

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZORUNLU ALKALİFİLİK
***Bacillus marmariensis* GMBE 72 SOYUNDAN**
İZOLE EDİLEN ALKALEN PROTEAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU

DOKTORA TEZİ

Y. KİMYAGER Mine Nazan KERİMAK ÖNER

Anabilim Dalı: Kimya

Danışman: Prof. Dr. A. Altan ERARSLAN

KOCAELİ, 2008

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ZORUNLU ALKALİFİLİK *Bacillus marmariensis* GMBE 72
SOYUNDAN İZOLE EDİLEN ALKALEN PROTEAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU**

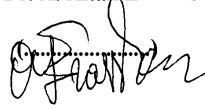
DOKTORA TEZİ
Y. Kimyager Mine Nazan KERİMAK ÖNER

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 31 Aralık 2008

Tezin Savunulduğu Tarih: 17 Nisan 2009

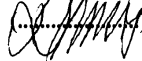
Tez Danışmanı

Prof. Dr. A. Altan ERARSLAN



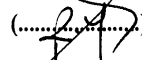
Üye

Prof. Dr. Dilek KAZAN



Üye

Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ



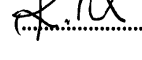
Üye

Prof. Dr. Hikmet AĞIRBAŞ



Üye

Doç .Dr. Kemal BAYSAL



KOCAELİ, 2009

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Endüstriyel enzimlerin büyük bir grubunu proteazlar oluştururlar ve geniş bir kullanım alanına sahip olmaları nedeni ile dünya enzim pazarının %75'inde yer alırlar. Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalardan elde edilebilen proteazlar kendilerine olan talep nedeni ile büyük miktarlarda üretilmektedirler. Biyoteknolojideki gelişmeler ile birlikte üretimlerinin hızlı bir şekilde gerçekleştirilmesi, yönlendirilmiş mutasyonlara kolay ve çabuk cevap vermeleri ve mutant türlerinin vahşi soylarından daha nitelikli enzim üretebilmeleri nedeni ile mikroorganizmalar mükemmel enzim kaynakları olarak tanımlanmışlardır. Bu sebeple endüstride de mikrobiyal proteazlara olan talep artmıştır. . Mikrobiyal proteazlar arasında ise en büyük payı alkalen pH (pH 8-12) ve yüksek sıcaklık aralığında (50-70°C) aktif ve kararlı kalabilen alkalen proteazlar almışlardır. Bu sebeple birçok ülke kendi doğal ekosistemlerini alkalen proteaz üreticisi mikroorganizmalar açısından taramakta ve kendi kültür koleksiyonlarını oluşturmaktadırlar. Protein mühendisliği çalışmaları ile de taranan bu türler tanımlanmakta ve ekstrem koşullara daha dayanıklı türler keşfedilmektedir. Alkalifilik türler içerisinde *Bacillus* genusu bulunduran mikroorganizmalar özellikle proteaz üreticisi olmaları nedeniyle gerek endüstriyel gerekse akademik çalışmalarda önem kazanmışlardır.

TÜBİTAK-MAM-GMBE, Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuvarı tarafından ülkemizdeki yerel ekosistemlerden taranarak izole edilen *Bacillus* cinsi mikroorganizmalardan alkalen proteaz üreticisi olarak tanımlanmış olan alkalifilik *Bacillus marmariensis* GMBE 72 tarafından üretilen alkalen proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışması yeni bir tür olması açısından dünya enzim literatürüne katkıda bulunacak hem de uygulamaya yönelik yapılacak çalışmalar için yol gösterici olacaktır.

Akademik hayatım boyunca danışmanlığımı yapan tez çalışmam süresince beni yönlendiren, destekleyen ve yetişmemde büyük katkısı olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. A. Altan ERARSLAN'a, yine akademik hayatımın başından itibaren bilgi ve desteği ile bana güç veren Sayın Prof. Dr. Dilek KAZAN'a, GMBE 72 izolasyonunu yapan Dr. Aziz Akın DENİZCİ'ye, deneysel çalışmalarımı yaptığım süre boyunca bana her türlü imkanı sağlayan TÜBİTAK-MAM-GMBE'ne, laboratuvar çalışmalarım sırasında manevi desteklerini ve yardımlarını aldığım arkadaşlarım Dr. Dilek COŞKUNER ÖZTÜRK, Nesrin KARAHAN, Nurçin ÇELİK ÖZTÜRK, İlknur MERİÇ, Fatma NOHUT BULUŞ ve canım annem ve babama teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek Lisans ve Doktora çalışmalarım süresince daima benimle olan ve bana inanan sevgili eşim Adnan ÖNER'e ve hayat bağım biricik kızım Zeynep Naz ÖNER'e.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xvi
SİMGELER DİZİNİ ve KISALTMALAR.....	xx
ÖZET.....	xxii
İNGİLİZCE ÖZET.....	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
2. PROTEOLİTİK ENZİMLER (PROTEAZLAR).....	3
2.1. Giriş.....	3
2.2. Enzimatik Katalizde Kullanılan Katalitik Mekanizmalar.....	6
2.2.1. Asit-Baz Katalizi.....	7
2.2.2. Kovalent Kataliz.....	8
2.2.3. Metal İyon Katalizi.....	9
2.2.4. Elektrostatik Kataliz.....	10
2.2.5. Yakınlık ve Düzenlenme Etkisi.....	11
2.3. Proteazlar.....	12
2.3.1. Proteazların sınıflandırılması.....	13
2.3.2. Katalitik mekanizmalarına göre proteazlar.....	16
2.3.2.1. Serin proteazlar.....	16
2.3.2.2. Aspartik (asit) proteazlar.....	25
2.3.2.3. Sistein (sülfidril) proteazlar.....	27
2.3.2.4. Metaloproteazlar.....	30
2.3. Proteazların Fizyolojik İşlevleri.....	36
2.4. Proteaz Kaynakları.....	36
2.5. Üretim.....	43
2.5.1. Alkalifilik mikroorganizmalar.....	43
2.5.2. Alkalen proteaz üretimi.....	44
2.6. Alkalen Proteazların Özellikleri.....	45
2.6.1. Optimum pH ve sıcaklık.....	45
2.6.2. Moleküler ağırlıklar.....	45
2.6.3. Metal iyonu ihtiyacı ve inhibitörler.....	45
2.6.4. Substrat spesifitesi.....	46
2.6.5. Tez çalışmasında kullanılan <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 enziminin özellikleri.....	46
2.7. Proteazların Endüstriyel Uygulamaları.....	46
2.8. Tez Çalışmasında Kullanılan Kinetik ve Termodinamik Bağlıtlar.....	50
2.8.1. K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi için Michaelis-Menten denklemi.....	50
2.8.2. Hidroliz reaksiyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi.....	52
2.8.3. Enzimin termal inaktivasyonu söz konusu olduğunda kinetik bağıtlar.....	53
2.8.4. Enzimin inaktivasyonunun aktivasyon enerjisi ($E_{a,i}$).....	54

2.8.5. Enzimin termal inaktivasyonuna ilişkin termodinamik bağıntılar	55
2.8.6. Substrat hidrolizine ilişkin termodinamik bağıntılar	55
2.8.7. Sıcaklığın K_m üzerine etkisi	57
2.8.8. Enzim aktivasyonu söz konusu olduğunda kullanılan kinetik bağıntılar	60
2.9. Alkalen Proteaz Enziminin Otokatalitik İnaktivasyonu (Otoproteolizi)	64
2.10. Tez Çalışmasında Kullanılan İstatistiksel Hesaplamalar	64
3. MALZEME ve YÖNTEM	66
3.1. Araştırma Araçları	66
3.1.1. Araştırma olanakları (Cihaz vb.)	66
3.1.2. Kimyasallar	66
3.1.3. Mikroorganizma	66
3.1.4. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72'den alkalen proteaz enziminin üretimi	67
3.1.5. Alkalen proteaz aktivitesinin belirlenmesi	68
3.1.5.1. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması	68
3.1.6. Alkalen proteaz çözeltilerinde protein miktarı tayini	69
3.1.6.1. Protein standart grafiğinin hazırlanması	69
3.2. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72'den İzole Edilen Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırılması	70
3.2.1. Alkalen proteaz enziminin kültür üst sıvısından çöktürülmesi için uygun amonyum sülfat doyumluğunun belirlenmesi	70
3.2.2. Alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisi kolonundan elüsyonu	71
3.3. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72'den Saflaştırılan Alkalen Proteaz Enziminin Karakterizasyonu	73
3.3.1. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72'den saflaştırılan serbest alkalen proteaz enziminin moleküler ağırlığının belirlenmesi	73
3.3.1.1. Örneklerin gümüş boyama yöntemi ile boyanması	74
3.3.1.2. Örneklerin Coomassie Brilliant Blue R-250 boyama yöntemi ile boyanması	74
3.3.2. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72'den saflaştırılan serbest alkalen proteaz enziminin optimum sıcaklığının ve sıcaklık kararlılığının belirlenmesi	75
3.3.3. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72'den saflaştırılan serbest alkalen proteaz enziminin optimum pH değerinin ve pH kararlılığının belirlenmesi	76
3.3.4. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72'den saflaştırılan serbest alkalen proteaz enziminin kazein hidrolizinin Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesi	76
3.3.5. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72'den saflaştırılan serbest alkalen proteaz enziminin kazein hidrolizinin kinetik parametrelerinin belirlenmesi	77
3.3.6. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72'den saflaştırılan serbest alkalen proteaz enziminin substrat spesifitesinin belirlenmesi	78
3.3.6.1. Alkalen proteaz enziminin p-nitroanilid (p-NA) konjuge sentetik substratlara karşı spesifitesinin belirlenmesi	78
3.3.6.2. Alkalen proteaz enziminin protein substratlara karşı spesifitesinin belirlenmesi	79
3.3.7. Alkalen proteaz enziminin N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA, N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA hidrolizinin kinetik parametrelerinin belirlenmesi	80

3.3.8. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72'den saflaştırılan serbest alkalen proteaz üzerine aktif bölge yönelimli inhibitörlerin geri dönüşümsüz inhibisyon etkisinin belirlenmesi	81
3.3.9. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72'den saflaştırılan alkalen proteaz enziminin aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisinin belirlenmesi	82
3.3.10. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72'den saflaştırılan serbest alkalen proteaz üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi	83
3.3.11. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72'den saflaştırılan serbest alkalen proteaz üzerine yüzey aktif ajanların etkisinin belirlenmesi.....	83
3.3.11.1. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72'den saflaştırılan alkalen proteazın %2 Tween-20 varlığında termal inaktivasyon kinetiğinin incelenmesi.....	84
3.3.11.2. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 alkalen proteazının % 2 Tween-20 varlığında termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesi.....	85
3.3.11.3. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 alkalen proteazının % 2 Tween-20 varlığında termal inaktivasyonuna ilişkin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi.....	85
3.3.11.4. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 alkalen proteazının % 2 Tween-20 varlığında kazein hidrolizine ilişkin kinetik parametrelerinin belirlenmesi	86
3.3.12. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72'den saflaştırılan serbest alkalen proteaz enzimi üzerine hidrojen peroksit etkisinin incelenmesi	86
3.4. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72'den Saflaştırılan Alkalen Proteaz Enziminin Cu ²⁺ İyonları Yokluğunda ve Varlığında Termal İnaktivasyon Kinetiğinin İncelenmesi	87
3.4.1. Cu ²⁺ içermeyen <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 alkalen proteazının termal inaktivasyon kinetiğinin incelenmesi	87
3.4.2. Cu ²⁺ içermeyen <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 alkalen proteazının termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesi.....	88
3.4.3. Cu ²⁺ içermeyen <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 alkalen proteazının termal inaktivasyonuna ilişkin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi	88
3.4.4. Cu ²⁺ içermeyen <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 alkalen proteazının artan sıcaklık değerlerindeki kazein hidrolizine ilişkin kinetik parametrelerinin belirlenmesi	89
3.4.5. Cu ²⁺ içermeyen <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 alkalen proteazının artan sıcaklık değerlerindeki kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi	89
3.4.6. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 alkalen proteazı üzerinde en yüksek stabilizasyon etkisi gösteren Cu ²⁺ iyonu konsantrasyonunun belirlenmesi...90	
3.4.7. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 alkalen proteazıyla 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında kazein hidrolizinin aktivasyon enerjisinin belirlenmesi.....91	
3.4.8. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 alkalen proteazıyla 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında kazein hidrolizinin kinetik parametrelerinin belirlenmesi	91
3.4.9. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 alkalen proteazının 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında termal inaktivasyon kinetiğinin incelenmesi.....92	
3.4.10. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 alkalen proteazının 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında termal inaktivasyonunun aktivasyon enerjisinin belirlenmesi92	

3.4.11. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 alkalen proteazının 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında termal inaktivasyonuna ilişkin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi	93
3.4.12. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 alkalen proteazının 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında artan sıcaklık değerlerindeki kazein hidrolizine ilişkin kinetik parametrelerinin belirlenmesi	93
3.4.13. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 alkalen proteazının 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında artan sıcaklıklardaki kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi	94
3.4.14. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 alkalen proteazının 4 mM Cu ²⁺ iyonları ile aktivasyonuna ilişkin kinetik parametrelerin belirlenmesi	94
3.4.15. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 alkalen proteazının 4 mM Cu ²⁺ yokluğunda ve varlığında otokatalitik hidrolizinin (otokatalitik inaktivasyonunun ya da otorproteolizinin) incelenmesi	95
3.4.16. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 alkalen proteazının 4 mM Cu ²⁺ iyonları yokluğunda ve varlığında otokatalitik hidrolizinin inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesi	96
3.4.17. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 alkalen proteazının 4 mM Cu ²⁺ iyonları yokluğunda ve varlığında otokatalitik hidrolizinin termal inaktivasyonuna ilişkin termodinamik parametrelerin belirlenmesi	96
4. BULGULAR	98
4.1. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 Soyundan Alkalen Proteaz Enziminin Üretimi	98
4.2. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72'den İzole Edilen Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırılması	99
4.2.1. Alkalen proteaz enziminin kültür üst sıvısından çöktürülmesi için uygun amonyum sülfat doygunluğu	99
4.2.2. Alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisi kolonundan elüsyonu	104
4.3. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 Soyundan Saflaştırılan Alkalen Proteaz Enziminin Karakterizasyonu	113
4.3.1. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin moleküler ağırlığı	113
4.3.2. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin sıcaklık profili	114
4.3.3. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin pH profili	115
4.3.4. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin kazein hidrolizinin Arrhenius aktivasyon enerjisi	115
4.3.5. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin kazein hidrolizinin kinetik parametreleri	116
4.3.6. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin substrat spesifitesi	119
4.3.6.1. Alkalen proteaz enziminin p-nitroanilid (p-NA) konjuge sentetik substratlara karşı spesifisi	119
4.3.6.2. Alkalen proteaz enziminin protein substratlara karşı spesifitesi	120
4.3.7. Alkalen proteaz enziminin N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA, N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA hidrolizinin kinetik parametreleri	121

4.3.8. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi üzerine aktif bölge yönelimli inhibitörlerin geri dönüşsüz inhibisyon etkisi.....	126
4.3.9. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi.....	127
4.3.10. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi üzerine iki değerlikli metal iyonlarının etkisi	128
4.3.11. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi üzerine yüzey aktif ajanların etkisi.....	128
4.3.11.1. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin Tween-20 varlığında termal inaktivasyon kinetiği	129
4.3.11.2. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin % 2 Tween-20 varlığında termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi	131
4.3.11.3. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin % 2 Tween-20 varlığında termal inaktivasyonunun termodinamik parametreleri.....	132
4.3.11.4. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin % 2 Tween-20 varlığında kazein hidrolizinin kinetik parametreleri	132
4.3.12. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi üzerine hidrojen peroksit etkisi	133
4.4. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 Soyundan Saflaştırılan Alkalen Proteaz Enziminin Cu ²⁺ İyonları Yokluğunda ve Varlığında Termal İnaktivasyon Kinetiği.....	135
4.4.1. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyon kinetiği.....	135
4.4.2. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi	137
4.4.3. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonuna ilişkin termodinamik parametreler.....	138
4.4.4. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin artan sıcaklıklardaki kazein hidrolizine ilişkin kinetik parametreleri	138
4.4.5. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin artan sıcaklık değerlerindeki kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametreleri	151
4.4.6. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi üzerinde en yüksek stabilizasyon etkisi gösteren Cu ²⁺ metal iyonu konsantrasyonu	152
4.4.7. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Arrhenius aktivasyon enerjisi.....	153
4.4.8. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan serbest alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında kazein hidrolizinin kinetik parametreleri	154
4.4.9. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında termal inaktivasyon kinetiği	155

4.4.10. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi	157
4.4.11. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında termal inaktivasyonunun termodinamik parametreleri	158
4.4.12. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında artan sıcaklıklardaki kazein hidrolizine ilişkin kinetik parametreleri	158
4.4.13. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında artan sıcaklık değerlerindeki kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametreleri	172
4.5. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 Soyundan Saflaştırılan Alkalen Proteaz Enziminin 4 mM Cu ²⁺ İyonları Tarafından Aktivasyonuna İlişkin Kinetik Parametreler	172
4.6. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 Soyundan Saflaştırılan Alkalen Proteaz Enzimi Üzerine 4 Mm Cu ²⁺ İyonlarının Stabilizasyon Etkisi	177
4.7. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 Soyundan Saflaştırılan Alkalen Proteaz Enziminin Otokatalitik Hidrolizi (Otokatalitik İnaktivasyonu ya da otoproteolizi) Üzerine 4 Mm Cu ²⁺ İyonları İlavesinin Etkisi.....	179
4.8. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 Soyundan Saflaştırılan Alkalen Proteaz Enziminin 4 Mm Cu ²⁺ İyonları Yokluğunda ve Varlığında Artan Sıcaklıklarda Otokatalitik İnaktivasyonunun (Otoproteolizinin) Arrhenius Aktivasyon Enerjisi.....	181
4.9. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 Soyundan Saflaştırılan Alkalen Proteaz Enziminin 4 Mm Cu ²⁺ İyonları Yokluğunda ve Varlığında Artan Sıcaklıklarda Otokatalitik İnaktivasyonunun Termodinamik Parametreleri ..	182
4.10. <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 Soyundan Saflaştırılan Alkalen Proteaz Enziminin Otokatalitik Hidrolizi Üzerine 4 Mm Cu ²⁺ İyonlarının Stabilizasyon Etkisi.....	183
5. TARTIşMA	186
5.1. Alkalen Proteaz Enziminin Üretimi.....	186
5.2. Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırması	186
5.3. Alkalen Proteaz Enzim Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Sıcaklık ve pH'nın Etkisi	188
5.4. Alkalen Proteaz Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi.....	192
5.5. Alkalen Proteaz Enzim Aktivitesi Üzerine Aktif Bölge Yönelimli İnhibitörlerin Etkisi.....	193
5.6. Alkalen Proteaz Enziminin Substrat Spesifitesi	194
5.7. Alkalen Proteaz Enzim Aktivitesi Üzerine Yükseltgeyici Ajan ve Sürfaktanların Etkisi	197
5.8. 4 mM Cu ²⁺ iyonları Varlığında ve Yokluğunda Alkalen Proteaz Enziminin Stabilizasyon Çalışmasına Ait Sonuçların Değerlendirilmesi	199
5.8.1. 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyon kinetiğinin incelenmesi	199
5.8.2. 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteaz enziminin otokatalitik hidrolizinin (otokatalitik inaktivasyonunun ya da otoproteolizinin) incelenmesi	204

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	206
6.1. Sonuçlar	206
6.2. Öneriler	210
KAYNAKLAR	212
EKLER.....	221
ÖZGEÇMİŞ.....	228

