. alkalen proteazının 70 °C sıcaklıkta % 30 izooktan varlığında aktivitesinin % 60'ını koruyabildiği bildirilmiştir [Pandey et al., 2012].

Jain ve arkadaşları, bir *Bacillus* sp. alkalen proteazı ile gerçekleştirdikleri çalışmada 37 °C sıcaklıkta % 50 hegzan varlığında 192 saat boyunca enzimatik aktivitenin tamamına yakınının korunduğunu bildirmiştir [Jain et al., 2012].

Bu tez çalışmasında, EDTA,  $\beta$ -ME, DTT ve PMSF gibi kimyasal maddeler ile 1 ve 10 mM son konsantrasyonda 30 °C sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilen *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının kalan aktivitesi belirlenmiştir. Bir metal şelatlayıcı olan EDTA 1 ve 10 mM konsantrasyonlarda alkalen proteaz aktivitesini tamamen inhibe etmiştir. Bu bulgu *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının metal iyonlarına gereksinim duyduğuna ve bir metalloproteaz olabileceğine işaret etmektedir.

*Bacillus pumilus* CBS alkalen proteazının saflaştırılarak nitelendirildiği bir çalışmada Jaouadi ve arkadaşları 25 °C'ta 30 dakika süreyle 1 ve 5 mM EDTA varlığında enzimatik aktivitenin sırasıyla % 86 ve 80 oranında korunduğunu bildirmişlerdir [Jaouadi et al., 2008].

Bir serin proteaz inhibitörü olan PMSF'nin reaksiyon ortamında 1 mM son derişimde bulunduğu durumda *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının aktivitesinin % 54'ünün korunduğu, PMSF derişiminin 10 mM olduğu durumda ise enzim aktivitesinin tamamen yitirildiği belirlenmiştir.

Literatürde yer alan bir çok çalışmada 1 mM PMSF varlığında alkalen proteaz aktivitesinin tamamına yakınının yitirildiği rapor edilmiştir [Johnvesly and Naik, 2001; Shrinivas and Naik, 2011; Shankar et al., 2011].

Bir denatürleyici ajan olan DTT'nin 1 ve 10 mM konsantrasyonlarda *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının aktivitesini, sırasıyla, % 3 ve % 52 oranında artırdığı saptanmıştır. Yine bir başka denatürleyici kimyasal olan  $\beta$ -ME varlığında enzim aktivitesi önemli oranda artış göstermiştir. 1 mM  $\beta$ -ME varlığında alkalen proteaz

aktivitesi % 59 artarken,  $\beta$ -ME derişiminin on katına çıktığı durumda enzim aktivitesi % 123 yükselmiştir.

Damare ve arkadaşları *Aspergillus utus* NIOCC20 proteazının DTT ve  $\beta$ -ME gibi iki denatürleyici ajandan etkilenmediğini bildirerek, enzimin tiyol grubu içermediği sonucuna varmışlardır (Damare et al., 2006). Bu bulguyu destekler şekilde DTT ve  $\beta$ -ME'ün *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının aktivitesini inhibe etmemiş olması, enzimin tiyol grupları içermediğini düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasında, GYTE Enzim Moleküler Genetiği grubunca Gönen Dağ İlıcası'ndan izole edilmiş *Bacillus* sp. P22'nin alkalen proteaz üretiminin optimizasyon çalışmaları yapılmış, ayrıca enzim kısmi olarak saflaştırılmış ve nitelendirilmiştir. *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının üretiminin optimizasyonu için besi yeri içeriği ve pH'sı, inkübasyon sıcaklığı, havalandırma, çalkalama ve aşılama oranı parametreleri ile çalışılmıştır. Elde edilen veriler sonucunda, *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının üretimi için optimal koşullar; 30°C inkübasyon sıcaklığı, 1/5 havalandırma, 200 rpm çalkalama hızı, % 1 süt tozu içeren Horikoshi besi yeri, pH 7.0 olarak belirlenmiştir.

Tezin ikinci aşaması olan enzim saflaştırma çalışmalarında ise *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazı amonyum sülfat çöktürmesinin ardından iyon değıştirici ve jel filtrasyon kromatografi basamakları kullanılarak besi yeri üst sıvısından % 21 verimle 13 kez saflaştırılmış olup, spesifik aktivitesi 6414 U/mg hesaplanmıştır. Elde edilen kısmi saflaşmış enzim ile yapılan nitelendirme çalışmaları sonucunda ise, *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazının mezofilik, alkali pH'larda etki gösteren, CaCl<sub>2</sub> varlığında sıcaklık kararlılığı artan bir alkalen proteaz olduğu belirlenmiştir. Bu yönüyle enzimin endüstriyel süreçlerde kullanılmaya aday olabilecek bir deterjan katkı maddesi olabileceği düşünülmektedir.

Deterjan enzimleri genel olarak pH optimumları alkalen olan ve sıcaklık kararlılıkları yüksek enzimlerdir. Ancak iyi bir deterjan enzimi için istenen bir diğer özellik göreceli düşük sıcaklıklarda da aktif olmasıdır. *Bacillus* sp. P22 alkalen proteazı, optimal aktivitesini 40 °C'ta sergilemekte, 30 °C gibi düşük bir sıcaklıkta ise maksimum aktivitesinin % 90'ını korumaktadır. Bununla birlikte, enzim Triton X-100, Tween 80 ve Tween 20 gibi anyonik yüzey aktif maddeler varlığında 30°C sıcaklıkta 30 dakika boyunca kararlılığını korumaktadır; bu durum enzimin düşük sıcaklıklarda kullanıma uygun bir deterjan proteazı olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

- Sonuçlar

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında *Bacillus* sp. P22 alkali proteazının enzim üretim koşulları optimize edilerek enzim saflaştırılmış ve nitelendirilmiştir. Bu alışma ile elde edilen sonuçlar aşağıda listelenmiştir:

- *Bacillus* sp. P22 alkali proteazının optimal çalışma sıcaklığı 40 C ve optimal çalışma pH değeri 10.5 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, enzimin bir metallo-proteaz olabileceğine yönelik bulgular elde edilmiştir.
- Enzim nitelendirme çalışmalarında elde edilen bulgular, *Bacillus* sp. P22 alkali proteazının 15-50 C gibi geniş bir sıcaklık aralığı ve alkali pH aralığında (pH 8-11) aktif olduğunu göstermiştir. Bu bulgular enzimin özellikle dşuk sıcaklıklarda ve alkali şartlarda gerçekleştirilen endüstriyel uygulamalara elverişliliğine işaret etmiştir.
- Enzimin alkali pH değerlerinde ve SDS, Triton X-100, Tween 80, Tween 20 gibi deterjanlar ve aseton, etanol, metanol, izopropanol ve etilen glikol gibi organik zcler varlığında aktivitesini koruması, *Bacillus* sp. P22 alkali proteazının bir deterjan proteazı olarak potansiyelini ortaya koymuştur.

Tez alışması kapsamında gerçekleştirilen saflaştırma çalışmaları sonucunda enzim beklenen düzeyde saflaştırılamamıştır. Bu nedenle bu aşamadan sonra gerçekleştirilmesi planlanan çalışmalar arasında öncelikle saflaştırma çalışmalarının yinelenmesi ve bunun ardından gerçekleştirilecek çeşitli elektroforez çalışmaları ile *Bacillus* sp. P22 alkali proteazının moleküler ağırlığının doğrulanması bulunmaktadır. Ayrıca enzimin amino asit dizisinin tanımlanmasına yönelik olarak N-terminal protein analizi yapılması ve henz tanımlanmamış bu *Bacillus* soyunun bir kltr koleksiyonuna depo edilmesi dşnlmektedir.