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Proteazların hidrolizledikleri amid bağı [6].....	5
Şekil 2.2: Keto-enol tautomerizasyonu. a) Katalizörsüz b) Genel asit katalizli c) Genel baz katalizli	8
Şekil 2.3: Asetoasetatın dekarboksilasyonu. Yukarıdaki reaksiyon katalizörsüz aşağıdaki reaksiyon ise primer amin katalizörlüğünde gerçekleşen reaksiyon mekanizmasıdır.....	9
Şekil 2.4: Dimetiloksalasetatın metal iyonu varlığında dekarboksilasyonu	10
Şekil 2.5: Yakınlık etkisi	11
Şekil 2.6: Düzenlenme etkisi [78].....	11
Şekil 2.7: Proteazların gerçekleştirdikleri hidroliz reaksiyonunun mekanizması.....	12
Şekil 2.8: Katalizden sorumlu Ser ¹⁹⁵ , His ⁵⁷ ve Asp ¹⁰² katalitik üçlüsü [6]	17
Şekil 2.9: Serin proteazların (tripsin, kimotripsin ve elastaz) spesifisiteleri [14].....	19
Şekil 2.10: α -kimotripsin'in üç boyutlu konformasyonel yapısı [16].....	19
Şekil 2.11: Organofosfor bileşiği tarafından enzimin aktif bölgesindeki serin kalıntısı üzerinde gerçekleştirilen tersinmez inaktivasyonun mekanizması	20
Şekil 2.12: Serin proteazların DIP-enzim kompleksi oluşumu ile DIPF tarafından inaktivasyonu	21
Şekil 2.13: tosil-L-fenilalanin klorometil keton (TPCK).....	21
Şekil 2.14: TPCK'nın kimotripsinin His ⁵⁷ residüsü ile tepkimesi.....	22
Şekil 2.15: Klorometil keton bileşiği tarafından enzimin aktif bölgesindeki histidin kalıntısı üzerinde gerçekleştirilen tersinmez inaktivasyonun mekanizması	22
Şekil 2.16: Kimotripsinin aktif bölge kalıntıları [17, 18]	23
Şekil 2.17: Serin proteazlar için önerilen katalitik etki mekanizması	24
Şekil 2.18: HIV-1 proteazının üç boyutlu konformasyonel yapısı [19].....	25
Şekil 2.19: Pepstatin.....	25
Şekil 2.20: HIV-1 proteazının geçiş hali inhibitörü	26
Şekil 2.21: HIV-1 proteazı için önerilen katalitik etki mekanizması.....	27
Şekil 2.22: Papainin üç boyutlu konformasyonel yapı şekli [20]	28
Şekil 2.23: Papain için önerilen katalitik etki mekanizması.....	30
Şekil 2.24: Termolizinin üç boyutlu konformasyonel yapısı [22]	32
Şekil 2.25: Şelat yapıcı ajanlar.....	32
Şekil 2.26: Sodyum siyanoborohidrid'in karboksipeptidaz A'da tutuklanması	33
Şekil 2.27: Karboksipeptidaz-A için önerilen katalitik etki mekanizması	34
Şekil 2.28: Termolizinin fosforamidon tarafından inhibisyonu (Trp, triptofan)	35
Şekil 2.29: Termolizin için önerilen katalitik etki mekanizması	35
Şekil 2.30: v 'ye karşı [S] diyagramı	51
Şekil 2.31: Lineweaver-Burk diyagramının görünüşü.....	51
Şekil 2.32: Farklı sıcaklıklarda ölçülen hız sabitinin (lnk) 1/T'ye karşı işaretlenmesiyle elde edilen E _a aktivasyon enerjisi	52
Şekil 2.33: İnaktivasyon hız sabiti grafiği	54

Şekil 2.34: Enzim katalizli hidroliz reaksiyonunun serbest enerji düzeyi diyagramı.	56
Şekil 2.35: Farklı sıcaklık değerlerindeki K_m 'in belirlenmesi vasıtasıyla reaksiyonun standart entalpi, (ΔH^0), değişimi değerinin belirlendiği grafik.	58
Şekil 2.36: Enzim ile substrattan ES ürününün oluşumuna ilişkin reaksiyonun enerji profili.(E--S) [‡] aktive geçiş halini göstermektedir.	58
Şekil 2.37: ΔH , $E + S \xrightarrow{k_1} ES$ reaksiyonunun değişik sıcaklıklarda hız sabitinin ölçülmesi vasıtasıyla çizilen $\log(k_1 / T)$ ' ye karşı $1 / T$ grafiğinin eğiminden belirlenebilir.	60
Şekil 2.38: Gerçek olmayan aktivatör varlığında v 'ye karşı $[S]$ diyagramı.	63
Şekil 2.39: Gerçek olmayan aktivasyon için Lineweaver-Burk diyagramı.	64
Şekil 4.1: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan alkalen proteaz enziminin üretimi ve hücre büyümesi.	98
Şekil 4.2: pH 6.50'da artan amonyum sülfat doygunluklarındaki alkalen proteaz çöktürmeleri.	103
Şekil 4.3: pH 9.04'de farklı amonyum sülfat doygunluklarındaki alkalen proteaz çöktürmeleri.	103
Şekil 4.4: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz kromatografi kolonundan 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile elüsyonu.	105
Şekil 4.5: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz kromatografi kolonundan 250 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile elüsyonu.	106
Şekil 4.6: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz kromatografi kolonundan 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile elüsyonu.	107
Şekil 4.7: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz kromatografi kolonundan 50 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile elüsyonu.	108
Şekil 4.8: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz kromatografi kolonundan 100 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile elüsyonu.	108
Şekil 4.9: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz kromatografi kolonundan 150 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile elüsyonu.	109
Şekil 4.10: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz kromatografi kolonundan 200 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile elüsyonu.	109
Şekil 4.11: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz kromatografi kolonundan 250 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile elüsyonu.	110

Şekil 4.12: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz kromatografi kolonundan 500 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile elüsyonu	111
Şekil 4.13: Alkale proteaz enziminin %12'lik SDS-jel elektroforezi. 1: Promega Broad Range Protein Molecular Weight Markers (V849A); 2: Kültür üst sıvısı, 3: % 55 amonyum sülfat çöktürmesi, 4: DEAE-selüloz kolon elüatı 5: 2 mM PMSF ile muamele edilmiş DEAE-selüloz kolon elüatı	113
Şekil 4.14: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin sıcaklık stabilitesi ve Ca ²⁺ ve Cu ²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda optimal sıcaklık profili	114
Şekil 4.15: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin pH stabilitesi ve optimal pH profili	115
Şekil 4.16: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan serbest alkale proteaz enziminin kazein hidrolizinin aktivasyon enerjisinin belirlenmesinde kullanılan Arrhenius grafiği (doğru için r = 0.9880'dir)	116
Şekil 4.17: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin başlangıç hızının başlangıç substrat konsantrasyonu değeri ile değişimi	117
Şekil 4.18. Substrat inhibisyonunun inhibisyon sabitinin, (K _s), belirlenmesinde kullanılan 1/v'ye karşı [S] diyagramı (r = 0.9970'dir)	118
Şekil 4.19: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r = 0.9889'dür)	119
Şekil 4.20: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r = 0.9967'dir)	122
Şekil 4.21: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r = 0.9923'dür)	123
Şekil 4.22: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r = 0.9933'dür)	124
Şekil 4.23: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r = 0.9876'dür)	125
Şekil 4.24: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin % 2 Tween-20 varlığında termal inaktivasyon kinetiği (her bir doğrunun r değeri = 0.9927'dir)	130
Şekil 4.25: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin % 2 Tween-20 varlığında termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesinde kullanılan Arrhenius grafiği (r = 0.9998'dir)	131
Şekil 4.26: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin % 2 Tween-20 varlığında Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r = 0.9927'dir)	133

Şekil 4.27: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 30°C'da H ₂ O ₂ varlığında inkübasyonu sonucunda gerçekleşen inaktivasyonu	134
Şekil 4.28: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 40°C'da H ₂ O ₂ varlığında inkübasyonu sonucunda gerçekleşen inaktivasyonu	135
Şekil 4.29: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyon kinetiği (kazein substrat, her bir doğrunun r değeri ? 0.9866'dır)	136
Şekil 4.30: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonunun aktivasyon enerjisinin belirlenmesinde kullanılan Arrhenius grafiği (r = 0.9860'dır)	137
Şekil 4.31: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 30°C'de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ? 0.9991'dir) .	139
Şekil 4.32: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 40°C'de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ? 0.9961'dir) .	140
Şekil 4.33: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 45°C'de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ? 0.9905'dir) .	141
Şekil 4.34: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 50°C'de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ? 0.9961'dir) .	142
Şekil 4.35: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 55°C'de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ? 0.9970'dir) .	143
Şekil 4.36: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 60°C'de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ? 0.9985'dir) .	144
Şekil 4.37: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 62.5°C'de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ? 0.9868'dir) .	145
Şekil 4.38: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 65°C'de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ? 0.9973'dür) .	146
Şekil 4.39: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 67.5°C'de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ? 0.9973'dür) .	147
Şekil 4.40: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 70°C'de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ? 0.9961'dir) .	148
Şekil 4.41: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin farklı sıcaklıklardaki kazein hidrolizi için belirlenmiş kinetik parametrelerinin değişimi	149
Şekil 4.42: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hızlı denge reaksiyonunun standart entalpi, (? H ⁰), değişimi değerinin belirlendiği grafik	150

Şekil 4.43: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin $\log(k/T)$ 'ye karşı $1/T$ diyagramı ($r = 0.9386$ 'dır)	151
Şekil 4.44: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enzimi üzerinde optimum aktivasyon etkisi yaratan metal iyon konsantrasyonunun belirlenmesi.....	153
Şekil 4.45: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında kazein hidrolizinin Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesinde kullanılan Arrhenius grafiği ($r = 0.9971$ 'dir).....	154
Şekil 4.46: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için $r = 0.9660$ 'dır)	155
Şekil 4.47: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında termal inaktivasyon kinetiği (her bir doğrunun r değeri $= 0.9852$ 'dir).....	156
Şekil 4.48: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesinde kullanılan Arrhenius grafiği ($r = 0.9880$ 'dir).....	157
Şekil 4.49: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enzimi tarafından 30°C 'de ve 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri $= 0.9967$ 'dir).....	159
Şekil 4.50: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enzimi tarafından 40°C 'de ve 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri $= 0.9976$ 'dır).....	160
Şekil 4.51: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enzimi tarafından 45°C 'de ve 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri $= 0.9836$ 'dır).....	161
Şekil 4.52: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enzimi tarafından 50°C 'de ve 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri $= 0.9961$ 'dir).....	162
Şekil 4.53: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enzimi tarafından 52.5°C 'de ve 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri $= 0.9961$ 'dir)	163
Şekil 4.54: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enzimi tarafından 55°C 'de ve 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri $= 0.9952$ 'dir).....	164
Şekil 4.55: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enzimi tarafından 57.5°C 'de ve 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri $= 0.9952$ 'dir)	165

Şekil 4.56: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enzimi tarafından 60°C’de ve 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ? 0.9929’ dur).....	166
Şekil 4.57: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enzimi tarafından 62.5°C’de ve 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ? 0.9883’ dür).....	167
Şekil 4.58: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enzimi tarafından 65°C’de ve 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ? 0.9883’ dür).....	168
Şekil 4.59: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında farklı sıcaklıklardaki kazein hidrolizi için belirlenmiş kinetik parametrelerinin değişimi	170
Şekil 4.60: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında 50°C’nin üzerindeki sıcaklıklardaki hızlı denge standart entalpi, (? H ⁰), değişimi değerinin belirlendiği grafik.....	170
Şekil 4.61: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında ? H [‡] değerinin belirlenmesinde kullanılan log (k ₁ / T)’ye karşı 1 / T diyagramı (r = 0.9826’dır)	171
Şekil 4.62: 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkale proteazın 30°C’deki Lineweaver-Burk diyagramı.....	173
Şekil 4.63: 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkale proteazın 40°C’deki Lineweaver-Burk diyagramı.....	173
Şekil 4.64: 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkale proteazın 45°C’deki Lineweaver-Burk diyagramı.....	174
Şekil 4.65: 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkale proteazın 50°C’deki Lineweaver-Burk diyagramı.....	174
Şekil 4.66: 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkale proteazın 55°C’deki Lineweaver-Burk diyagramı.....	175
Şekil 4.67: 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkale proteazın 60°C’deki Lineweaver-Burk diyagramı.....	175
Şekil 4.68: 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkale proteazın 62.5°C’deki Lineweaver-Burk diyagramı	176
Şekil 4.69: 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkale proteazın 65°C’deki Lineweaver-Burk diyagramı.....	176
Şekil 4.70: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enzimi üzerinde 4 mM Cu ²⁺ iyonları tarafından gerçekleştirilen stabilizasyon etkisi	177
Şekil 4.71: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda artan sıcaklık değerlerine karşılık gelen yarılanma ömrü değerleri	178
Şekil 4.72: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda artan sıcaklık değerlerine karşılık gelen inaktivasyon hız sabiti değerleri	179

Şekil 4.73: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72'den saflaştırılan alkale proteaz enziminin artan sıcaklıklardaki otokatalitik hidrolizi (her bir doğrunun r değeri ? 0.9887'dir).....	180
Şekil 4.74: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72'den saflaştırılan alkale proteaz enziminin 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında artan sıcaklıklardaki otokatalitik hidrolizi (her bir doğrunun r değeri ? 0.9824'dür).....	180
Şekil 4.75: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda otokatalitik hidrolizinin termal inaktivasyonunun aktivasyon enerjisinin belirlenmesinde kullanılan Arrhenius grafiği (her bir doğrunun r değeri ? 0.9805'dir).....	182
Şekil 4.76: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enzimi üzerinde 4 mM Cu ²⁺ iyonları tarafından gerçekleştirilen stabilizasyon etkisi	184
Şekil 4.77: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda gerçekleşen otokatalitik hidrolizinin artan sıcaklık değerlerine karşılık gelen yarılanma ömrü değerleri	185
Şekil 4.78: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda gerçekleşen otokatalitik hidrolizinin artan sıcaklık değerlerine karşılık gelen inaktivasyon hız sabiti değerleri.....	185

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1: Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması [1].....	2
Tablo 2.1: Proteolitik enzimlerin değişik kullanım alanları [5].....	3
Tablo 2.2: Değişik endüstriyel alanlarda kullanılan enzimler ve uygulamaları [4].....	4
Tablo 2.3: Endüstriyel öneme sahip bazı mikrobiyal alkalen proteazlar [7]	5
Tablo 2.4: Deterjanlarda kullanılan subtilizin çeşitleri [11]	6
Tablo 2.5: Proteazların sınıflandırılması [3].....	13
Tablo 2.6: Katalitik bölgedeki işlevlerine göre peptidazlar [3]	14
Tablo 2.7: Proteolitik enzimlerin katalitik mekanizmaları göz önüne alınarak yapılan sınıflandırılması [3].....	16
Tablo 2.8: Hayvansal proteazların spesifitesi [3]	38
Tablo 2.9: Alkalen proteaz üreticisi <i>Bacillus</i> türleri [29]	41
Tablo 2.10: Alkalen proteaz üreticisi bazı fungus türleri [29].....	42
Tablo 4.1: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin her bir saflaştırma adımındaki saflaştırma verimi ve saflaştırma katsayısı	99
Tablo 4.2: Fermentasyon üst sıvısında gerçekleştirilen farklı yüzdelerdeki amonyum sülfat çöktürmelerinin toplu sonuçları (pH:9.04), (S.K. saflaştırma katsayısı)	100
Tablo 4.3: Fermentasyon üst sıvısında gerçekleştirilen farklı yüzdelerdeki amonyum sülfat çöktürmelerinin toplu sonuçları (pH: 6.50), (S.K. saflaştırma katsayısı)	101
Tablo 4.4: Fermentasyon üst sıvısında pH: 6.50 ve pH:9.04 gerçekleştirilen farklı yüzdelerdeki amonyum sülfat çöktürmelerinin toplu sonuçları...102	
Tablo 4.5: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin kısmi saflaştırma tablosu, (S.K. saflaştırma katsayısı)... ..	104
Tablo 4.6: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin saflaştırma tablosu, (S.K. saflaştırma katsayısı)	106
Tablo 4.7: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin saflaştırma tablosu.....	112
Tablo 4.8: 30°C ve pH: 10.5’da alkalen proteaz enzimi tarafından gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K_m ve V_m değerleri.....	119
Tablo 4.9: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin oligopeptidil-p-nitroanilid (p-NA) konjuge sentetik substratlarına karşı spesifitesi.....	120
Tablo 4.10: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin protein substratlarına karşı spesifitesi	121
Tablo 4.11: 30°C’da alkalen proteaz enzimi tarafından gerçekleştirilen N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA hidrolizinin K_m ve V_m değerleri	122
Tablo 4.12: 30°C’da alkalen proteaz enzimi tarafından gerçekleştirilen N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA hidrolizinin K_m ve V_m değerleri	123
Tablo 4.13: 30°C’da alkalen proteaz enzimi tarafından gerçekleştirilen N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA hidrolizinin K_m ve V_m değerleri	124

Tablo 4.14: 30°C’da alkalen proteaz enzimi tarafından gerçekleştirilen N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA hidrolizinin K_m ve V_m değerleri.....	125
Tablo 4.15: Alkalen proteaz enziminin sentetik peptid substratlarını hidrolizinin kinetik parametreleri	125
Tablo 4.16: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin aktivitesi üzerine aktif bölge yönelimli inhibitörlerin geri dönüşümsüz inhibisyon etkisi.....	126
Tablo 4.17: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin aktivitesi üzerine EDTA’nın etkisi.....	127
Tablo 4.18: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzim aktivitesi üzerine iki değerlikli metal iyonlarının etkisi.....	128
Tablo 4.19: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzim aktivitesi üzerine yüzey aktif ajanların etkisi, (SDS: Sodyumdodesil sülfat).....	129
Tablo 4.20: % 2 Tween-20 varlığında ve yokluğunda alkalen proteaz enziminin farklı sıcaklık değerlerine karşılık gelen tersinmez termal inaktivasyon hız sabiti, (k_i), yarı ömür, ($t_{1/2}$), ve stabilizasyon faktörü değerleri	130
Tablo 4.21: % 2 Tween-20 varlığında alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonun termodinamik parametreleri	132
Tablo 4.22: 30°C ve pH: 10.5’da ve % 2 Tween-20 varlığında alkalen proteaz enzimi tarafından gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K_m ve V_m değerleri.....	133
Tablo 4.23: Alkalen proteaz enziminin artan sıcaklık değerlerine karşılık gelen tersinmez termal inaktivasyon hız sabiti (k_i) ve yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) değerleri	136
Tablo 4.24: Alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonun termodinamik parametreleri.....	138
Tablo 4.25: Serbest alkalen proteaz enziminin 30°C’de K_m ve V_m değerleri	139
Tablo 4.26: Serbest alkalen proteaz enziminin 40°C’de K_m ve V_m değerleri	140
Tablo 4.27: Serbest alkalen proteaz enziminin 45°C’de K_m ve V_m değerleri	141
Tablo 4.28: Serbest alkalen proteaz enziminin 50°C’de K_m ve V_m değerleri	142
Tablo 4.29: Serbest alkalen proteaz enziminin 55°C’de K_m ve V_m değerleri	143
Tablo 4.30: Serbest alkalen proteaz enziminin 60°C’de K_m ve V_m değerleri	144
Tablo 4.31: Serbest alkalen proteaz enziminin 62.5°C’de K_m ve V_m değerleri.....	145
Tablo 4.32: Serbest alkalen proteaz enziminin 65°C’de K_m ve V_m değerleri	146
Tablo 4.33: Serbest alkalen proteaz enziminin 67.5°C’de K_m ve V_m değerleri.....	147
Tablo 4.34: Serbest alkalen proteaz enziminin 70°C’de K_m ve V_m değerleri	148
Tablo 4.35: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin farklı sıcaklıklardaki kazein hidrolizi için belirlenmiş kinetik parametreleri	149
Tablo 4.36: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin farklı sıcaklıklardaki aktive geçiş hali termodinamik parametreleri	151
Tablo 4.37: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen kazein hidrolizinin termodinamik parametreleri	152
Tablo 4.38: Alkalen proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında 30°C ve pH 10.5’da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K_m ve V_m değerleri	155

Tablo 4.39: 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında alkalen proteaz enziminin artan sıcaklık değerlerine karşılık gelen tersinmez termal inaktivasyon hız sabiti, (k _i) ve yarılanma ömrü, (t _{1/2}) değerleri.....	157
Tablo 4.40: 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonun termodinamik parametreleri	158
Tablo 4.41: Alkalen proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında 30°C ve pH 10.5'da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K _m ve V _m değerleri	159
Tablo 4.42: Alkalen proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında 40°C ve pH 10.5'da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K _m ve V _m değerleri	160
Tablo 4.43: Alkalen proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında 45°C ve pH 10.5'da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K _m ve V _m değerleri	161
Tablo 4.44: Alkalen proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında 50°C ve pH 10.5'da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K _m ve V _m değerleri	162
Tablo 4.45: Alkalen proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında 52.5°C ve pH 10.5'da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K _m ve V _m değerleri	163
Tablo 4.46: Alkalen proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında 55°C ve pH 10.5'da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K _m ve V _m değerleri	164
Tablo 4.47: Alkalen proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında 57.5°C ve pH 10.5'da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K _m ve V _m değerleri	165
Tablo 4.48: Alkalen proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında 60°C ve pH 10.5'da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K _m ve V _m değerleri	166
Tablo 4.49: Alkalen proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında 62.5°C ve pH 10.5'da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K _m ve V _m değerleri	167
Tablo 4.50: Alkalen proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında 65°C ve pH 10.5'da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K _m ve V _m değerleri	168
Tablo 4.51: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında farklı sıcaklıklardaki kazein hidrolizi için belirlenmiş kinetik parametreleri	169
Tablo 4.52: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında farklı sıcaklıklardaki aktive geçiş hali termodinamik parametreleri	171
Tablo 4.53: <i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen kazein hidrolizinin termodinamik parametreleri.....	172
Tablo 4.54: 4 mM Cu ²⁺ metal iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteaz enziminin farklı sıcaklık değerlerine karşılık gelen yarı ömür (t _{1/2}) ve stabilizasyon faktörü değerleri.....	177

Tablo 4.55: 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteaz enziminin artan sıcaklık değerleri için otokatalitik hidrolizinin hız sabiti (k _i), yarılanma ömür (t _{1/2}) değerleri (SE:Serbest enzim).....	181
Tablo 4.56: Alkalen proteaz enziminin otokatalitik hidrolizinin termal inaktivasyonunun termodinamik parametreleri	183
Tablo 4.57: 4 mM Cu ²⁺ iyonları varlığında alkalen proteaz enziminin otokatalitik hidrolizinin termal inaktivasyonunun termodinamik parametreleri.....	183
Tablo 4.58: 4 mM Cu ²⁺ metal iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteaz enziminin farklı sıcaklık değerlerine karşılık gelen yarı ömür (t _{1/2}) ve stabilizasyon faktörü, (SF) değerleri.....	184

SİMGELER DİZİNİ

E_a	: Aktivasyon enerjisi
pH	: Asitlik derecesi
Asp	: Aspartik asit
v	: Başlangıç hızı
k_b	: Boltzman sabiti
dak	: Dakika
R	: Gaz sabiti
gr	: Gram
His	: Histidin
k_i	: İnaktivasyon hız sabiti
kDa	: Kilo Dalton
L	: Litre
Met	: Metiyonin
K_m, V_m, k_{cat}	: Michaels Menten kinetik sabitleri
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
M	: Molar
nm	: Nanometre
h	: Plank sabiti
k	: Reaksiyon hız sabiti
rpm	: Santrifüj rotorunun dakikadaki devir hızı
Ser	: Serin
[S]	: Substrat konsantrasyonu
[E] _t	: Total enzim konsantrasyonu
U	: Ünite
$t_{1/2}$: Yarı ömür süresi

KISALTMALAR

DEAE	: Dietilaminoetil
E	: Enzim
EDTA	: Etilen daimin tetra asetik asit
Hb	: Hemoglobin
PMSF	: Fenilmetilsülfonilflorür
GMBE	: Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
MAM	: Marmara Araştırma Merkezi
SEM	: Ortalamanın standart sapması
p-NA	: p-nitroanilid

BSA : Sığır serum albumini
Spec : Spektrofotometre
S : Substrat
SDS-PAGE : Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
TCA : Trikloro asetik asit
TÜBİTAK : Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu

**ZORUNLU AKALİFİLİK *Bacillus marmariensis* GMBE 72 SOYUNDAN
İZOLE EDİLEN ALKALEN PROTEAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU**

Mine Nazan KERİMAK ÖNER

Anahtar Kelimeler : *Bacillus* sp., Zorunlu Alkalifilik, Alkali Proteaz, Enzim Saflaştırma, Aktif Bölge İnhibitörleri, Substrat Spesifitesi.