## KAYNAKLAR

Abidi F., Chobert J. M., Haertlé T., Marzouki M. N., (2011), “Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*”, Process Biochemistry, 46, 2301-2310.

Aehle W., (2007), “Enzymes in Industry: Production and Applications Third Completely Revised Edition”, 3rd Edition, Wiley Press Incorporated.

Anandan D., Marmer W. N., Dudley R. L., (2007), “Isolation, characterization and optimization of culture parameters for production of an alkaline protease isolated from *Aspergillus tamarii*”, Journal of Microbiology Biotechnology, 34, 339-347.

Anbu P., (2013), “Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A), International Journal of Biological Macromolecules, 56, 162-168.

Anwar A., Saleemuddin M., (1998), “Alkaline Proteases: A Review”, Bioresource Technology, 64, 175-183.

Anson M. L., (1938), “The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin”, The Journal of General Physiology, 22 (1), 78-89.

Aunstrup K., (1980), “Proteinases”, Economic Microbiology: Microbial Enzymes and Bioconversions, 5, 50–114.

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 Biochemistry, 35, 213-219.

Banik R. M., Prakash M., (2004), “Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*”, Microbial research, 159, 135-140.

Barret A. J., (1994), “Classification of peptidases”, Methods in Enzymology, 244, 1-15.

Bhaskar N., Sudeepa E.S., Rashmi H.N., Tamil S.A., (2007), “Partial purification and characterization of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities”, Bioresource Technology, 98, 2758-2764.

Bhunia B., Basak B., Mandal T., Bhattacharya P., Dey A., (2013), “Effect of pH and temperature on stability and kinetics of novel extracellular serine alkaline protease (70 kDa)”, International journal of Biological Macromolecules, 54, 1-8.

Bhunia B., Basak B., Bhattacharya P., Dey A., (2012), “Process engineering studies to investigate the effect of temperature and pH on kinetic parameters of alkaline protease production”, Journal of Bioscience and Bioengineering, 115, 86-89.

Beg Q. K., Gupta R., (2003), "Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*", *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 294-304.

Benkiar A., Nadia Z. J., Badis A., Rebzani F., Soraya B. T., Rekik H., Naili B., Ferradji F. Z., (2013), "Biochemical and molecular characterization of a thermo- and detergent-stable alkaline serine keratinolytic protease from *Bacillus circulans* strain DZ100 for detergent formulations and feather-biodegradation process", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 83, 129-138.

Bradford M. M., (1976), "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Calik P., Celik E., Telli I. E., Oktar C., Ozdemir E., (2003), "Protein-based complex medium design for recombinant serine alkaline protease production", *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 975-986.

Chauhan B., Gupta R., (2001), "Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14", *Process Biochemistry*, 39, 2115-2122.

Chi Z., Ma C., Wang P., Li H. F., (2007), "Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*", *Biosource Technology*, 98, 534-538.

Chu W. H., (2007), "Optimization of extracellular alkaline protease production from species *Bacillus*", *Journal of Industrial Biotechnology*, 34, 241-245.

Copeland R. A., (2000), "Enzymes: A Practical Introduction to structure, Mechanisms and Data Analysis", 2nd Edition, Wiley Press Incorporated.

Damare S., Raghukumar C., and Raghukumar S., (2006), "Fungi in deep-sea sediments of the Central Indian Basin", *Deep-Sea Research*, 53, 14-27.

Deng A., Wu J., Zhang Y., Zhang G., Wen T., (2010), "Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001", *Bioresource Technology*, 101, 7100-7106.

Drenth J., Jansonius J. N., Koekoek R., Swen H. M., Wolthers B. G., (1968), "Structure of Papain", *Nature*, 218, 929-32.

Dutta J. R., Dutta P. K., Banerjee R., (2004), "Optimization of culture parameters for extracellular protease production from a newly isolated *Pseudomonas* sp. using response surface and artificial neural network models", *Process Biochemistry*, 39, 2193-2198.