Özet : Çalışmada TÜBİTAK-MAM-GMBE, Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuvarı tarafından izole edilen ve yeni bir tür olan *Bacillus marmariensis* GMBE 72 suşundan izole edilen alkale proteaz (AP) enziminin saflaştırılarak karakterizasyonu yapılmıştır. 54 saatlik fermentasyon sonunda kültür ortamı santrifüjlenerek hücreler uzaklaştırılmış, kültür üst sıvısındaki protein % 55 (NH₄)₂SO₄ çöktürmesi ve DEAE-selüloz iyon-değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Tuz ilavesinden önce kültür üst sıvısının pH değeri 6.5'e ayarlanmıştır. Tuz çöktürmesinden elde edilen çökelek 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisine karşı gece boyunca diyaliz edilmiş elde edilen diyalizat DEAE-selüloz anyon değişim kromatografi kolonuna yüklenmiştir. Enzim pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisindeki 0-0.25 mol l⁻¹ NaCl lineer gradienti ile kolondan yıkanmıştır. Proteolitik aktivite piki 0.20 mol l⁻¹ iyonik güçte gözlenmiştir. Saflaştırma verimi % 35 ürün ve saflaştırma katsayısı değeri 17'dir. Enzim SDS-PAGE'de tek bant protein olarak gözlenmiş ve molekül ağırlığı 24.26 kDa olarak tespit edilmiştir. Alkale proteazın; K_m ve V_m değerleri sırasıyla 3.12 mg ml⁻¹ kazein, 1.60 µmol tirozin ml⁻¹dak⁻¹, optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 60°C ve 11.0 olarak tespit edilmiştir. Enzim 2 mM fenilmetilsülfonilflorür (PMSF) tarafından tamamen inhibe edildiği için enzimin serin alkale proteaz olduğu tespit edilmiştir. Peptid nitroanilid ve protein substratlar arasında N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ve süt tozunu en yüksek spesifite ile hidrolizelemiştir. Enzim % 2 Tween-20, 40, 60, 80 varlığında stabilitesini korurken % 0.2 sodyumdodesil sülfat (SDS) ve 5% H₂O₂ varlığında stabilitesini kaybetmiştir. Alkale proteaz aktivitesi üzerine 4 mM Cu²⁺ iyonlarının etkisi incelenmiş 30 ve 60°C sıcaklıklarda Cu²⁺ iyonlarının enzimi aktive ettiği Fe²⁺ iyonunun ise her iki sıcaklık değerinde enzim üzerinde kuvvetli inhibisyon etkisi yarattığı gözlenmiştir.

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ALKALINE
PROTEASE FROM OBLIGATE ALKALIPHILIC**

Bacillus marmariensis GMBE 72

Mine Nazan KERİMAK ÖNER

Keywords: *Bacillus* sp., Obligate alkaliphilic, Alkaline protease, Enzyme purification, Active site inhibitors, Substrate specificity.

Abstract : In this study was carried out purification and characterization of a serine alkaline protease from newly isolated *Bacillus marmariensis* GMBE 72 by TÜBİTAK-MAM-GMBE, Enzyme and Fermentation Technologies Lab. After 54 h cultivation, the culture medium was centrifuged to remove cells. The dissolved proteins in the supernatant were precipitated by the addition of ammonium sulphate to 55% saturation and DEAE-cellulose ion-exchange chromatography. Culture filtrate pH was adjusted to 6.5 before salt addition. The precipitate was collected by centrifugation dialyzed against 50 mM NaOH-glycine buffer, pH 10.5 and then loaded to a DEAE-cellulose anion-exchange column. Alkaline protease (AP) was eluted with linear gradient of 0-0.25 mol l⁻¹ NaCl in the pH 10.5 NaOH-Gly buffer. The peak of proteolytic activity was observed at 0.2 mol l⁻¹ ionic strength. The enzyme was purified 17-fold by DEAE-cellulose chromatography followed by (NH₄)₂SO₄ precipitation with 35% yield. The enzyme was showed single band protein on SDS-PAGE and molecular mass was estimated to be 24.26 kDa. K_m and V_m values of the alkaline protease of the strain GMBE 72 were found to be 3.12 mg ml⁻¹ caseine, 1.60 μmol tyrosine ml⁻¹ min⁻¹ respectively. The optimal temperature and pH for the proteolytic activity were 60°C and 11.0 respectively. Enzyme activity was completely inhibited by 2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), suggesting that the enzyme is a serine protease. Among the peptide nitroanilides and protein substrates examined, AP efficiently hydrolysed N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA and skim milk respectively. Enzyme was stable in the presence of the 2 % concentration of Tween-20, 40, 60, 80 however it was not stable in the presence of 5% H₂O₂ and 0.2 % sodiumdodecyl sulphate (SDS). AP activity was increased and stabilized by Cu²⁺ divalent metal ions at 30-60°C. Enzyme was strongly inhibited by Fe²⁺ ions in the same conditions Cu²⁺ metal ions.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Enzimler biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesini sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Biyolojik rolleri ilk olarak Eduard Buchner ve Emil Fischer tarafından tespit edilmiştir. Bazı proteinlerin reaktantları ürüne çevirme kabiliyetinin olduğu gözlenmiş ayrıca analogları kimyasal katalizörler gibi tepkime hızını arttırmışlar fakat tepkimede ürünler ile reaktantlar arasında oluşan dengeye etki etmemişlerdir. Bu özellikleri sebebiyle diğer proteinlerden ayrılmışlar ve bu moleküller biyolojik katalizörler yani enzimler olarak isimlendirilmişlerdir [1].

Enzimler yüksek katalitik aktivite göstermeleri, yüksek derecede substrat spesifitesine sahip olmaları, büyük miktarlarda üretilebilmeleri ve ekonomik değere sahip olmaları açısından geleneksel kimyasal katalizörlerden üstün avantajlara sahiptirler. Enzimlerin yapı ve fonksiyonlarını kataliz mekanizmalarını ve enzimlerin katalizlediği her türlü metabolik ve biyokimyasal reaksiyonların neden ve nasıl gerçekleştiğini inceleyen enzimolojinin başlangıcı 19. yy'dan daha önceki tarihlere dayanmaktadır. Fakat bu alandaki önemli bilimsel gelişmeler son 40 yılda gerçekleşmiş pepsin, polifenol oksidaz, peroksidaz ve invertaz gibi enzimler 19.yy'ın ortalarında diğer enzimler ise 19. yy'ın sonlarına doğru saflaştırılmışlardır.

Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç bütün enzimler proteindirler. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü düzenler ve çoğu kez hücre dışında da etkinliklerini korurlar. Katalitik aktiviteleri doğal protein konformasyonunun sağlamlığına bağlıdır. Eğer enzim denatüre olursa ya da alt birimlerine ayrılırsa katalitik aktivitesi genellikle kaybolur. Bu sebeple enzim moleküllerinin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısı katalitik aktivite için esastır.

Enzimler salgılanma şekillerine göre hücre içi enzimler ve hücre dışı enzimler olmak üzere 2 ana sınıfa ayrılırlar. Hücre içi enzimler sitoplazmaya dağılmış olarak bulunan

ribozomlarda sentezlenirler. Genelde bu enzimlerin substratları şekerler, aminoasitler, karboksilik asit gibi küçük molekül ağırlığına sahip hücre zarından geçebilme yeteneği olan moleküllerdir. Hücre dışı enzimler besiyeri ve hücre duvarının dışı ile bağlantı halinde olan enzimler olarak tanımlanırlar. *Escherichia coli* gibi Gram-negatif bakterilerde proteinler iç ve dış membran arasındaki periplazmik boşluk arasında kalırlar. Çünkü Gram-negatif bakteri duvarları Gram-pozitif bakterilerde bulunmayan bir dış membrana sahiptir. Bu yüzden Gram pozitif bakterilerde bazı enzimler doğrudan besiyerine salgılanır. Çoğu değişken hücre içi enzimlerin aksine hücre dışı enzimlerin stabilitesi yüksek olup çevre koşullarında aktivitelerini uzun süre koruyabilirler [2].

Enzimler Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından katalizledikleri reaksiyon tipleri temel alınarak altı ana sınıfa ayrılmışlardır (Tablo 1.1) [1].

Tablo 1.1: Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması [1]

No	Sınıf	Katalizlenen tepkime tipi
1	Oksidoredüktazlar	Elektronların transferi (hidrit iyonları ve H atomları ile birlikte)
2	Transferazlar	Grup-transfer tepkimeleri
3	Hidrolazlar	Hidroliz tepkimeleri (işlevsel grupların suya transferi)
4	Liyazlar	Çift bağlara grupların ilavesi ve grupların yer değiştirmesiyle çift bağların oluşması
5	İzomerazlar	İzomerik formları oluşturmak üzere moleküller içinde grupların transferi
6	Ligazlar	ATP'nin harcanmasıyla eşleşmiş kondensasyon tepkimeleriyle C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşması

Endüstriyel öneme sahip olmaları nedeni ile enzimler yani biyolojik katalizörler günümüzde pek çok ticari prosesde kullanılmaktadırlar. Ticari olarak kullanılmakta olan enzimlere örnek olarak peynir üretiminde peynir mayası olarak kullanılan renin, biracılıkta kullanılan papain, tekstil ve gıda endüstrisinde kullanılan amilaz, gıda endüstrisinde kullanılan invertaz ve pektinaz ile farmasötik endüstride kullanılan penisilin asilaz örnek verilebilir [3].

BÖLÜM 2. PROTEOLİTİK ENZİMLER (PROTEAZLAR)

2.1. Giriş

Endüstriyel uygulaması olan ticari enzimlerin en önemli ve en büyük sınıfını proteolitik enzimler oluşturmaktadırlar. Dünya enzim pazarının % 50'sinde proteinleri parçalayan proteolitik enzimler yer almaktadır. Bu sınıfta yer alan enzimler uzun süredir gıda, deterjan ve deri sanayinde kullanılmakla birlikte ilaç sektöründe de teröpatik ajanlar olarak kullanılmaya başlanmışlardır. Proteolitik enzimlerin değişik endüstriyel kullanım alanları tablo 2.1'de verilmiştir [5].

Tablo 2.1: Proteolitik enzimlerin değişik kullanım alanları [5]

Endüstri	Kullanım
Meşrubat	Arpa proteinlerinin çözünürleştirilmesi, biranın stabilizasyonu
Deterjan	Çamaşırlardaki protein lekelerinin katalitik olarak parçalanması
Ekmekçilik/Şekerleme	Gluten elastisitesinin modifikasyonu
Peynir üretimi	Kazeinin çöktürülmesi, sütün kestirilmesi, peynirin mayalanması olgunlaştırılması
Dericilik	Deri yumuşatma banyosunda posttan tüyün giderilmesi
Et işlenmesi	Etin yumuşatılması

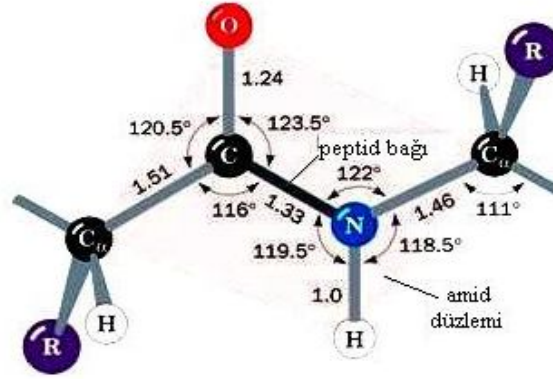
Günümüzde gelişen modern biyoteknoloji ile birlikte antik çağlardan beri doğal ortamlarında bulunan ve ham şekilleri ile kullanılan enzimler biyoteknolojinin imkanları kullanılarak geliştirilmiş ve deri, tekstil, deterjan, gıda gibi endüstriyel alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Geçtiğimiz yüzyılda fermentasyon prosesinin geliştirilmesi ile birlikte sektörde spesifik suş seçimi yapılarak sektöre uygun enzim üretimi yapılmış ardından da endüstriyel boyutta üretilen enzimlerin saflaştırılması ve karakterizasyonları mümkün olmuştur. Böylece üretime özgü ve çok iyi tanımlanmış enzim preparatları sanayide başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Değişik endüstriyel alanlarda kullanılan enzimler ve uygulamaları tablo 2.2'de verilmiştir [4].

Tablo 2.2: Değişik endüstriyel alanlarda kullanılan enzimler ve uygulamaları [4]

Endüstri	Enzim sınıfı	Uygulama
Deterjan (çamaşır ve bulaşık)	Proteaz	Protein lekelerinin giderilmesi
	Amilaz	Nişasta lekelerinin giderilmesi
	Lipaz	Yağ lekelerinin giderilmesi
	Selüloz	Temizleme, renk aydınlatılması, anti-redeposition (pamuk)
	Mannanaz	Mannan lekelerinin giderilmesi (görünmeyen lekeler)
Nişasta ve Yakıt	Amilaz	Niştastanın sıvılaştırılması ve şekerleştirilmesi
	Amiloglukozidaz	Şekerleştirme
	Pullulanaz	Şekerleştirme
	Glukoz izomeraz	Glukozun fruktoza dönüşümü
	Siklodekstrin-glikoziltransferaz	Siklodekstrin üretimi
	Ksilanaz	Viskozitenin düşürülmesi (yakıt ve nişasta)
Gıda	Proteaz	Sütün çöktürülmesi, yenidoğan formülasyonları, aroma
	Lipaz	Peynir aroması
	Laktaz	Sütten laktozun giderilmesi
	Pektin metil esteraz	Meyve tabanlı ürünlerin jöleleştirilmesi
	Pektinaz	Meyve-tabanlı ürünler
	Transglutaminaz	Visko-elastik özelliklerin modifikasyonu
	Proteaz	Proteaz
Fırıncılık	Amilaz	Ekmeğin yumuşatılması ve kabartılması, un ayarlanması
	Ksilanaz	Hamurun şartlandırılması
	Lipaz	Hamur kararlılığı ve şartlandırılması (in situ emulsifier)
	Fosfolipaz	Hamur kararlılığı ve şartlandırılması (in situ emulsifier)
	Glukoz oksidaz	Hamurun güçlendirilmesi
	Lipoksijenaz	Hamurun güçlendirilmesi, ekmeğin beyazlatılması
	Proteaz	Bisküvi ve kurabiye
	Transglutaminaz	Lamine edilmiş güçlendirilmiş hamur
Hayvan Yemi	Fitaz	Fitat sindirilebilirlik-fosfor ayrılması
	Ksilanaz	Sindirilebilirlik
	β -Glukanaz	Sindirilebilirlik
Meşrubat	Pektinaz	Pektin giderilmesi, lapalaştırma
	Amilaz	Meyve suyu muamelesi, düşük kalorili bira
	β -Glukanaz	Lapalaştırma
	Asetolaktat dekarboksilaz	Biranın olgunlaştırılması
	Lakkaz	Berraklaştırma (meyve suyu), aroma (bira)
Tekstil	Selüloz	Denim sonlandırma, pamuk yumuşatma
	Amilaz	Haşıl giderme
	Pektat liyaz	Kir giderme
	Katalaz	Beyazlatma
	Lakkaz	Beyazlatma
	Peroksidaz	Boya fazlasının giderilmesi
Kağıt	Lipaz	Pitch kontrol, kirlilik kontrol
	Proteaz	Biyofilm giderilmesi
	Amilaz	Nişasta kaplanması, mürekkep giderilmesi
	Ksilanaz	Beyazlatma
Yağ ve Petrol	Selüloz	Mürekkep giderilmesi, gider iyileştirilmesi, fiber modifikasyonu
	Lipaz	Transesterifikasyon
Organik Sentez	Fosfolipaz	Lizo-lesitin üretimi
	Lipaz	Kiral alkol ve amidlerin ayrılması
	Açılaz	Yarı sentetik penisilinlerin sentezi
Deri	Nitrilaz	Enantiyopure karboksilik asitlerin sentezi
	Proteaz	Tüy giderilmesi, banyo
Kişisel Bakım	Lipaz	De-pickling
	Amiloglukozidaz	Antimikrobiyal (glukoz oksidaz ile birleştirilir)
	Glukoz oksidaz	Beyazlatma, antimikrobiyal
	Peroksidaz	Antimikrobiyal

Proteazlar veya proteinazlar olarak da bilinen peptidazlar proteinlerin polipeptid yapısı içinde bulunan amid bağlarını hidrolizlerler (Şekil 2.1). Tüm hayvanların sindirim sistemlerinde protein içerikli besinlerin parçalanması gibi çok önemli bir göreve sahiptirler ve büyük miktarlarda mide ve pankreas tarafından üretilirler. Diğer

proteazlar içinde bakteri maya ve bitkilerin de bulunduğu geniş bir yelpazeden elde edilebilirler [6].



Şekil 2.1: Proteazların hidrolizledikleri amid bağı [6]

Endüstriyel öneme sahip enzimlerin en önemli gruplarından birini de mikrobiyal proteazlar oluştururlar (Tablo 2.3). *Bacillus* cinsi mikroorganizmalardan elde edilen proteolitik enzimler ticari enzimler arasında en önemli grubu oluşturmaktadırlar [7].

Tablo 2.3: Endüstriyel öneme sahip bazı mikrobiyal alkalin proteazlar [7]

Üreten Mikroorganizma	Kökene	Optimum pH/stabilite	Endüstriyel Uygulamaları
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Bakteri	9.5	Deterjanlar ve çamaşır tozları
<i>Tritirachium album</i> (Proteinaz T)	Fungal	9.0-12.0	Çamaşır deterjanları formülasyonları
<i>Tritirachium album</i> (Proteinaz R)	Fungal	7.0-10.0	Çamaşır deterjanları formülasyonları
<i>Conidiobolus coronatus</i> (alkali proteinaz B)	Fungal	9.7	D,L fenilalanin ve glisin rasemik karışımlarının ayrılmasında
<i>Bacillus licheniformis</i> (alkalaz)	Bakteri	8.2	N-ucu korunmuş amino asitlerin katalizi
<i>Conidiobolus coronatus</i> (NCI 86.8.20)	Fungal	8.5	Ticari deterjanlar
<i>Bacillus firmus</i>	Bakteri	8.0	Deterjan endüstrisi
<i>Bacillus licheniformis</i> (alkalaz)	Bakteri	8.2	Biyolojik aktif peptidlerin sentezi
<i>Bacillus subtilis</i>	Bakteri	8.5	Deri endüstrisinde banyo ajanları

Mikrobiyal proteazlar arasında en büyük payı alkali pH (pH 8-12) ve yüksek sıcaklık değerleri aralığında (50-70°C) aktif olan ve stabil kalabilen alkalin proteazlar alır. Alkalin proteazlar deterjanlarda protein içeren kan, süt, ter, çimen vb. lekelerin temizlenmesi için deterjan katkı maddesi olarak kullanılmaktadırlar [8].