El Hadj-Ali B., Agrebi R., Ghorbel-Frikha B., Sellami-Kamoun A., Kanoun S., Nasri M., (2007), “Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1”, *Enzyme and Microbial technology*, 40, 515-523.

Espósito T. S., Amaral I. P. G., Buarque D. S., Oliveira G. B., Carvalho L. B., Bezerra R. S., (2009), “Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent”, *Food Chemistry*, 112, 125-130.

Fagain C., (2003), “Enzyme stabilization-recent experimental progress” *Enzyme Microbial Technology*, 33, 137–149.

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” *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 327-332.

Gupta A., Roy I., Patel R. K., Singh S. P., Khare S. K., Gupta M. N., (2005), “One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp.”, *Journal of Chromatography*, 1075, 103-108.

Gupta R., Beh Q. K., Lorenz P., (2002), “Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications”, *Applied Microbial Biotechnology*, 59, 15-22.

Haddar A., Agrebi R., Bougatef A., Hmidet N., Sellami-Kamoun A., Nasri M., (2009), “Two detergent stable alkaline serine-protease from *Bacillus mojavenis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive”, *Bioresource Technology*, 100, 3366-3373.

Hmidet N., El-Hadj Ali N., Kanoun S. I., Sellami-Kamoun A., Nasri M., (2009), “Alkaline proteases and thermostable  $\alpha$ -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive”, *Biochemical Engineering Journal*, 47, 71-79.

Horikoshi K., (1999), “Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 735-750.

Horikoshi K., (1996), “Alkalophiles – from an industrial point of view”, *FEMS Microbiology*, 18, 259-270.

Jain D., Pancha I., Mishra S. K., Shrivastav A., Mishra S., (2012), “Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from *Bacillus* sp.: A potential additive for laundry detergents”, *Bioresource Technology*, 115, 228-236.

Jaouadi B., Ellouz-Chaabouni S., Rhimi M., Bejar S., (2008), “Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency”, *Biochimie*, 90, 1291-1305.

Jellouli K., Ghorbel-Bellaaj O., Ayed H. B., Manni L., Agrebi R., Nasri M., (2011), "Alkaline-protease from *Bacillus lehensis* MP1: Purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization", *Process Biochemistry*, 46, 1248-1256.

Johnvesly B., Naik G. R., (2001), "Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium", *Process Biochemistry*, 97, 139-144.

Joo H. S., Kumar C. G., Park G. C., Paik S. R., Chang C. S., (2004), "Bleach-resistant alkaline protease produced by a *Bacillus* sp. isolated from the Korean polychaete, *Periserrula leucophryna*", *Process Biochemistry*, 39, 1441-1447.

Joo H. S., Chang C. S., (2006), "Production of an oxidant and SDS-stable alkaline protease from an alkalophilic *Bacillus clausii* I-52 by submerged fermentation: Feasibility as a laundry detergent additive", *Enzyme Microbial Technology*, 38, 176-183.

Joshi S., Satyanarayana T., (2013), "Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium *Bacillus lehensis*", *Bioresource Technology*, 131, 76-85.

Kataoka Y., Takada K., Oyama H., Tsunemi M., James M.N., Oda K., (2005), "Catalytic residues and substrate specificity of scytalidoglutamic peptidase, the first member of the eqolisin in family (G1) of peptidases", *FEBS Letters*, 579, 2991-2994.

Kamphuis I. G., Kalk K. H., Swarte B. A., Drenth J., (1984), "Structure of papain refined at 1.65 Å resolution", *Journal of Molecular Biology*, 179, 233-256.

Kirk O., Borchert T. V., Fuglsang C. C., (2002), "Industrial enzyme applications", *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 345-351.

Kole M. M., Draper I., Gerson D. F., (1988), "Production of protease by *Bacillus subtilis* using simultaneous control of glucose and ammonium concentrations", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 41, 197-206.

Kumar C. G., Takagi H., (1999), "Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint", *Biotechnology Advances*, 17, 561-594.

Lageiro M. M., Moura M. J., Reis A., Costa-Ferreira M. J., (2011), "Microbial proteases application in leather industry", *Journal of Biotechnology*, 131, 211-241.

Lehninger A. L., (2008), "Principles of Biochemistry", 5th Edition, W.H. Freeman and Company.

Li S., He B., Bai Z., Ouyang P., (2009), "A novel organic solvent-stable alkaline protease from organic solvent-tolerant *Bacillus licheniformis* YP1A", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56, 85-88

Li Q., Yi L., Marek P., Iverson B. I., (2013), "Commercial proteases: Present and future", *FEBS Letters*, 587, 1155-1163.

Li X., Li A., Liu C., Yang J., Ma F., Hou N., Xu Y., Ren N., (2012), "Characterization of the extracellular biodemulsifier of *Bacillus mojavensis* XH1 and the enhancement of demulsifying efficiency by optimization of the production medium composition", *Process Biochemistry*, 47, 626-634.

Liu S., Fang Y., Lv M., Wang S., Chen L., (2010), "Optimization of the production of organic solvent-stable protease by *Bacillus sphaericus* DS11 with response surface methodology", *Biosource Technology*, 101, 7924-7929.

Lowry H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., (1951), "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent", *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1), 265-275.

Mabrouk S. S., Hashem A. M., El-Shayeb N. M.A., Ismail A.S., Abdel-Fattah A.F., (1999), "Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415", *Bioresources Technology*, 69, 155-159.

Malathi S., Chakraborty R., (1991), "Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solidsubstrate fermentation conditions for use as a depilation agent", *Applied Environmental Microbiology*, 57, 712-16.

Maruthiah T., Esakkiraj P., Prabakaran G., Palavesam A., Immanuel G., (2013), "Purification and characterization of moderately halophilic alkaline serine protease from marine *Bacillus subtilis* AP-MSU 6", *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2, 116-119.

Maurer K. H., (2004), "Detergent Proteases", *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 330-334.

Moon S. H., Parulekar S. J., (1991), "A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*", *Biotechnology & Bioengineering*, 37, 467-83.

Moorthy I. M., Baskar R., (2013), "Statistical modeling and optimization of alkaline protease production from a newly isolated alkalophilic *Bacillus* species BGS using response surface methodology and genetic algorithm", *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 43, 293-314.

Nadeem M., Qazi J. I., Syed Q., Baig S., (2008), "Optimization of process parameters for alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* N-2 and kinetics studies in batch fermentation", *Turkish Journal of Biology*, 32, 243-251.

Nduwimana J., Guenet L., Dorval I., Blayau M., Le Gal J. Y., Le Treut A., (1995), "Proteases", *Annual Biologie Clinique*, 53, 251-264.

Nilegaonkar S., Zambare P., Kanekar P., Dhakephalkar P., Sarnaik S., (2006), "Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCMB-326", *Bioresource Technology*, 98, 1238-1245.

Oliveira A. N., Oliveira L. A., Andrade J., S., (2010), "Production and some properties of crude alkaline protease of indigenous Central Amazonian *Rhizobia* strains", Brazilian Archives of Biology and Technology, 53, 1185-1195.

Olivera N., Sequeiros C., Sifieriz F., Breccia D., (2006), "Characterization of alkaline proteases from a novel alkali-tolerant bacterium *Bacillus patagoniensis*", World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22, 737-743.

Oskouie S. F., Tabandeh F., Yakhchali B., Eftekhari F., (2008), "Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*", Biochemical Engineering Journal, 39, 37-42.

Panda B. P., Ali M., Javed S., (2007), "Fermentation Process Optimization", Research Journal of Microbiology, 2 (3), 201-208.