Deterjan endüstrisinde proteaz kullanımı fikri 1913’de Roehm tarafından pankreatik ekstraktların kullanılmasıyla başlamıştır. 1960’larda bakterilerden üretilen enzimlerin daha ekonomik olması nedeni ile bakteriyel enzimler endüstride kullanılmaya başlamıştır. Endüstriyel alanda kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması istenmeyen yan ürün oluşturmamaları daha stabil ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleridir [9]. Proteaz enziminin *Bacillus* cinsine ait alkalifilik mikroorganizmalar tarafından bol miktarda üretilmesi nedeniyle alkalifilik *Bacillus* soyları hem endüstriyel uygulamalar hem de akademik çalışmalar açısından önemlidirler [10]. *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Bacillus licheniformis* ile başlayan *Bacillus* türlerinden elde edilen alkalin proteazlar subtilizinler için öncü moleküller olarak gösterilmiştir. Günümüzde dünya çapında 15’e yakın farklı enzim molekülü deterjanlarda kullanılmaktadır. Deterjanlarda kullanılan subtilizin çeşitleri tablo 2.4’de verilmiştir [11].

Tablo 2.4: Deterjanlarda kullanılan subtilizin çeşitleri [11]

Ticari Marka	Üretici	Orijin	WT/ PE ^c	Üretim türü	Sinonimi
Alcalase [®]	Novozymes	<i>B. licheniformis</i>	WT	<i>B. licheniformis</i>	Subtilisin Carlsberg
FNA ^a	Genencor	<i>B. amyloliquefaciens</i>	PE	<i>B. subtilis</i>	
Savinase [®]	Novozymes	<i>B. clausii</i>	WT	<i>B. clausii</i>	Subtilisin 309
Purafect [™]	Genencor	<i>B. lentus</i>	WT	<i>B. subtilis</i>	
KAP ^b	Kao	<i>B. alkalophilus</i>	WT	<i>B. alkalophilus</i>	
Everlase [™]	Novozymes	<i>B. clausii</i>	PE	<i>B. clausii</i>	
Purafect OxP [™]	Genencor	<i>B. lentus</i>	PE	<i>B. subtilis</i>	
FN4 ^a	Genencor	<i>B. lentus</i>	PE	<i>B. subtilis</i>	
BLAP S ^b	Henkel	<i>B. lentus</i>	PE	<i>B. licheniformis</i>	
BLAP X ^b	Henkel	<i>B. lentus</i>	PE	<i>B. licheniformis</i>	
Esperase [®]	Novozymes	<i>B. halodurans</i>	WT	<i>B. halodurans</i>	Subtilisin 147
Kannase [™]	Novozymes	<i>B. calusii</i>	PE	<i>B. calusii</i>	
Properase [™]	Genencor	<i>B. alkalophilus PB92</i>	PE	<i>B. alkalophilus</i>	

^a Spesifik müşteriler için özel moleküller, ^b Tutuklanmış kullanım için özel moleküller, ^c PE, protein mühendisliği, WT,yabani tip

2.2. Enzimatik Katalizde Kullanılan Katalitik Mekanizmalar

Katalizörler reaksiyonun aktivasyon enerjisi bariyerini düşürüp reaksiyonu hızlandırır. Reaksiyonun hızı aktivasyonun serbest enerjisinin fonksiyonudur. Katalizör bu kinetik bariyeri düşürür ve katalizlenmemiş reaksiyonla

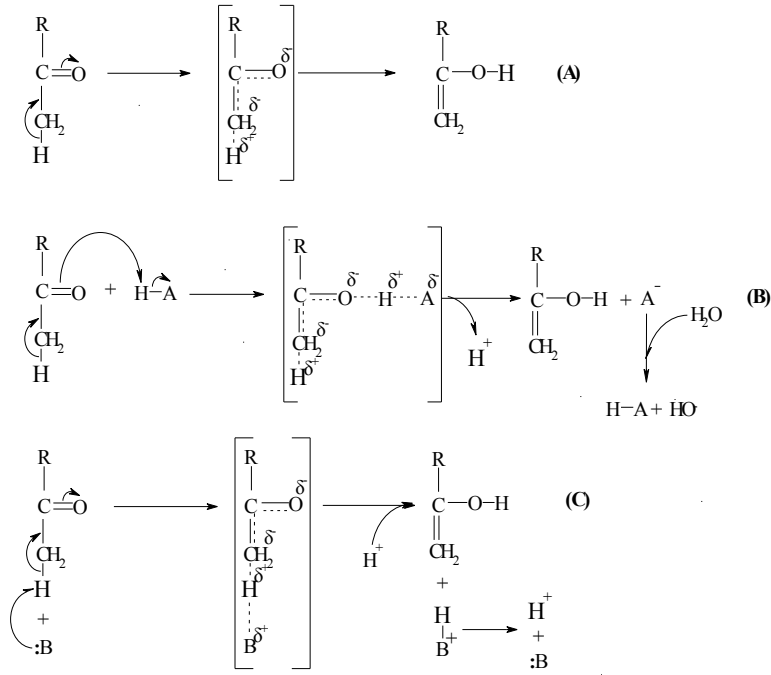
karşılaştırıldığında katalizörlü reaksiyondaki geçiş halinin kararlılığını artırır. Kimyasal katalizörler ile karşılaştırıldığında enzimatik katalizörler daha güçlü olmalarını substratlarına karşı olan spesifitelerine ve enzim-substrat komplekslerindeki enzim ve substrat molekülünün fonksiyonel gruplarının optimum şekilde gerçekleşen düzenlenmelerine borçludurlar.

Enzimatik reaksiyonlarda katalizde kullanılan katalitik mekanizmalar; asit-baz katalizi, kovalent kataliz, metal iyon katalizi, elektrostatik kataliz ve de yakınlık ve düzenlenme etkisi olmak üzere beş ana başlık altında toplanır.

2.2.1. Asit-baz katalizi

Genel asit katalizinde proton vericisi türde reaktanttan (Brønsted asidi) kısmi proton transferi ile reaksiyonun geçiş halinin serbest enerjisi düşürülür. Örneğin katalizlenmemiş keto-enol tautomerizasyonu reaksiyonu çok yavaş gerçekleşir ve reaksiyonda yüksek enerjili karbanyon benzeri geçiş hali oluşur (Şekil 2.2A). Oksijen atomuna proton transferi ile geçiş halinin karbanyon karakteri indirgenir ve reaksiyon sonlanır. Reaksiyon genel baz katalizi ile gerçekleştirilirse proton alıcısı (Brønsted bazı) tür reaktanttan bir proton alarak reaksiyonu gerçekleştirir ve reaksiyon hızı yükselir (Şekil 2.2C).

Enzim katalizli reaksiyonlarda asit-baz katalizi birbirine eşlik eder. Enzim moleküllerinin aktif bölgelerinde yer alan ve proton alıcısı veya proton sağlayıcısı olarak görev yapan fonksiyonel grupları bulunduran amino asit kalıntıları vardır (Arg, Asp, Cys, Glu, His, Lys, Tyr). Enzim katalizli reaksiyonlarda kullanılan asit-baz katalizi serin proteazların katalitik mekanizmaları bölümünde detaylı bir şekilde açıklanacaktır.



Şekil 2.2: Keto-enol tautomerizasyonu. A) Katalizörsüz B) Genel asit katalizli C) Genel baz katalizli

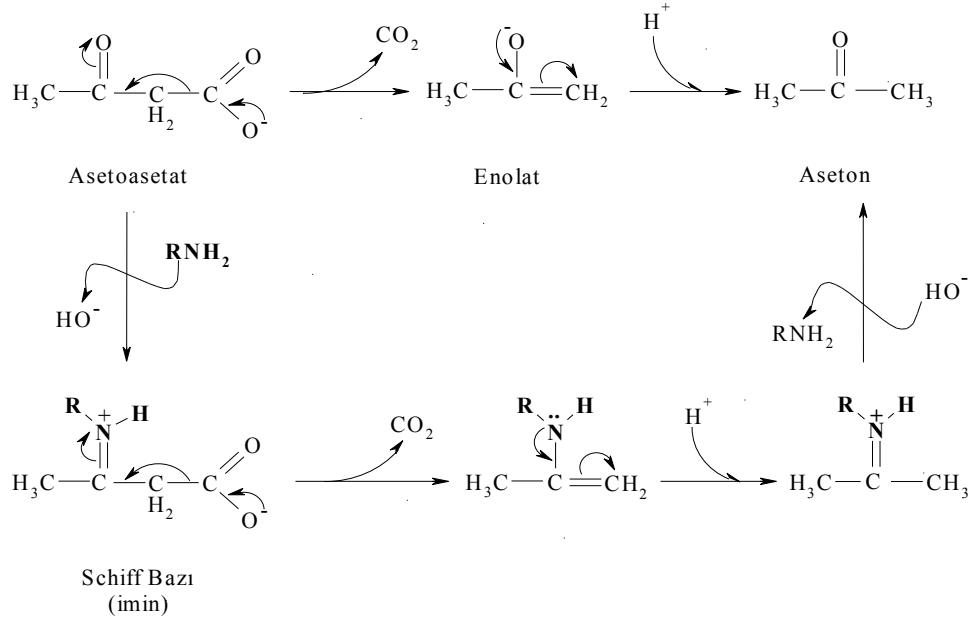
2.2.2. Kovalent kataliz

Kovalent kataliz nükleofilik ve elektrofilik adımların her ikisini birden bulundurur ve üç adımda gerçekleşir.

1. Katalizör ve substratı arasında nükleofilik reaksiyon gerçekleşir ve kovalent bağ oluşur,
2. Elektrofilik katalizör elektronları reaksiyon merkezinden çeker,
3. Katalizörün ayrılması ile reaksiyon birinci basamağa tekrar geri döner.

Kovalent katalizde enzim ile substratı arasında geçici kovalent bağ oluşur. Protein moleküllerindeki amino asit yan zincirleri ve koenzimler kovalent katalize eşlik ederler. Enzim ve substratı arasında oluşan bu geçici kovalent bağ nedeni ile enzimatik reaksiyonların ara ürünleri enzim-substrat kompleksleri şeklinde bu basamakta izole edilebilirler. Kovalent katalize örnek olarak asetoasetatın enzimatik dekarboksilasyonu verilebilir. Enzimdeki lizin kalıntısının ε-amino grubu ile asetoasetat arasındaki kovalent bağ oluşumu ile Schiff bazı oluşur. Oluşan bu kovalent ara üründeki imin bağının amin bağına NaBH_4 varlığında indirgenmesi ile

enzimin dönüşümsüz inhibisyonu gerçekleşir ve reaksiyonda oluşan bu kovalent bağlı ara ürün reaksiyondan izole edilebilir (Şekil 2.3). Enzim molekülünde bulunan ve kovalent katalize katılan fonksiyonel gruplar arasında histidin imidazol halkası, sistenin tiyol grubu, aspartik asitin karboksil grubu ve serinin hidroksil grubu sayılabilir. İlave olarak, tiamin pirofosfat ve pridoksal fosfat gibi koenzimlerde apoenzimleri ile birlikte kovalent katalize katılan koenzimler arasında sayılabilirler.



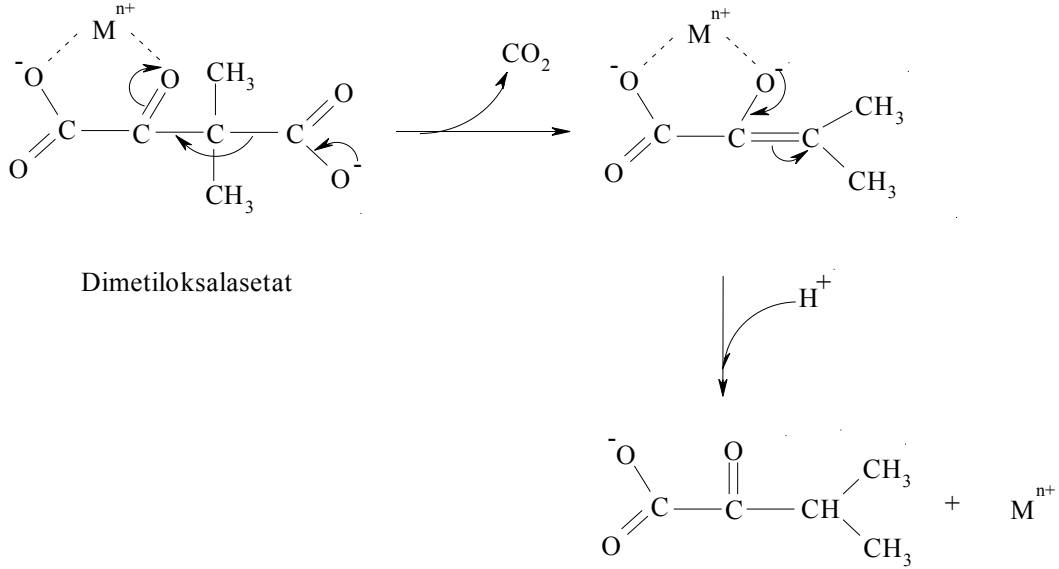
Şekil 2.3: Asetoasetatın dekarboksilasyonu. Yukarıdaki reaksiyon katalizörsüz aşağıdaki reaksiyon ise primer amin katalizörlüğünde gerçekleşen reaksiyon mekanizmasıdır

2.2.3. Metal iyon katalizi

Bilinen tüm enzimlerin üçte biri katalitik aktivitelerini gösterebilmek için metal iyonu varlığına ihtiyaç duyarlar. Metal iyonu gereksinimi gösteren enzimler metaloenzimler ve metal-aktive enzimler olmak üzere iki sınıfa ayrılabilirler. Metal iyonu katalitik prosese üç temel yolla katılabilir; 1) Substrata bağlanabilir ve reaksiyon için substratın yeniden düzenlenmesi sağlanır, 2) Yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarında arabuluculuk görevi üstlenebilir, 3) Elektrostatik kararlılığı veya negatif yüklerin kaymasını sağlayabilir.

Metal iyonları katalizde yük stabilizasyonunu sağlarlar: Metal iyonları bazı metal iyon katalizli reaksiyonlarda proton gibi davranarak bir Lewis asidi gibi negatif yük

nötralizasyonunu sağlarlar ve protondan daha etkili bir kataliz görevi gerçekleştirirler; çünkü nötral pH değerlerinde ortamda daha yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar ve sahip oldukları yükün +1'den daha büyük olması nedeni ile bu iyonlar süper asitler olarak da isimlendirilebilirler. Örnek olarak dimetiloksalasetatın metal iyonu varlığında dekarboksilasyonu verilebilir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Dimetiloksalasetatın metal iyonu varlığında dekarboksilasyonu

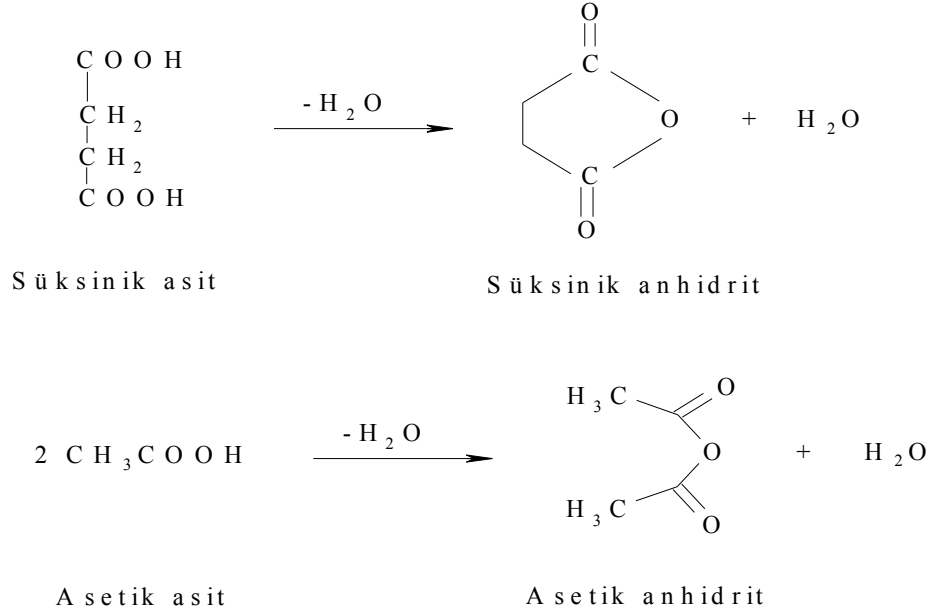
Bu reaksiyonda metal iyonu dimetiloksalasetat ile şelat oluşturarak geçiş halinde oluşan enolat iyonunun elektrostatik olarak stabilizasyonunu sağlamıştır.

2.2.4. Elektrostatik kataliz

Substrat enzim molekülünün aktif bölgesine bağlandığında bu cepte yerleşmiş olan yüklü gruplar substrat üzerindeki hidrofobik yan zincirler ile yeniden düzenlenmeye uğrarlar. Elektrostatik katalizin amacı reaksiyonda oluşan geçiş halinde enzimin aktif bölgesindeki yüklü grupların dağılımını düzenleyerek geçiş hali stabilizasyonu sağlamaktır. Bu amaç düşünüldüğünde yukarıda anlatılan metal iyon katalizi de elektrostatik kataliz içinde değerlendirilebilir.

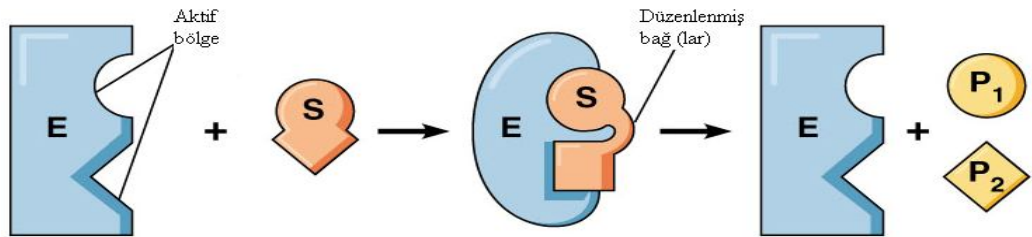
2.2.5. Yakınlık ve düzenlenme etkisi

Yakınlık etkisine süksinik anhidrit ve asetik anhidrit oluşumu örnek verilebilir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Yakınlık etkisi

Süksinik anhidrit oluşumu intramoleküler asetik anhidrit oluşumu ise intermoleküler bir reaksiyondur. İntramoleküler reaksiyonlar intermoleküler reaksiyonlardan daha kolay gerçekleşirler. Substrat ve enzim arasındaki katalitik reaksiyonda kritik adım enzimin substratı ile bağlanmasıdır. ES kompleksinin oluştuğu bu basamakta enzim ve substrat molekülleri birbirlerine çok yakındırlar bu sebeple reaksiyon intramoleküler reaksiyonlar da olduğu gibi hızlı bir biçimde gerçekleşir (Şekil 2.5). Düzenlenme etkisine örnek olarak da hegzokinaz enziminin glukoz varlığında ve yokluğunda tercih ettiği substrat örnek olarak verilebilir (Şekil 2.6).

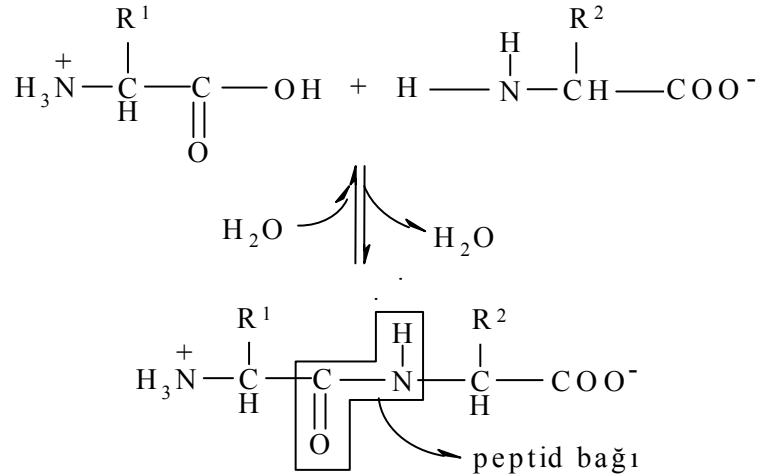


Şekil 2.6: Düzenlenme etkisi [78]

Enzim molekülünün substratı glukozdur. Ortamda glukoz varken enzim glukozu substrat olarak kullanıp glukozu glukoz-6-fosfata fosfatlar. Enzim molekülünün aktif bölge mimarisi glukoz substratına uygunluk gösterir. Bununla birlikte ortamda substrat olan glukoz yokken enzim aktif bölge mimarisinde yeniden düzenlenmeler oluşturarak glukoz analogu olan bir başka substratı hidrolizlemek işlevini gerçekleştirir (Şekil 2.6).

2.3. Proteazlar

Proteazlar veya proteinazlar olarak da bilinen peptidazlar proteinlerin polipeptid yapısı içinde bulunan amid bağlarını hidrolizlerler. Proteazların gerçekleştirdikleri hidroliz reaksiyonunun mekanizması şekil 2.7’de verilmiştir.