Pandey S., Rakholiya K. D., Raval V. H., Singh S. P., (2012), "Catalysis and stability of an alkaline protease from a haloalkalophilic bacterium under non-aqueous conditions as a function of pH, salt and temperature", Journal of Bioscience and Bioengineering, 3, 251-256.

Park J. W., Park J. E., Choi H. K., Jung T. W., Myeong S. M., Lee J. S., (2013), "Purification and characterization of three thermostable alkaline fibrinolytic serine proteases from the polychaete *Cirriiformia tentaculata*", Process Biochemistry, 48, 979-987.

Patel R. K., Dodia M. S., Joshi R. H., Singh S. P., (2006), "Purification and characterization of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.", Process Biochemistry, 41, 2002-2009.

Patel R., Dodia M., Singh S. P., (2005), "Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkalophilic *Bacillus* sp.: Production and optimization", Process Biochemistry, 40, 3569-3575.

Phadataré S. U., Deshpande V. V., Srinivasan M. C., (1993), "High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatibility with commercial detergents", Enzyme Microbial Technology, 15, 72-76.

Pillai P., Mandge S., Archana G., (2011), "Statistical optimization of production and tannery applications of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* P13", Process Biochemistry, 46, 1110-1117.

Polaina J., MacCabe A. P., (2007), "Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications", 1st Edition, Wiley Press Incorporated.

Potumarthi R., Jetty A., (2007), "Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: Effect of aeration and agitation regimes", Biochemical Engineering Journal, 34, 185-192.

Purohit M. K., Singh S. P., (2012), "A metagenomic alkaline protease from saline habitat: Cloning, over-expression and functional attributes", *International Journal of Biological Macromolecules*, 53, 138-143.

Rai S., Mukherjee A. K., (2010), "Statistical optimization of production and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04", *Biochemical Engineering Journal*, 48, 173-180.

Rai S. K., Mukherjee A. K., (2009), "Ecological significance and some biotechnological application of an organic solvent stable alkaline serine protease from *Bacillus subtilis* strain DM-04", *Bioresource Technology*, 100, 2642-2645.

Rao Y. K., Lu S.C., Liu B. L., Tzeng Y. M., (2006) "Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes", *Biochemical Engineering Journal*, 28, 57-66.

Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S., Deshpande V. V., (1998), "Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 597-635.

Reddy L. V. A., Wee Y. J., Yun J. S., Ryu H. W., (2008), "Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches", *Biosource Technology*, 99, 2242-2249.

Saeki K., Ozaki K., Kobayashi T., Ito S., (2007), "Detergent alkaline proteases: Enzymatic properties, genes and crystal structures", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103, 501-508.

Sen S., Satyanarayana T., (1993), "Optimization of alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis* S-40", *Industrial Journal of Microbiology*, 33, 43-47.

Schechler I., Berger A., (1967), "On the size of the active site in proteases I papain", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27, 157-162.

Shankar S., Rao M., Laxman R. S., (2011), "Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp", *Process Biochemistry*, 46, 579-585.

Shivanand P., Jayaraman G., (2009), "Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast", *Process Biochemistry*, 44, 1088-1094.

Shrinivas D., Naik G. R., (2011), "Characterization of alkaline thermostable keratinolytic protease from thermoalkalophilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65, 29-35.

Singh J., Batra N., Sobti R. C., (2001), "Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1", *Process Biochemistry*, 36, 781-785.

Southan C., (2001), "A genomic perspective on human proteases as drug targets", *Drug Discovery Today*, 6, 681-688.

Steele D.B., Fiske M.J., Steele B.P., Kelley V.C., (1992), "Production of a low molecular weight, alkaline active, thermostable protease by a novel spiral-shaped bacterium, *Kurthia spiroforme* sp.", *Enzyme Microbial Technology*, 14, 358-360.

Stryer K., Berg J. M., Tymoczko J. L., (2006), "Biochemistry", 1st Edition, W. H. Freeman and Company.