Şekil 2.7: Proteazların gerçekleştirdikleri hidroliz reaksiyonunun mekanizması

Tüm hayvanların sindirim sistemlerinde protein içerikli besinlerin hidrolizlenmesi gibi çok önemli bir göreve sahiptirler ve büyük miktarlarda mide ve pankreas tarafından üretilirler. Diğer proteazlar da içinde bakteri, maya ve bitkilerin de bulunduğu geniş bir yelpazeden elde edilebilirler [6]. Proteazlar sınıf 3 (hidrolazlar) ve alt sınıf 3.4 (peptidazlar ya da peptid hidrolazlar) enzimleridirler. Proteazlar endopeptidazlar ya da proteinazlar ve ekzopeptidazlar olarak ayrılan geniş bir aileyi oluştururlar. Bu enzimler doğada bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilebilirler [12].

2.3.1. Proteazların sınıflandırılması

Proteazlar hidrolazlar sınıfında yer alan enzimler olup 4 alt gruba ayrılırlar. Bununla birlikte sahip oldukları geniş etki ve yapı çeşitlilikleri dolayısıyla da enzimlerin sınıflandırıldığı genel sistem ile sınıflandırılmaları da güçtür. Buna göre; proteazlar kaynağına, aktif bölgedeki fonksiyonel gruplarına ve katalitik bölgedeki işlevlerine göre üç ana kriter temel alınarak sınıflandırılırlar (Tablo 2.5).

Tablo 2.5: Proteazların sınıflandırılması [3]

1. Kaynağına göre proteazlar 1.1. Bitkisel proteazlar 1.2. Hayvansal proteazlar 1.3. Mikrobiyal proteazlar
2. Aktif Bölgedeki fonksiyonel gruplarına göre proteazlar 2.1. Serin proteazlar 2.2. Sistein proteazlar 2.3. Aspartil proteazlar 2.4. Metalo proteazlar
3. Katalitik bölgedeki işlevlerine göre proteazlar 3.1. Ekzo peptidazlar 3.1.1. Aminopeptidazlar 3.1.2. Karboksi peptidazlar 3.1.2.1 Serin tipi 3.1.2.2. Sistein tipi 3.1.2.3. Metalo tipi 3.2. Endo peptidazlar 3.2.1 Serin proteazlar 3.2.2 Sistein proteazlar 3.2.3 Aspartil proteazlar 3.2.4. Metalo proteazlar

Proteazlar etki ettikleri alana bağlı olarak da ekzo peptidazlar ve endo peptidazlar olmak üzere 2 büyük gruba ayrılırlar. Ekzo peptidazlar substrattaki peptid bağını amino (N-) yada karboksil (-C) ucundan keserlerken, endo peptidazlar substrattaki peptid bağını N- ve -C uçlarından farklı bölgelerden keserler. Ekzo peptidazlar N ya

da C ucundaki işlev bölgesine göre iki gruba ayrılırlar. Ekzopeptidazlar katalitik mekanizma temeline göre de sınıflandırılabilirler (Tablo 2.6).

Tablo 2.6: Katalitik bölgedeki işlevlerine göre peptidazlar [3]

Peptidazlar	Alt Sınıf
Ekzopeptidaz (Karboksipeptidaz)	
Serin-tip karboksipeptidazlar	3.4.16
Metallo karboksipeptidazlar	3.4.17
Sistein- tip karboksipeptidazlar	3.4.18
Endopeptidaz	
Serin endopeptidazlar	3.4.21
Sistein endopeptidazlar	3.4.22
Aspartik endopeptidazlar	3.4.23
Metalloendopeptidazlar	3.4.24
Katalitik mekanizması bilinmeyen endopeptidazlar	3.4.99

Ekzopeptidazlar sadece polipeptid zincirinin uçlarına etki ederler. Etki ettikleri uç baz alınarak N-terminal yada C-terminal sırası ile amino- ve karboksi peptidazlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Amino peptidazlar polipeptid zincirinin serbest bir N ucunda işlevseldir ve tek bir amino asit rezidüsünü bir dipeptidi ya da bir tripeptidi ayırır. Amino peptidazların N-terminal Met'i uzaklaştırdığı bilinir. Bakteri ve fungus içeren mikrobiyal türlerin geniş bir çeşidinde bulunurlar. Genellikle hücre içi enzimlerdir fakat *Aspergillus oryzae* tarafından üretilen aminopeptidaz hücre dışı enzimdir. Bakteri ve fungustan üretilen aminopeptidazların substrat spesifisiteleri hidroliz ürünlerinin yapıları temel alındığında farklı olabilir. Örneğin, *Escherichia coli*'den üretilen aminopeptidaz I büyük bir proteazdır (400 kDa) optimum pH'sı 7.5-10.5 arasındadır ve optimum aktivite için Mg^{2+} ya da Mn^{2+} iki değerlikli metal iyonlarına ihtiyaç duyar. *Bacillus licheniformis* aminopeptidazının ise molekül ağırlığı 34 kDa'dur ve aktivitesi Co^{2+} iyonları varlığında artar. Diğer taraftan *Bacillus stearothermophilus* aminopeptidaz II bir dimerdir ve molekül ağırlığı 80-100 kDa arasında olup Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} iki değerlikli metal iyonları tarafından aktive olur [3].

Karboksi peptidazlar polipeptid zincirinin C ucunda işlevseldir ve tek bir amino asit ya da bir dipeptidi ayırırlar. Karboksi peptidazlar enzimlerin aktif bölgesindeki

amino asit kalıntılarının yapısına göre üç gruba ayrılırlar. *Penicillium*, *Saccharomyces* ve *Aspergillus* cinslerinin türlerinden izole edilen serin karboksipeptidazların substrat spesifisiteleri aynıdır fakat optimum pH, stabilite, moleküler ağırlık ve inhibitörlerin etkisi gibi diğer özellikleri farklıdır. *Saccharomyces* spp. ve *Pseudomonas* spp.'den izole edilen metalo karboksipeptidazlar aktiviteleri için Zn^{2+} ya da Co^{2+} iki değerlikli metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Sistein karboksipeptidazlar aktif bölgelerindeki sistein rezidüleri ile karakterize edilirler [3].

Endopeptidazlar peptid zincirinin N- ve -C terminal uçları dışında zincirin iç bölgelerindeki peptid bağlarına etki etmeleri ile karakterize edilirler. Serbest amino ya da karboksil grubunun varlığı enzimatik aktivite üzerine negatif etki yaratır. Katalitik etki mekanizmalarını göz önüne alınarak serin, sistein, aspartil ve metalo proteaz olmak üzere dört gruba ayrılırlar. Ayrıca endopeptidazlar substrat tercihlerine göre tripsin, kimotripsin ve elastaz benzeri serin proteazlar olmak üzere 3 sınıfta toplanırlar. Tripsin benzeri serin proteazlar pozitif yüklü kalıntıdan sonraki peptid bağı, kimotripsin benzeri serin proteazlar büyük hidrofobik kalıntıdan sonraki peptid bağı, elastaz benzeri serin proteazlar ise küçük hidrofobik kalıntıdan sonraki peptid bağı hidrolizlerler.

Serin endopeptidazlar katalitik işlemde aktif bölge merkezinde serin, sistein tip peptidazlar ise aktif merkezinde sistein içerirler. Aspartik endopeptidazlar katalitik aktiviteleri için katalitik bölgelerinde iki aspartik asit kalıntısına ihtiyaç duyarlarken metalo endopeptidazlar sahip oldukları katalitik mekanizmalarında yaygın olarak çinko veya metal iyonlarını kullanırlar. Bir kısım endopeptidaz ise henüz katalitik aktivite mekanizması tanımlanamadığı için yukarıda belirtilen grupların dışında EC 3.4.99 alt sınıfında listelenmiştir (Tablo 2.6) örneğin aktivite gösterebilmek için ATP'ye ihtiyaç duyan ATP-proteazlar gibi. Her bir sınıf peptidaz katalizde görev alan fonksiyonel grubuna göre S, C, A, M ve U sırası ile serin, sistein, aspartik, metallo ve bilinmeyen tip proteaz olmak üzere harfler ile kodlanır [3].

2.3.2. Katalitik mekanizmalarına göre proteazlar

Proteolitik enzimler katalitik bölgenin kimyasal yapısına ya da aktif bölgede yer alan zorunlu amino asit kalıntısı dikkate alınarak; serin, aspartik (asit), sistein ve metalloproteazlar olmak üzere dört ana gruba ayrılırlar. Proteolitik enzimlerin katalitik bölgedeki zorunlu amino asit kalıntısı göz önüne alınarak yapılan sınıflandırılması ve her bir sınıfa ait örnekler tablo 2.7’de verilmiştir.

Tablo 2.7: Proteolitik enzimlerin katalitik mekanizmaları göz önüne alınarak yapılan sınıflandırılması [3]

Proteaz Sınıfı	Örnekler
Serin proteazlar (EC 3.4.21)	Tripsin, kimotripsin, elastaz, subtilizin, proteinaz K
Sistein proteazlar (EC 3.4.22)	Papain, fisin, bromelain
Aspartik proteazlar (EC 3.4.23)	Pepsin, renin (kimosin), mikrobiyal aspartik proteazlar
Metalloproteazlar (EC 3.4.24)	Kollajenaz, elastaz, termolizin

2.3.2.1. Serin proteazlar

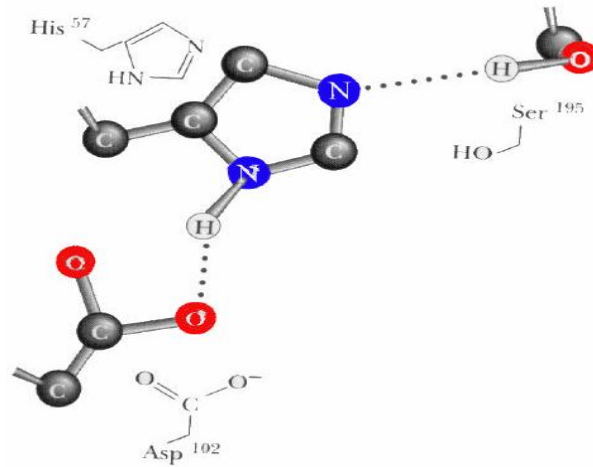
Serin proteazlar; aktif bölgelerindeki zorunlu serin kalıntısı varlığı ile karakterize edilirler. Proteazların en sıklıkla rastlanan sınıfını oluştururlar ve arkealar, bakteriler, ökaryotlar ve virüslerden izole edilebilirler. Serin proteazlar; ekzopeptidaz, endopeptidaz, oligopeptidaz ve omegapeptidazlar olmak üzere de gruplara ayrılırlar. Dört grupta evrimsel olarak aynı kökenden gelmektedir. İstisnalar dışında birçok serin proteazın molekül ağırlığı 18 ile 35 kDa arasında değişir ve maksimum aktivite gösterdikleri pH aralığı 7 ile 11 arasındadır. Bu grup üyelerinin yapısal benzerlikleri göz önüne alınarak kendi aralarında da alt gruplara ayrılabilirler. Serin proteazların alt grubunda yer alan subtilizinler uygulama açısından bakıldığında çok büyük endüstriyel öneme sahiptirler. Bu grup enzimler *Bacillus* cinsi bakterilerden üretilirler ve deterjan katkı maddesi olarak geniş bir uygulama alanına sahiptirler [5].

Serin proteazların en tipik inhibitörü fenilmetilsülfonilflorür (PMSF) olmakla birlikte, di-izopropilflorofosfat (DFP), tosil-L-lizin klorometil keton (TLCK), 3,4-dikloroizokumarin (3,4-DCI) gibi inhibitörler tarafından da dönüşümsüz inhibisyona uğratılırlar. Serin proteazların bazıları p-kloromerküribenzoat (PCMB) gibi tiyol ayıraçları tarafından da inhibe edilirler. Genellikle nötral ve alkalin pH değerlerinde

aktiftirler ve pH 7-11 arasında optimum aktivite gösterirler. Esterolitik ve amidaz aktivitesi içeren geniş substrat spesifisitesine sahiptirler. Molekül ağırlıkları 18-35 kDa arasında değişir ve izoelektrik noktaları genellikle pH 4-7 arasındadır [3].

Bakteriler, küfler, mantarlar ve mayalar tarafından üretilen ve serin proteazların alt grubunda yer alan serin alkalen proteazlar serin proteazların en geniş alt grubunu temsil ederler ve yüksek alkalen pH'da aktiftirler. Bu enzimler DFP ya da bir patates proteaz inhibitörü tarafından inhibe olurlar fakat tosil-L-fenilalanin klorometil keton (TPCK) ya da TLCK tarafından inhibisyona uğratılmazlar. Substrat spesifisitelemi aynıdır peptid bağını tirozin, fenilalanin ya da lösinin karboksil ucundan hidrolizlerler. Optimum pH değerleri 10 izoelektrik noktaları da pH 9 civarındadır. Moleküler ağırlıkları 15-30 kDa arasında değişir. *Arthrobacter*, *Streptomyces* ve *Flavobacterium* cinslerine ait bazı bakteri türleri tarafından da üretilirler.

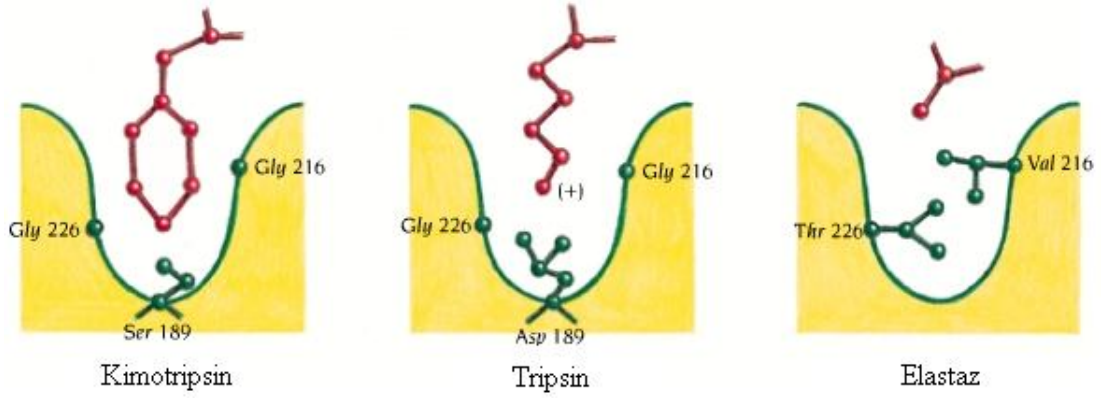
Serin proteazlar (EC 3.4.21) kimotripsin, tripsin ve elastaz gibi enzimleri içeren kimotripsin tip ve subtilisin gibi bakteriyel enzimleri içeren subtilisin tip olmak üzere 2 farklı grupta da incelenebilir. Bu iki grubun katalitik mekanizmaları ve aktif bölge yapıları aynı olmasına rağmen genelde 3 boyutlu yapıları farklıdır. Katalitik bölgede katalizden sorumlu olan ve katalitik triad olarak da bilinen amino asitler Ser¹⁹⁵, His⁵⁷ ve Asp¹⁰² dir. Katalitik bölgede yer alan ve katalizden sorumlu amino asitlerin düzenlenmesi ve aralarındaki hidrojen bağları şekil 2.8'de verilmiştir.



Şekil 2.8: Katalizden sorumlu Ser¹⁹⁵, His⁵⁷ ve Asp¹⁰² katalitik üçlüsü [6]

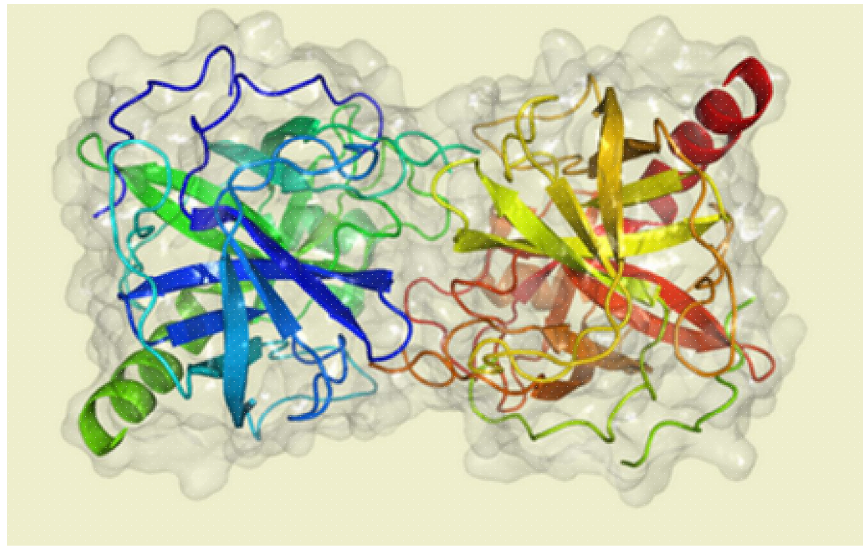
Subtilizinler, serin proteazların *Bacillus* kökenli ikinci büyük sınıfını oluşturmaktadırlar. Subtilizin Calsberg ve subtilizin Novo ya da bakteriyel proteaz Nagase (BPN') olarak iki farklı tipte tanımlanmışlardır. *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen subtilizin Calsberg, Calsberg laboratuvarında Ottesen, Lang ve Linderstrom tarafından 1947'de keşfedilmiştir. Subtilizin Calsberg deterjanlarda yaygın olarak kullanılır. Subtilizin Novo *Bacillus amyloliquefaciens* tarafından üretilmektedir. Subtilizin BPN' ticari olarak daha az öneme sahiptir. Her iki subtilizinin molekül ağırlığı 27.5 kDa olup 58 amino asitlik farkla biri diğerinden ayrılır. Her iki enzim de geniş bir substrat spesifitesine ve Ser²²¹, His⁶⁴ ve Asp³² den oluşan aktif bölge üçlüsüne sahiptir. Adı geçen iki mikroorganizma tarafından üretilen her iki enzim de pH 8-11 aralığında ve 70°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda etkilidirler [3]. Deterjan formülasyonlarında düşük termal stabilite ve kısa raf ömrüne sahip olmaları nedeniyle subtilizinlerin yönlendirilmiş mutasyon ile stabilitelerinin arttırılabildiği bilinmektedir [13].

Serin proteazların aktif bölgelerinde birbirine yakın konumda yerleşmiş olarak bulunan Ser¹⁹⁵, His⁵⁷ ve Asp¹⁰² kalıntıları birbirlerine hidrojen bağı ağı ile bağlanmışlardır. Aktif bölgedeki serin nükleofil, aspartat elektrofil ve histidin baz görevini üstlenmiştir. Bu kalıntıların geometrik düzenlenmeleri de aynıdır. Serin proteazlarda bu üç farklı amino asit aktif bölgeye yakın bir cep oluştururlar. Substrat spesifitesini kuvvetli bir biçimde etkileyen amino asit serin kalıntısıdır. Tripsindeki bu cep nispeten daha derin olup stratejik olarak karboksilat yan zinciri cebin dibine yerleşmiştir. Tripsin bu cepte substratını lizin ve arginin yan zincirlerinden yüksek seçicilik ile yakalayarak adı geçen kalıntılardan sonra substratını hidrolizler. Kimotripsindeki cep ise daha geniş ve büyüktür. Enzim aromatik grup bulunduran substratlara karşı spesifiteye sahiptir. Buna karşın elastaz, valin ve treonin yan zincirleri tarafından oluşturulmuş derine inmeyen sığ bir cebe sahiptir. Enzim spesifik olarak kısa, yüksüz ve C-terminal uçlardan substratını katalizler [5]. Serin proteazların spesifisiteyi şekil 2.9'da gösterilmiştir [14].



Şekil 2.9: Serin proteazların (tripsin, kimotripsin ve elastaz) spesifisiteleri [14]

Serin proteazlar sınıfında yer alan ve en iyi karakterize edilen enzim α -kimotripsindir. Bu enzim 241 amino asit kalıntısı bulunduran bir endoproteaz olup polipeptid zincirindeki aromatik amino asit kalıntılarına (Phe, Tyr, Trp) spesifisite gösterir. Bu seçicilik substratın aromatik yan zinciri ile katalitik bölge arasındaki hidrofobik etkileşimler ve hidrofobik bağlanma cebinin katalitik bölgeye olan yakınlığı ile gerçekleştirilir [6]. Ayrıca katalitik bölge mimarisi ilk olarak aydınlatılan proteaz α -kimotripsin olup 1968 yılında David Blow ve çalışma arkadaşları tarafından X-ray kristalografisi kullanılarak enzimin aktif bölge kalıntıları ve katalizden sorumlu amino asitleri belirlenmiştir [15]. α -kimotripsin'in üç boyutlu konformasyonel yapısı Şekil 2.10'da verilmiştir [16].



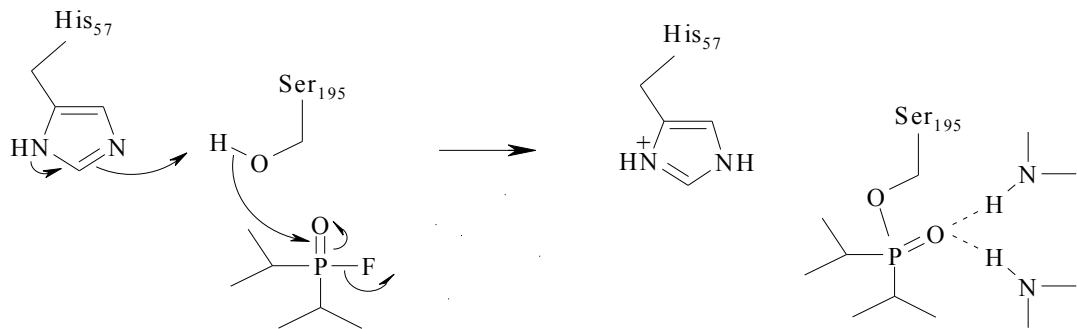
Şekil 2.10: α -kimotripsin'in üç boyutlu konformasyonel yapısı [16]

Serin proteazların gerçekleştirdikleri kataliz reaksiyonlarında birinci basamak substratın aktif bölgeye bağlanmasıdır ve bu basamaktaki substrat spesifitesi aktif bölge içinde yer alan kalıntılar tarafından belirlenmektedir. Spesifik bağlanmayı Ser¹⁹⁵ ile kesilen peptid bağının karbonil grubu arasındaki yakınlık belirler. Peptid bağının kesilmesi ping-pong mekanizması ile gerçekleşir. Bu mekanizmada substrat bağlanır, ürün (peptidin N-terminal ucu) ayrılır diğer substrat bağlanır (su) ve diğer ürün (peptidin C-terminal ucu) ayrılır. Katalitik triatda yer alan her amino asit proste spesifik görev üstlenir.

Bütün serin proteazlar sahip oldukları katalitik merkezlerin yapısına göre substrat spesifitelerini belirlemelerine rağmen yüksek reaktiviteye sahip serin kalıntısı tarafından belirlenen benzer katalitik mekanizmaya sahiptirler [1].

Katalitik kalıntıların aydınlatılması çalışmalarında serin proteazlar spesifik olarak organofosfor ve klorometil keton grubu substrat analogu inhibitörler ile inaktivasyona uğrattırılır.

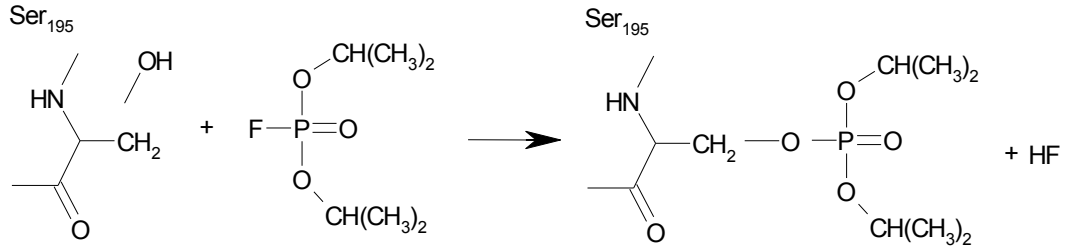
Serin (Ser, S); Organofosfor inhibitörler aktif bölgedeki serine atak yaparak normal enzimatik reaksiyonda oluşan tetrahedral ara ürüne benzer enzim tarafından sıkıca tutulan kararlı tetrahedral fosfat esterlerini oluştururlar. İnaktivasyonun mekanizması şekil 2.11’de verilmiştir [6].



Şekil 2.11: Organofosfor bileşiği tarafından enzimin aktif bölgesindeki serin kalıntısı üzerinde gerçekleştirilen tersinmez inaktivasyonun mekanizması

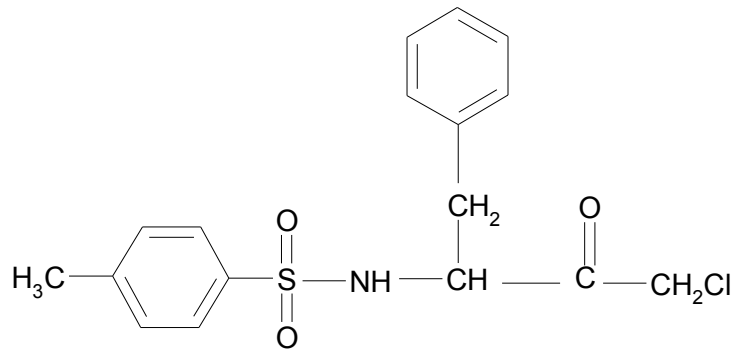
Aktif serin kalıntısının zorunlu kalıntı olduğu enzimin aktif bölgesinde diizopropilfosforidat (DIPF) ile yapılan kimyasal etiketleme çalışması ile de

kanıtlanmıştır. Kimyasal ajan aktif serin kalıntısına bağlandıktan sonra enzim molekülü tersinmez olarak inaktive olmaktadır. Protein molekülündeki diğer serin kalıntıları DIPF ile tepkimeye girmemekte (Şekil 2.12). Bu da enzimin aktif bölgesindeki serin kalıntısının katalitik aktivite için zorunlu olduğunu kanıtlamaktadır [5].

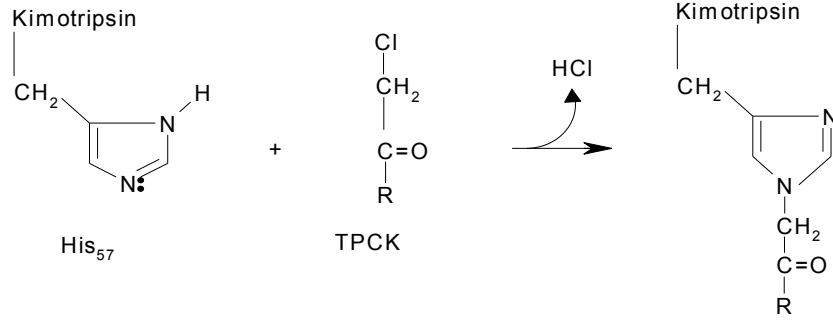


Şekil 2.12: Serin proteazların DIP-enzim kompleksi oluşumu ile DIPF tarafından inaktivasyonu

Histidin (His, H); Afinite işaretlemelerinde katalitik öneme sahip ikinci bir amino asit olarak histidin keşfedilmiştir. Kimotripsinin spesifik olarak tosil-L-fenilalanin klorometil keton (TPCK) (Şekil 2.13) ile bağlanmasının sebebi TPCK'nın kimotripsinin tercih ettiği amino asit kalıntılarından biri olan fenilalanin ile benzerlik göstermesidir. Aktif bölgeye bağlanan TPCK'nın klorometil keton grubu kuvvetli bir alkilleyici ajandır ve sadece katalitik aktiviteden sorumlu histidin ile tepkimeye girer. TPCK ile histidin arasında gerçekleşen tepkime şekil 2.14'de verilmiştir.



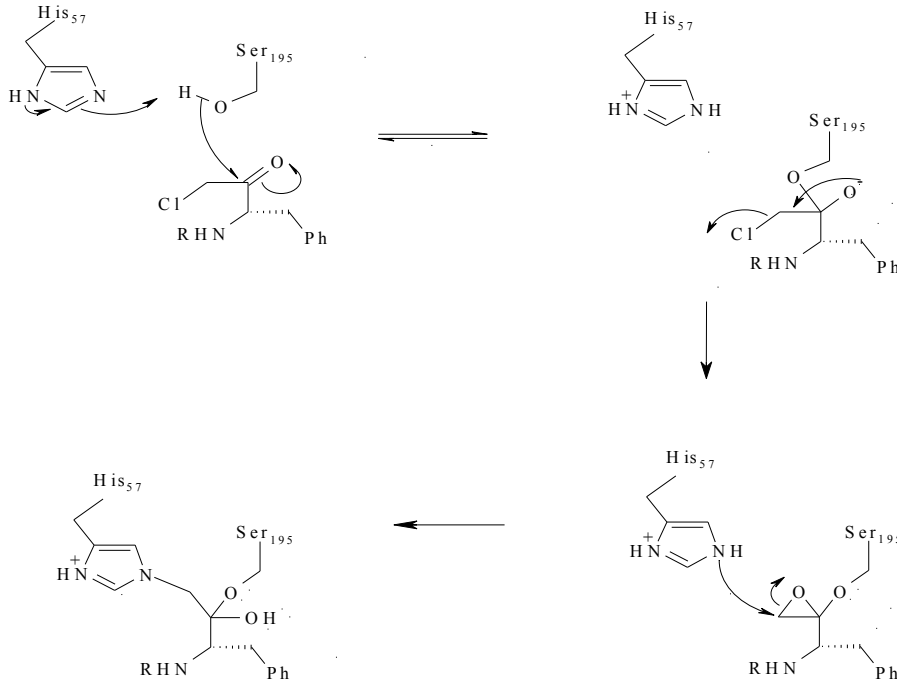
Şekil 2.13: tosil-L-fenilalanin klorometil keton (TPCK)



Şekil 2.14: TPCK'nın kimotripsinin His⁵⁷ residüsü ile tepkimesi

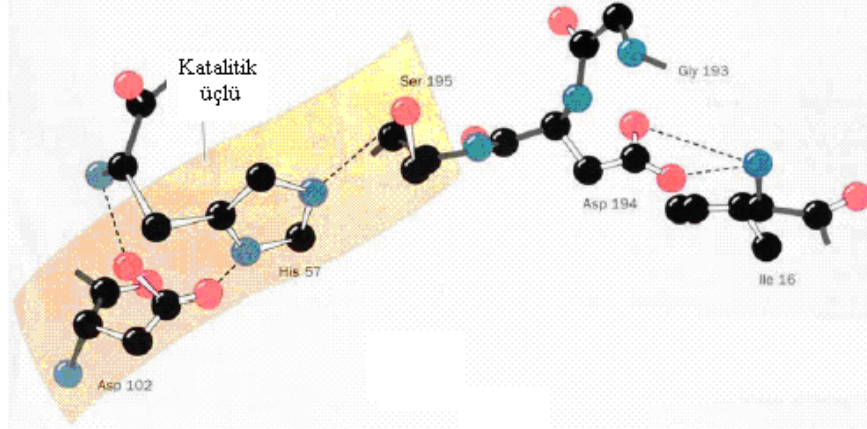
TPCK ile histidinin tepkimesi 8M üre varlığında ya da DIP-kimotripsin kompleksinde (bu komplekste aktif bölge bloke edilmiştir) gerçekleşmemektedir. Bu da histidinin kimotripsinin aktif bölgesindeki zorunlu amino asitlerden biri olduğunu kanıtlamaktadır [5].

Klorometil keton analogları aktif bölgedeki histidin bazını modifiye ederek serin kalıntısından daha reaktif His⁵⁷ kalıntısının oluşmasına neden olurlar. Klorometil keton tarafından gerçekleştirilen inaktivasyonun mekanizması şekil 2.15'de verilmiştir [6].



Şekil 2.15: Klorometil keton bileşiği tarafından enzimin aktif bölgesindeki histidin kalıntısı üzerinde gerçekleştirilen tersinmez inaktivasyonun mekanizması

Değişik laboratuvarlar tarafından kimotripsin ile yapılan çalışmalarda kimotripsinin aktif bölge mimarisi şekil 2.16'da serin proteazlar için önerilen katalitik mekanizma şekil 2.17'de verilmiştir. Tüm reaksiyon aşağıdaki gibi özetlenebilir;



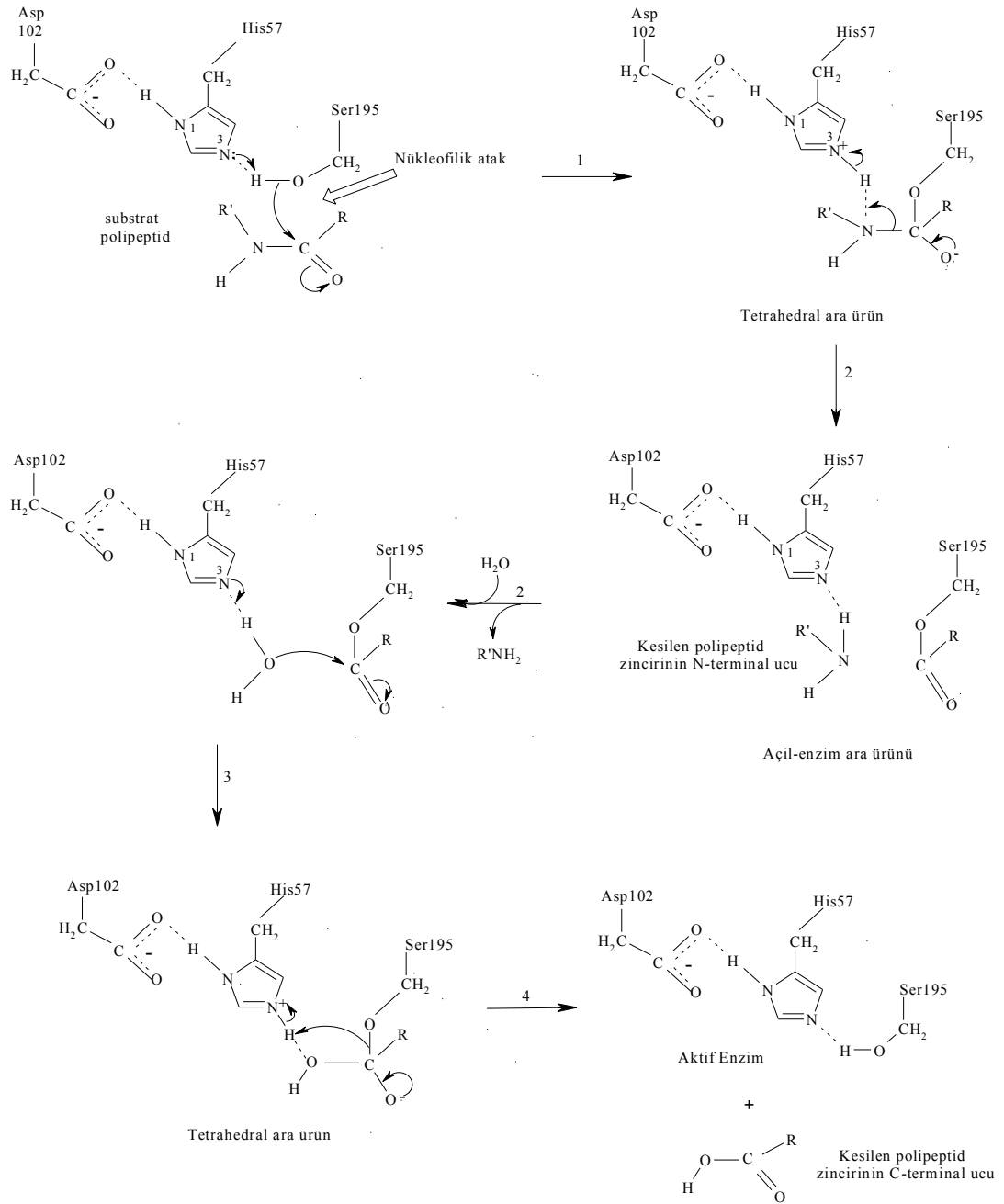
Şekil 2.16: Kimotripsinin aktif bölge kalıntıları [17, 18]

1. Kimotripsinin substrata bağlanmasından sonra Michaelis kompleksi olarak da isimlendirilen enzim-substrat kompleksi oluşur. Bu basamak reaksiyonda hız belirleyici basamaktır. Hidrolizlenecek peptid bağının karbonil karbonuna gerçekleşen nükleofilik atak sonucu tetrahedral ara kompleks olarak isimlendirilen ara ürün oluşur (kovalent kataliz). Yapılan X-ışınları çalışmaları nükleofilik atağın gerçekleştirilmesi için Ser¹⁹⁵ kalıntısının ideal pozisyonda (yakınlık ve düzenlenme etkisi) yerleştiğini göstermiştir. His⁵⁷'nin imidazol halkası ayrılan protonu alır ve imidazolyum iyonu oluşur (genel baz katalizi). Bu işlem Asp¹⁰²'nin solvatize olmamış karboksilat iyonunun polarizasyon etkisi yardımı ile gerçekleşir ki Asp¹⁰²'nin hidrojeni His⁵⁷'ye bağlanır (elektrostatik kataliz). Yapılan çalışmalar Asp¹⁰²'nin imidazolyum iyonundan proton alarak yüksüz karboksilik asit grubunu oluşturmaktan çok karboksilat iyonunu tercih ettiğini göstermiştir. Tetrahedral ara ürün bir geçiş hali ürünü olmasına rağmen kalıcılık göstermesi nedeni ile çok iyi tanımlanabilmiştir.

2. Bu basamakta His⁵⁷'nin N³ azotundan protonun alınması ile birlikte tetrahedral ara ürün açil-enzim ara ürününe bozunur (genel asit katalizi). Amin grubu (R'/NH₂,

kesilen polipeptid zincirinin yeni N-terminal ucu) enzimden ayrılır ve çözücüden gelen su molekülü amin grubu ile yer değiştirir.

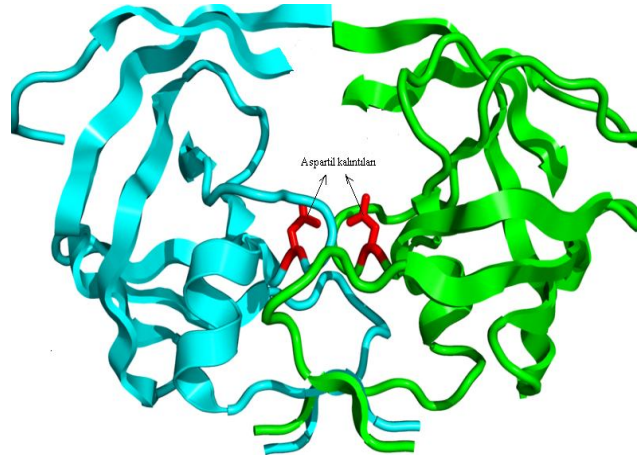
3 ve 4. Açıl-enzim ara ürünü hızlı bir şekilde deaçillenecek takip eden basamakta karboksilat son ürününün (kesilen polipeptid zincirinin yeni C-terminal ucu) ayrılması ile reaksiyon sonlanır. Bu basamakta su atak yapan nükleofil molekülü Ser¹⁹⁵ ise ayrılan gruptur [18].



Şekil 2.17: Serin proteazlar için önerilen katalitik etki mekanizması

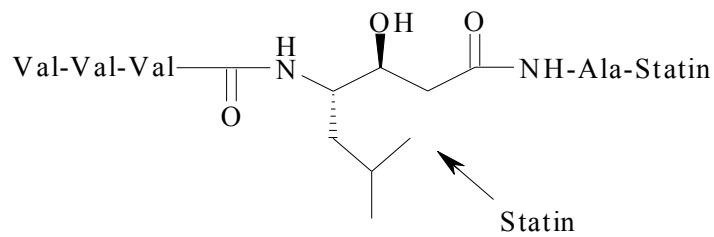
2.3.2.2. Aspartik (asit) proteazlar

HIV-1 proteazı saflaştırılarak kristallendirilmiş ve değişik araştırma grupları tarafından X-ışınları ile yapısı çok iyi derecede aydınlatılmış bir aspartat proteazdır. Enzimin 99 kDa büyüklüğünde homodimer yapıda ve bu sınıf enzim grubunda yer alan pepsin gibi diğer üyeler ile benzer yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Enzimin aktif bölgesi iki alt birimin de yüzeyinde olup aktif bölge amino asit kalıntılarında biri olan Asp²⁵ in bir alt biriminde eşleniği olan diğer Asp^{25'} in de diğer alt biriminde yer aldığı gözlenmiştir. HIV-1 proteazının polipeptid zinciri üzerinde tercih ettiği kesim noktası aro-prolin bölgesidir (Aro; tirozin, fenilalanin ve triptofan aromatik amino asit kalıntılarını temsil etmektedir). HIV-1 proteazının üç boyutlu konformasyonel yapısı şekil 2.18'de verilmiştir [19].

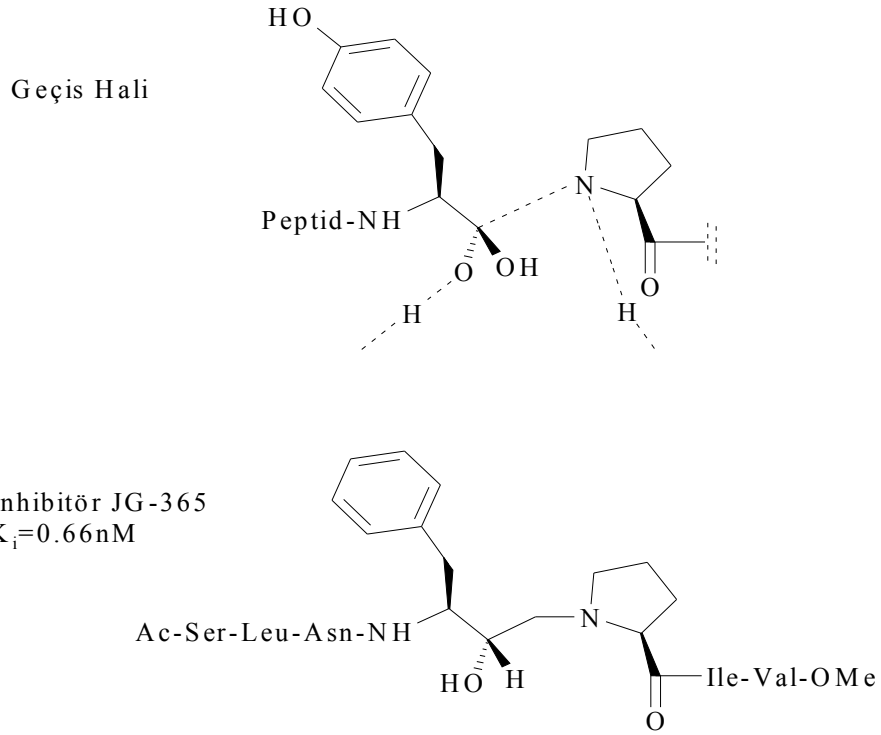


Şekil 2.18: HIV-1 proteazının üç boyutlu konformasyonel yapısı [19]

Bu gruptaki enzimler pepstatin inhibitörünün (Şekil 2.19) düşük konsantrasyonları tarafından ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) inhibisyona uğrattırılır. Pepstatin tarafından gerçekleştirilen inhibisyonun mekanizması şekil 2.20'de gösterilmiştir [6].