Suganthi C., Mageswari A., (2013) "Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments", *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 11, 47-52.

Sundararajan S., Kannan C. N., Chittibabu S., (2011), "Alkaline protease from *Bacillus cereus* VITSN04: Potential application as a dehairing agent", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111, 128-133.

Tari C., Genckal H., Tokatli F., (2006), "Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21", *Process Biochemistry*, 41, 659-665.

Takami H., Akiba T., Horikoshi K., (1989), "Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30, 120-124.

Thanapimmetha A., Luadsongkram A., Titapiwatanakun B., Srinophakum P., (2012), "Value added waste of *Jatropha curcas* residue: Optimization of protease production in solid state fermentation by Taguchi DOE methodology", *Industrial Crops and Products*, 37, 1-5.

Tsai Y.C., Juang R.Y., Lin S.F., Chen S.W., Yamasaki M., Tamura G., (1988), "Production and characterization of an alkaline elastase produced by alkalophilic *Bacillus* strain Ya-B", *Applied Environmental Microbiology*, 54, 3156-3161.

Tsuchiya K., Sakashita H., Nakamura Y., Kimura T., (1997), "Production of thermostable alkaline protease by alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682", *Agricultural Biology Chemistry*, 55, 3125-3127.

Uyar F., Porsuk I., Kizil G., Yilmaz E. I., (2011), "Optimal conditions for production of extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* strain CA15", *EurAsian Journal of BioSciences*, 5, 1-9.

Uyar F., Baysal Z., (2004), "Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. under solid state fermentation", *Process Biochemistry*, 39, 1893-1898.

Vermelho A. B., Supuran C. T., Guisan J. M., (2012), “Microbial Enzyme: Applications in Industry and in Bioremediation”, *Enzyme Research*, 2012, 1-2.

Vijayaraghavan P., Lazarus S., Vincent S. G. P., (2013), “De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: Biosynthesis and properties”, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21, 27-34.

Vulfson E.N., Halling P.J., Holland H.K., (2001), “Enzymes in Nonaqueous Solvents: natuerliche und kuenstliche Penicillinamidase-Varianten.”, 1st Edition, TU Hamburg-Harburg.

Waites M. J., Morgan N. L., Rockey J. S., Higton G., (2001), “Industrial Microbiology: An Introduction”, 1st Edition, Blackwell Science Limited.

Wang Q., Hou Y., Xu Z., Miao J., Li G., (2008), “Optimization of cold-active protease production by the psychrophilic bacterium *Colweilla* sp. NF341 with response surface methodology”, *Biosource Technology*, 99, 1926-1931.

Yalemtesfa B., Tesfaye A., Amutha S., (2010), “Solid substrate fermentation and conversion of orange waste into fungal biomass using *Aspergillus niger* KA-06 and *Chaetomium* spp. KC-06”, *African Journal of Microbiology and Research*, 4, 1275-1281.

Yang J., Li J., Mai Z., Tian X., Zhang S., (2013), “Purification, characterization and gene cloning of a cold-adapted thermolysin-like protease from *Halobacillus* sp. SCSIO 20089”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115, 628-632.

Zamost B.L., Brantley Q.I., Elm D.D., Beck C.M., (1990), “Production and characterization of a thermostable protease produced by an asporogenous mutant of *Bacillus stearothermophilus*”, *Journal of Industrial Microbiology*, 5, 303–12.

## ÖZGEÇMİŞ

21.02.1987 İstanbul Şişli doğumlu olan Levent Temel, 2005 yılında İstanbul Şişli Kurtuluş Anadolu Lisesi'nden mezun olmuştur. 2005 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde başladığı lisans eğitimini 2009 yılında tamamlayarak, 2010 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır. 2013 yılından beri özel bir biyoteknoloji firmasında uluslararası satış ve pazarlama sorumlusu olarak çalışmaktadır.