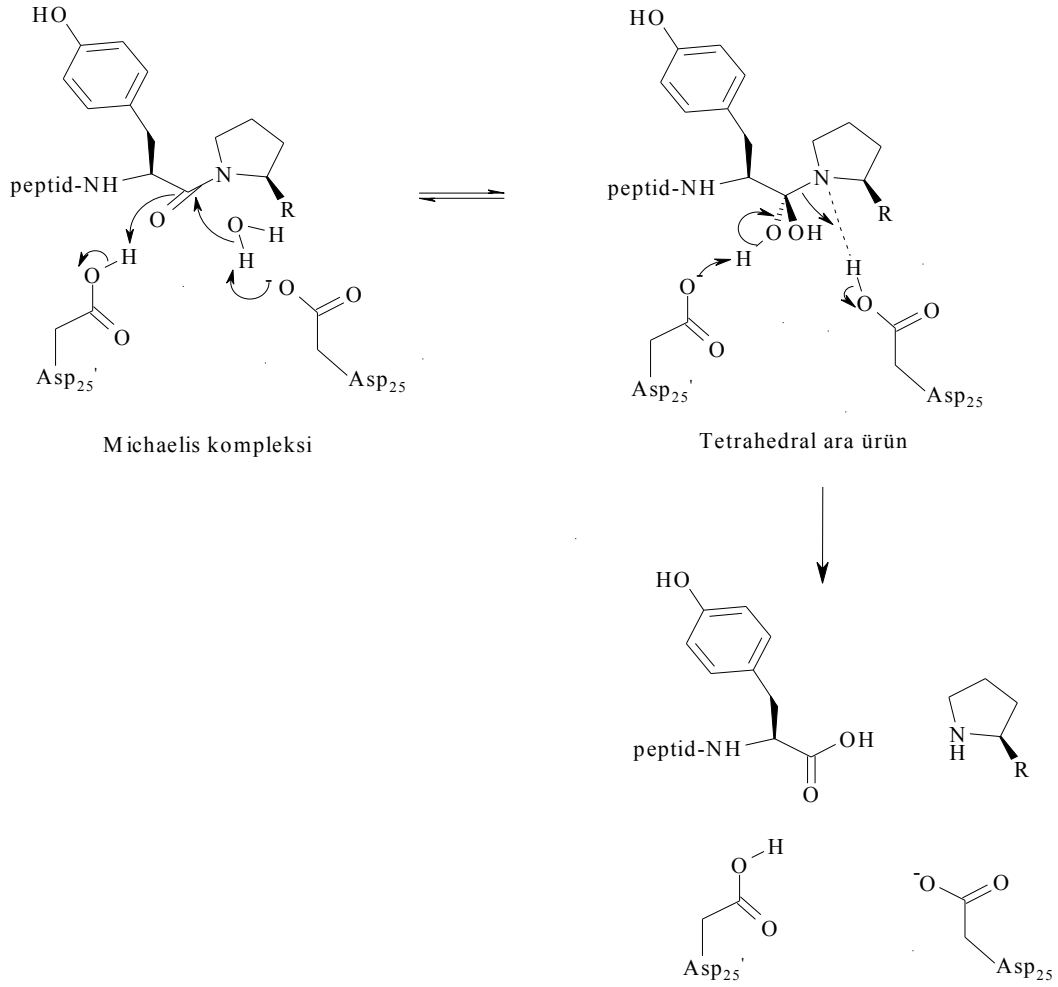
Şekil 2.19: Pepstatin



Şekil 2.20 HIV-1 proteazının geçiş hali inhibitörü

Aspartik proteazlar tarafından proteinlerin hidrolizi mekanizması için genel asit-baz katalitik mekanizması önerilmiştir. Aspartik proteazlar için önerilen mekanizma ile gerçekleştirilen ve suyun direkt olarak reaksiyona katıldığı hidroliz reaksiyonunun mekanizması şekil 2.21’de verilmiştir.

Asp²⁵ genel baz gibi davranarak su molekülüne atak yapar ve su molekülünün bağlarını aktive eder böylelikle hidrolizlenecek peptid bağının karbonil karbonuna hidroksil iyonunun nükleofilik atağı gerçekleşir. Asp^{25'} genel asit gibi davranarak protonunu verir ve oluşan oksianyonu stabilize ederek hidrate ara ürün oluşturulur. Protonize olmuş Asp²⁵ tarafından peptid bağının azot atomunun protonasyonu ile yük düzenlenmesi yapılır ve Asp^{25'} protonunun iade edilmesi ile birlikte tetrahedral ara ürün bozunur ve katalitik döngü tamamlanır (Şekil 2.21) [6, 18].



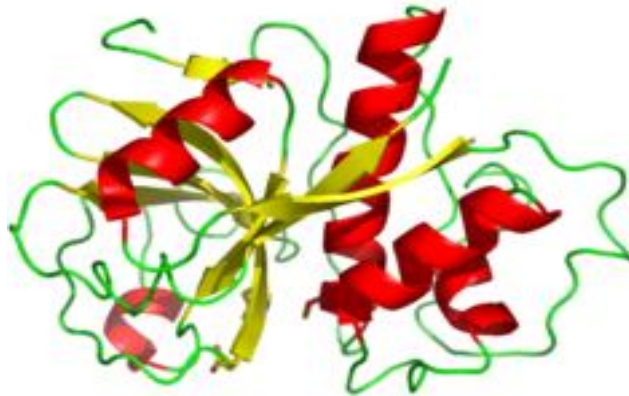
Şekil 2.21: HIV-1 proteazı için önerilen katalitik etki mekanizması

2.3.2.3. Sistein (sülfidril) proteazlar

Sülfidril ya da tiyol proteazlar olarak da bilinen sistein proteazlar yaşayan organizmalarda geniş bir dağılım gösterirler. Bu grup enzimler virüsler (pikornain), bakteriler (streptopain), protozoolar (kruzain), mantarlar, bitkiler (papain, fisin, aktinidin) ve memelilerde (lizozomal katepsinler, sitosolik kalpainler) bulunurlar. 21 grupta toplanırlar ve bir çoğu papain ailesinin içinde numaralandırılmıştır. Papain ailesi içindeki enzimlerin ana fonksiyonları protein hidrolizasyonu olmakla birlikte yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda immünolojik kontrollerde, prohormon aktivasyonlarında ve apoptosiste de kullanılabilecekleri anlaşılmıştır [18].

Sistein (tiyol) proteazların aktivitesi sistein ve histidin içeren katalitik triada bağlıdır. Cys ve His kalıntılarının dizilişi sınıflar arasında farklılık gösterir. Genellikle sistein

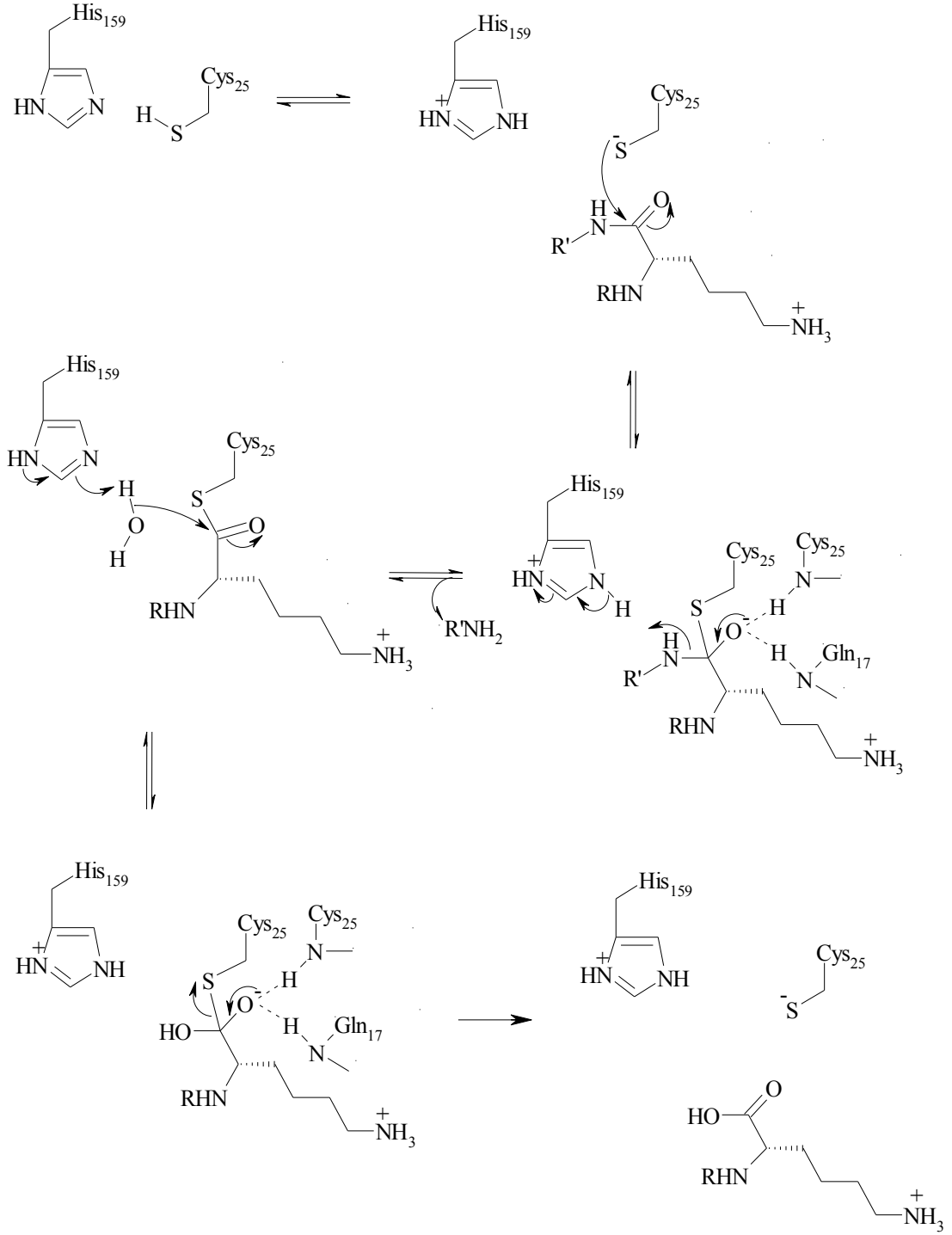
ve HCN gibi indirgeyici ajanlar varlığında aktiftir. Yan zincir spesifitesine göre papain benzeri, tripsin benzeri, glutamik aside spesifik ve diğerleri olmak üzere dört gruba ayrılırlar. Genellikle birkaçı hariç (lizozomal proteazlar asidik pH'da maksimum aktivite gösterirler) nötral pH'da optimuma sahiptirler [3]. Proteaz ailesinin bu grubu aktif bölgelerinde bulundukları yan zincirinde tiyol grubu bulduran sistein kalıntısı ile karakterize edilirler. Serin proteazlara benzer şekilde kovalent kataliz ile amid bağı hidrolizini gerçekleştirirler. Aktif bölgede bulunan tiyol grubunun oksidasyona çok eğilimli olması nedeni ile bu grup enzimler ılımlı indirgeyici ajanlar varlığında saflaştırılmalıdır. Aktif bölgedeki sistein p-klorocivabenzoat ya da organociva bileşikleri gibi sistein yönelimli ajanlar tarafından sisteinin bu bileşikler ile kuvvetli civa-sülfür bağı oluşturması sebebiyle kolaylıkla modifiye edilebilir. Sistein proteaz ailesinin en iyi karakterize edilmiş enzimi papaya bitkisinden izole edilen 212 amino asit bulduran asidik endoproteaz papaindir. Enzim arjinin, lizin gibi bazik amino asit kalıntılarında sonra peptid zincirini hidrolizler. Aktif bölge histidin kalıntısının NMR spektroskopisi analizi ile enzimin aktif formunda imidazol halkasının protonlanmış olduğu belirlenmiştir. Bu da enzimin geçiş halinde imidazolyum-tiyolat iyon çiftini bulduğunu göstermektedir. Bu durum ancak sistein proteazlardaki sistein yan zincirindeki tiyol grubunun pK_a değerinin yalnızca 8-9 olması durumunda mümkündür ve iyon çiftinin stabilizasyonu aktif bölgedeki elektrostatik etkileşimler tarafından sağlanmaktadır [6]. Papain için önerilen üç boyutlu konformasyonel yapı şekli şekil 2.22'de verilmiştir [20].



Şekil 2.22: Papainin üç boyutlu konformasyonel yapı şekli [20]

Papain ailesinin kristal yapıları incelendiğinde enzimin iki domenden oluştuğu ve katalitik triadında Cys-His-Gln'in yer aldığı tespit edilmiştir [21]. Papain bu grubun en iyi ve en çok çalışılan enzimidir. Kataliz mekanizması serin proteazlarda olduğu gibi kovalent ara ürün oluşumu için histidin ve sistein residülerini gerektirir [18]. Sistein proteazlar açıl-tiyol ara ürününün hidrolizlendiği genel asit-baz oluşumunu gerektiren iki yer değiştirme reaksiyonunun gerçekleştiği hidroliz mekanizması ile karboksilik asit türevlerini hidrolizlerler. Bu sebeple sistein proteazların etki mekanizması serin proteazların etki mekanizmasına çok benzerdir [3]. Sistein proteazlardaki zorunlu Cys²⁵ (nükleofilik kalıntı) ve His¹⁵⁹ (papaindeki numaralandırma) sırasıyla serin proteazlardaki Ser¹⁹⁵ ve His⁵⁷ kalıntıları ile benzer görevleri üstlenmişlerdir. Sistein proteazlardaki nükleofil serinin hidroksil grubu yerine sisteinin tiyolat iyonudur [18].

Sistein proteazlardan papain için önerilen genel katalitik mekanizma şekil 2.23'de açıklandığı gibidir. Aktif bölge kalıntısı His¹⁵⁹ yine aktif bölgedeki Cys²⁵'in tiyol grubunu polarizleyerek nötral ve zayıf asidik pH değerlerinde Cys²⁵'in tiyol grubunun deprotonasyonunu gerçekleştirir. Yüksek miktarda nükleofilik karakter taşıyan tiyolat-imidazolyum iyon çiftinin oluşmasını takiben tiyolat anyonu hidrolizlenecek amid bağının karbonil karbonuna atak yapar ve kovalent tiyoester ara ürünü oluşur. Oluşan bu yüksek enerjili oksianyon ara ürünü Cys²⁵ ve glutamin (Gln¹⁷)'in N-H amid bağları ile hidrojen bağlarını oluşturması vasıtasıyla stabilize edilir. Tiyoeester ara ürününe suyun atak yapması ile ara ürün bozunarak (genel baz katalizi) karboksilik asit ürünü oluşur ardından da enzim rejenere edilir [6].



Şekil 2.23: Papain için önerilen katalitik etki mekanizması

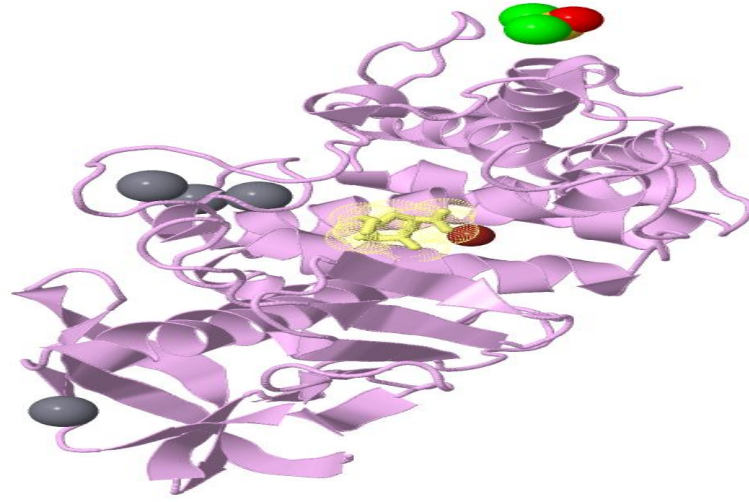
2.3.2.4. Metaloproteazlar

Proteazların en eski sınıflarından biri olan metaloproteazlar bakteri, mantar ve yüksek organizmalarda bulunurlar. Amino asit dizilimlerinde ve yapılarında büyük

farklılıklar olmakla birlikte bu grupta yer alan enzimlerin büyük bir kısmı katalitik aktivite gösterebilmek için genellikle çinko iyonuna ihtiyaç duymaktadırlar. Bazı durumlarda çinko, kobalt veya nikel gibi metal iyonları ile aktivite kaybı gözlenmeksizin yer değiştirebilmektedir [21].

Metaloproteazların yaklaşık otuz sınıfı tanımlanmıştır. Bunların onyedisi yalnızca endopeptidazları onikisi yalnızca ekzopeptidazları içerirken bir sınıf hem endo hem de ekzopeptidaz içermektedir. İşlev spesifisitelerine göre nötral, alkalen, *Myxobacter* I ve *Myxobacter* II olmak üzere dört gruba ayrılırlar. Alkalen metaloproteazlar çok geniş bir spesifisite gösterirken nötral metaloproteazlar hidrofobik amino asit kalıntılarına spesifisite gösterirler. *Myxobacter* I ayrılan bağın her iki tarafındaki küçük amino asit kalıntılarına *myxobacter* II peptid bağının amino tarafındaki lizin kalıntılarına spesifiktir. Genellikle EDTA gibi şelat yapıcı ajanlar tarafından inhibe olurlar. *Bacillus stearothermophilus* tarafından üretilen termolizin bir nötral metaloproteazdır disülfid köprüleri dışında tek bir peptittir ve moleküler ağırlığı 34 kDa'dur. 80°C'de 1 saat yarılanma ömrüyle çok kararlı bir proteazdır. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Serratia* türleri tarafından üretilen alkalen metaloproteazlar 48-60 kDa moleküler ağırlığa sahiptirler ve pH 7-9 arasında aktiftirler. Matriks metaloproteazlar doku morfojenezi farklılaşması sırasında hücre dışı matriks degradasyonunda önemli bir rol oynarlar ve kanser ve artrit gibi hastalıkların tedavisinde yararlı olabilirler [3].

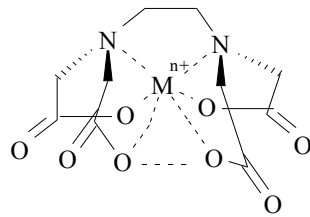
Bakteriyel termolizin bu grupta iyi karakterize edilen enzimlerden bir tanesidir ve kristalografik çalışmalarda enzimdeki çinko iyonunu iki tane histidin bir tane de glutamik asit kalıntısının bağladığı görülmüştür. Enzim termofilik bakteri *Bacillus thermoproteolyticus* tarafından üretilir ve sıcaklığa karşı olağanüstü bir dayanıklılığı vardır. 35 kDa molekül ağırlığında bir endopeptidazdır ve peptid zincirindeki lösin, izolösin, valin ve fenilalanin gibi hidrofobik kalıntılardan önce zinciri hidrolizler. Yapısında aktif merkezindeki çinko iyonuna ilaveten dört tane bağlı kalsiyum iyonu bulundurur. Adı geçen diğer metaloproteazlar ile benzer etki mekanizmasına sahiptir. Termolizinin üç boyutlu konformasyonel yapısı şekil 2.24'de verilmiştir [22].



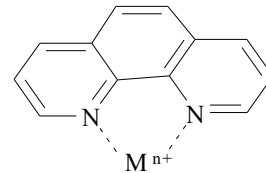
Şekil 2.24: Termolizinin üç boyutlu konformasyonel yapısı [22]

Metaloproteazlar sınıfında yer alan pankreatik karboksipeptidaz da kendisine sıkıca bağlanmış formda bulundurduğu çinko iyonu ile karakterize edilir. Zn^{2+} iyonunun Co^{2+} ve Ni^{2+} gibi metal iyonları ile yer değiştirmesi durumunda da aktivitenin geri kazanıldığı gözlenmiştir. İnsan pankreası C-terminal hidrofobik kalıntıları tercih eden karboksipeptidaz A ve C-terminal bazik kalıntıları tercih eden karboksipeptidaz B olmak üzere bu enzimlerin proenzim formunu sentezler ve salgılar [21].

Metalloproteazların etki mekanizması aspartik ve sistein proteazın etki mekanizmasından keskin farklılıklar gösterir. Bu grup enzimler aktivite gösterebilmek için iki değerlikli metal iyonlarının varlığına ihtiyaç gösterirler ki bu enzimler etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) veya 1,10 fenantrolin (Şekil 2.25) gibi şelat yapıcı ajanlar ile muamele edildiklerinde metal iyonlarının taşınması dolayısıyla kolayca inaktive olmaları sebebiyle diğer sınıf proteazlardan kolayca ayırt edilebilirler [6].



Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)



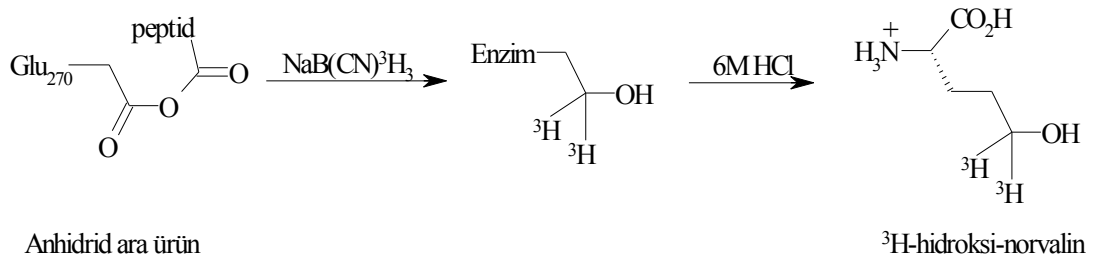
1,10-Fenantrolin

Şekil 2.25: Şelat yapıcı ajanlar

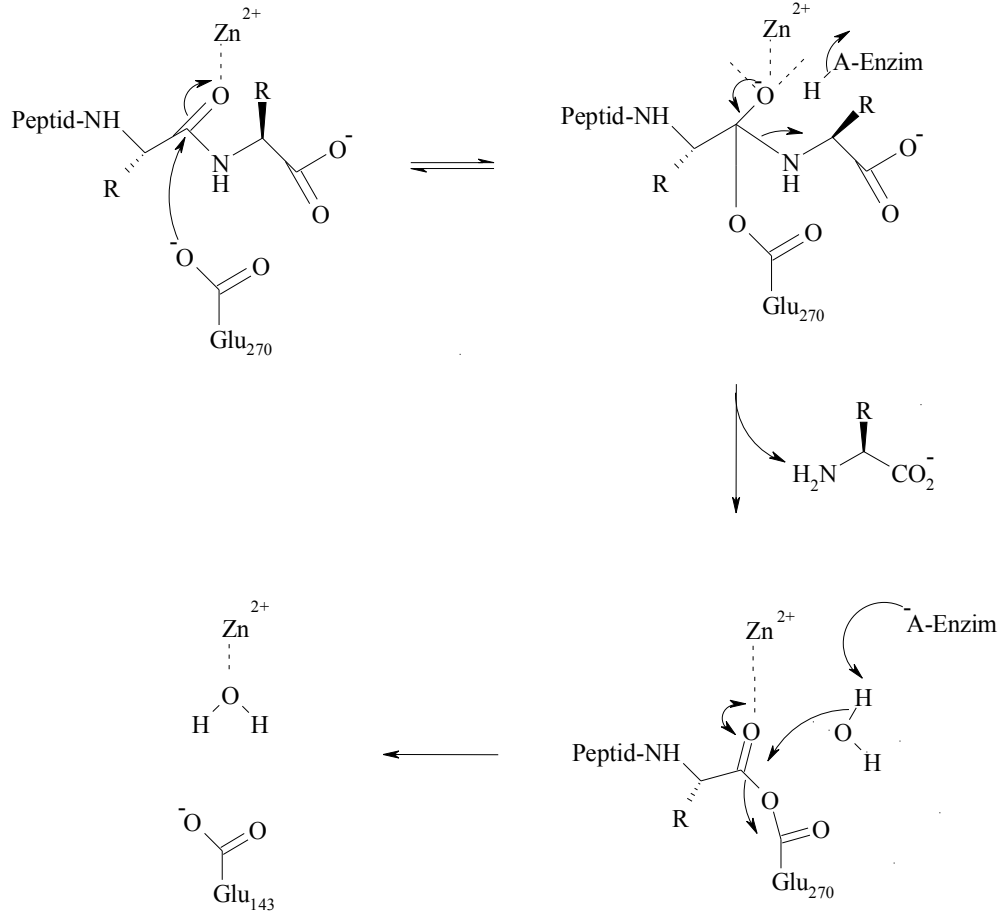
Karboksipeptidaz A ve termolizinin aktif bölgesindeki çinko iyonu iki imidazol grubu ve glutamat yan zinciri ile şelat oluşturur. Karboksipeptidaz A'daki Arg¹⁴⁵ ve Tyr²⁴⁸ substrat ile hidrojen bağları oluştururken su molekülünde çinko iyonuna bağlanır [21].

Metaloproteazlar sınıfında en iyi karakterize edilen bir diğer enzim karboksipeptidaz A sığır pankreası tarafından üretilen 307 amino asitlik bir ekzopeptidazdır ve peptid zincirinde arjinin, lizin ve prolin dışındaki C-terminal kalıntıyı hidrolizler.

Her iki enzim tarafından gerçekleştirilen amid bağı hidrolizinin katalitik mekanizması çok iyi bir şekilde çalışılmıştır. Yine her iki enzim de aktif bölgesinde glutamat bulundurur ki bu kalıntı teorik olarak ya amid karbonil grubuna atak yapan nükleofil gibi ya da atak yapan su molekülünden proton alarak baz gibi davranır. X-ışınları kristalografik çalışmalarında karboksipeptidaz A'daki glutamatın (Glu²⁷⁰) karbonil grubundan 2.5 Å uzaklıkta olduğunu bu uzaklığında adı geçen kalıntının nükleofil gibi etkimesi için en uygun mesafede bulunduğunu göstermiştir. Glu²⁷⁰ in amid substratına saldırısı sonucu anhidrid ara ürün oluşur. Substrat varlığında karboksipeptidaz A'nın trityum içeren sodyum siyanoborohidrid (NaB(CN)³H₃) ile muamelesinde ³H'in proteine bağlandığı ve ³H-hidroksinorvalin'in anhidrid ara ürünü bulduran modifiye enzimde izole edildiği görülmüştür (Şekil 2.26) [6]. Karboksipeptidaz-A için önerilen katalitik etki mekanizması şekil 2.27'de verilmiştir.

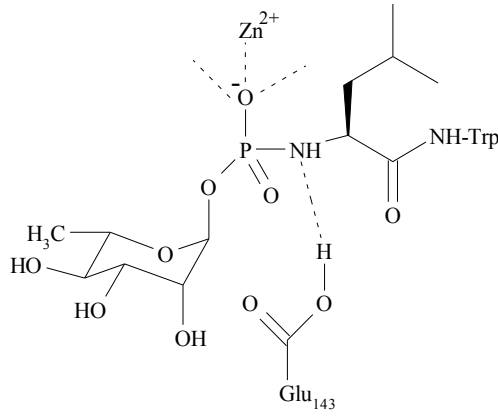


Şekil 2.26: Sodyum siyanoborohidrid'in karboksipeptidaz A'da tutuklanması



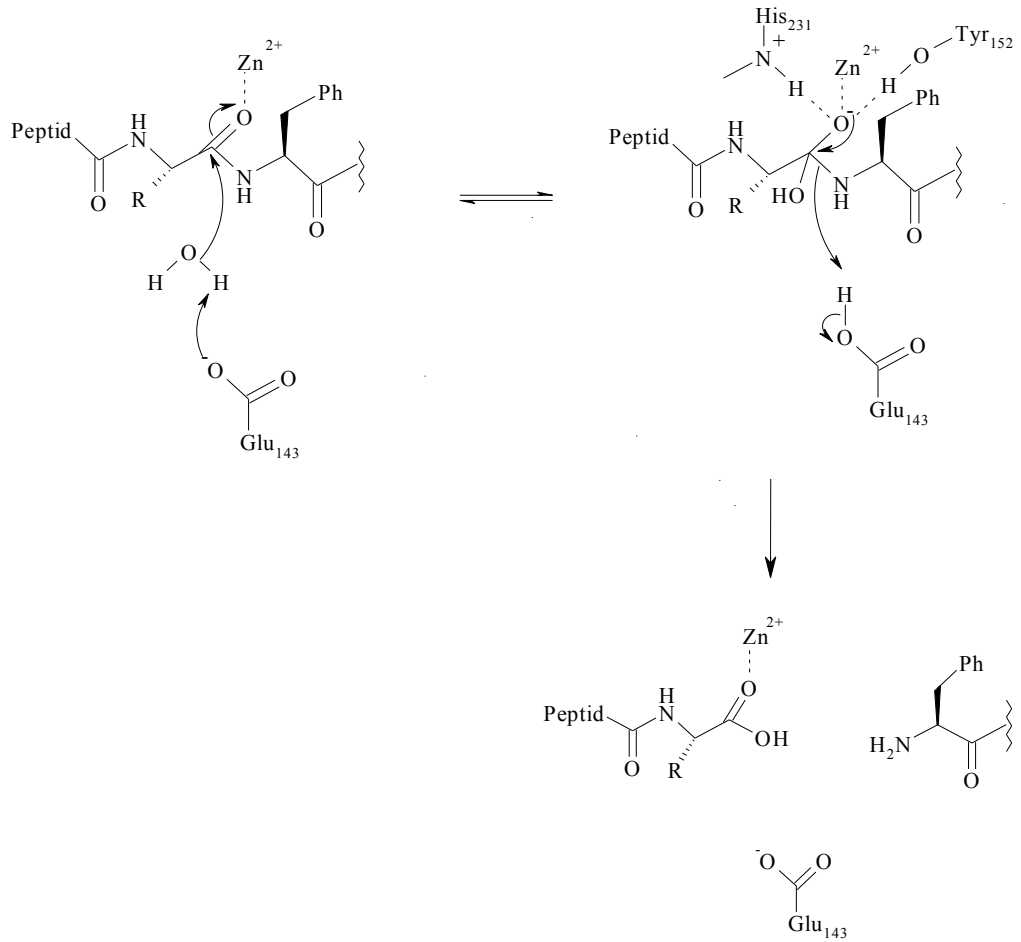
Şekil 2.27: Karboksipeptidaz-A için önerilen katalitik etki mekanizması

Termolizinin aktif bölgesinde bulunan glutamatın (Glu¹⁴³) karbonyl grubundan 3.9 Å uzaklıkta bulunduğunu bu uzaklığında adı geçen kalıntının nükleofil olarak davranabilmesi için çok uzak bir mesafe olduğu tespit edilmiştir. X-ışınları kristalografik çalışmalarında Glu¹⁴³'ün baz gibi etkiyerek atak yapan su molekülünü deproton ettiği ve spesifik hidrojen bağları ile stabilizasyonu sağlanarak oksianyon ara ürününün oluştuğu anlaşılmıştır. Glu¹⁴³'den protonun ayrıldığı azota transferi ile ara ürün bozunur ve hidroliz ürünleri oluşur. Termolizin fosfonamidat fonksiyonel grubu bulduran monosakkarit türevli fosforamidon tarafından kuvvetli bir şekilde inhibe edilir (Şekil 2.28).



Şekil 2.28: Termolizinin fosforamidon tarafından inhibisyonu (Trp, triptofan)

Fosfonamidat grubu aktif bölgedeki Zn²⁺'ye bağlanır oksanyon tetrahedral ara ürünün analoğu gibi davranır ve bu sebeple de enzim tarafından çok sıkı bir şekilde tutulur. Termolizinin için önerilen katalitik mekanizma şekil 2.29'da verilmiştir [6].



Şekil 2.29: Termolizinin için önerilen katalitik etki mekanizması

2.3. Proteazların Fizyolojik İşlevleri

Tüm canlı hücreler proteinlerin sentezi ve degradasyonunun sürekliliği ile belirli bir protein dönüşüm oranını korur. Hücre içi proteazlar hücrede uygun protein dönüşümü yapmaya olan katkılarıyla bilinirler. *Escherichia coli*'de lon geni tarafından üretilen ATP-bağlı proteazlar anormal proteinlerin hidrolizinden sorumludur.

Bakterilerde sporların, mayalarda asko sporların, cıvık mantarlarda spor yapıların oluşumu ve funguslarda konidial boşalım olaylarının hepsi güçlü protein dönüşümünü gerektirir. Sporlanma için proteaz gereksinimi proteaz inhibitörlerinin kullanımıyla kanıtlanmıştır. Maya diploidlerinde asko spor oluşumunun proteaz A aktivitesindeki artışa bağlı olduğu gösterilmiştir.

Enzimlerin proteolitik inaktivasyonu hücre içi katalitik aktivitenin tersinmez olarak kaybına neden olur ve fizyolojik olarak önemli bir olaydır. Proteazlar büyük polipeptidlerin daha küçük peptidlere ve amino asitlere hidrolizine yardımcı olurlar böylelikle onların hücre tarafından absorpsiyonunu kolaylaştırırlar. Hücre dışı enzimler onların depolimerleşme aktivitesinden dolayı beslenmede büyük bir rol oynar.

Proteazlar aracılığıyla gen ekspresyonunun modülasyonu kanıtlanmıştır. *Bacillus thuringiensis* RNA polimerazının β alt biriminin transkripsiyonel spesifitesindeki bir değişme onun proteolitik modifikasyonu ile düzeltilir [3].

2.4. Proteaz Kaynakları

Proteazlar yaşayan organizmalar için fizyolojik olarak gerekli olduklarından bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi çeşitli kaynaklardan geniş bir dağılım ile elde edilebilirler [23]. Proteaz kaynakları; bitkisel (papain, bromelain, keratinaz, fisin), hayvansal (tripsin, kimotripsin, pepsin) ve mikrobiyal (bakteri, mantar, virüs) kaynak olmak üzere üç gruba ayrılırlar [3]. Proteazların bitki ve hayvansal kaynakların birçoğunda elde edilmesi mümkün olmakla birlikte gelişen teknolojiye paralel olarak gelişen mikrobiyal fermentasyon prosesinin daha ekonomik olması nedeniyle

mikrobiyal kaynaklı enzimlere talep artmıştır [24]. Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanılmasını bitkinin yetiştiği iklim koşulları, kültivasyon toprağının uygunluğu gibi farklı faktörler belirler. Bunun yanında bitki tarafından proteazın üretilmesi zamana bağlı bir süreçtir. Papain, bromelain, keratinaz ve fisin en iyi bilinen bitki kaynaklı proteazlardır [3].

Papain geleneksel bir bitki proteazı olup uzun yıllardır kullanılan bir enzimdir. Enzim Batı ve Orta Afrika ile Hindistan'ın alttropikal bölgelerinde yetişen *Carica papaya* meyvesinin öz suyundan izole edilir. Farklı proteinaz ve peptidaz izoenzimlerinin varlığı nedeni ile enzimin ham preparatı geniş bir spesifiteye sahiptir. Enzimin performansı bitki kaynağına, yetiştiği iklim koşullarına, ekstraksiyonu ve saflaştırılması için kullanılan metodlara bağımlılık gösterir. Enzim pH 5-9 arasında aktif ve 80-90°C'ın üzerindeki sıcaklıklarda stabildir. Enzim yüksek çözünürlüğe sahiptir ve tatlandırılmış protein hidrolizatlarının hazırlanmasında kullanılır [3]. Enzimin kimyasal olarak modifiye edilmiş alkali proteolitik enzimler ile birlikte deterjanlarda kullanılması 1995'li yıllarda patent altına alınmıştır. Enzimin alkali deterjan çözeltilerinde aktivitesinin büyük bir kısmını kaybetmesi nedeni ile bu çözeltilerdeki kullanımına dair fazla bir bilgi yoktur. Enzimin aktif bölgesinde sistein-25 yer alır. Enzimin stabilizasyonu için Khaparde ve arkadaşları tarafından yapılan süksinilasyon çalışmasında süksinik anhidrit enzimdeki lizin artığının ϵ -amino grubu ile tepkimeye sokularak enzimdeki lizin artığının hidrofobik metilen zinciri maskelenmiş böylelikle hidrofobik zincirin su ile istenmeyen etkileşimlere girmesi önlenerek enzimin stabilizasyonu sağlanmıştır [25].

Bromelain, 1892'de Chittenden adlı bir araştırmacı tarafından ananas öz suyunda proteolitik enzim varlığının keşfi ile tanımlandı ve "bromelain" olarak isimlendirildi. Daha sonra "bromelain" terimi kullanılmış ve orjinal olarak *Bromeliaceae* bitki ailesinin üyesi bir proteaz olarak tanımlanmıştır. Bromelain ilk kez terapötik destek olarak 1957'de tanıtıldı [26] ve o zamandan beri bilimsel literatürde yerini almış 600'den fazla araştırma makalesiyle birçok hastalığa önemli faydaları olduğu kanıtlanmıştır. Bromelain vücuttaki proteinleri ayrıştırıcı-sindirici bir enzimdir. Dolayısıyla enzimin ilk fark edilen özelliği sindirimi veya hazmı kolaylaştıran bir molekül olmasıdır. Bu yüzden gıda sanayinde ve bazı kültürlerde et yumuşatıcı

olarak kullanılmaktadır. Bromelain ananas bitkisinin sap ve gövdelerinden elde edilmektedir. Bu enzim sadece mide asidine yardımcı olmakla kalmayıp aynı zamanda bağırsaklardaki alkalen ortama da olumlu etkiler yapmaktadır. Bu nedenle sindirim sistemi enzimlerinden pepsin ve tripsin'in yerine geçen enzim gibi düşünülür [27]. En büyük üreticisi Great Food Biochem., Bangkok, Tayland'dır. Sistein proteaz olarak karakterize edilen enzim pH 5-9 arasında aktiftir. İnaktivasyon sıcaklığı 70°C olup papainin inaktivasyon sıcaklığından düşüktür [3].

Keratinaz ; saçı degrede eden bu enzim botanik grubundaki bazı bitkiler tarafından üretilir. Saç ve yünün parçalanması lizin gibi esansiyel amino asitlerin üretilmesi açısından önemlidir. Atık su sistemlerinde bulunan bu tür doğal atıkların parçalanması açısından da bu enzim önemlidir [3].

Fisin; incir sütünden izole edilen papain ve bromelaine benzer aktif bölge yapısına sahip bir sülfhidril proteazdır. Fisin yüksüz ve aromatik amino asitler içeren bağlarda etkili olup optimum pH'sı 6.5'tur ve pH 4-9.5 arasında etkilidir. Fisin antik çağda peynir mayası olarak sütün pıhtılaştırılmasında kullanılmıştır. Endüstride biracılık, et, yem ve deniz ürünlerinde kullanılır [28].

Proteaz kaynaklarının ikinci büyük grubunu hayvansal proteazlar oluştururlar. En çok bilinen hayvansal kaynaklı proteazlar pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve renindir. Adı geçen proteazların peptid bağında etki ettikleri noktalar tablo 2.8'de verilmiştir [3]

Tablo 2.8: Hayvansal proteazların spesifitesi [3]

Enzim	Kesilen peptid bağı*
Tripsin	Lys (yada Arg)-----
Kimotripsin, subtilizin	Trp (yada Tyr, Phe, Leu)-----
Pepsin	Phe (yada Tyr,Leu)---Trp (yada Phe,Tyr)
Elastaz	Küçük nötral residüler (Ala, Gly, Val)

* Noktalı çizgiler proteazın etki ettiği noktayı göstermektedir

Tripsin gıda proteinlerinin hidrolizi için gerekli intestinal sistem ana sindirim enzimidir. Serin proteazdır ve lizin ve arjininden sonraki karboksil gruplarından peptid bağımlı hidrolizler (Tablo 2.8). Tripsin, (EC 3.4.21.4 ve M_r 23300 Da)

pankreasın salgılanan ince bağırsakta proteinleri parçalayıcı özelliğe sahip sindirim enzimidir. Enzimatik mekanizması diğer serin proteazlara benzer. Aktif bölgesinde katalitik triada bir serin nükleofili vardır. Kataliz serinin çevresindeki diğer amino asitlerin elektrostatik modifikasyonu ile başlar. Tripsinin optimum pH'sı yaklaşık 8 optimum sıcaklığı da yaklaşık 37°C'dir. Tripsin inaktif zimogen (tripsinojen) şeklinde pankreasta üretilip ince bağırsağa salgılanır ve orada enteropeptidazlar proteolitik parçalanmayla tripsinin aktivasyonunu başlatır daha sonra tripsin kendi kendini aktive eder. Bu aktivasyon mekanizması çoğu serin proteazlar için geneldir ve pankreasın kendi kendini sindirmesini önlemek için gereklidir. Tripsin bir serin endopeptidazdır ve peptid bağlarını lizin ve arjinin rezidülerinden sonraki karboksil gruplarından hidrolizler. Tripsin aktivitesi kimotripsini inaktive eden TPCK (tosil fenilalanil klorometil keton) inhibitörü tarafından etkilenmez. Tripsin bakteriyel ortamın hazırlanmasında ve bazı özel tıbbi uygulamalarda kullanılır. Enzimin oluşturduğu protein hidrolizatlarının acı tada sahip olmaları nedeni ile gıda endüstrisinde tripsin kullanım alanları sınırlıdır.

Kimotripsin, (EC 3.4.21.1 ve M_r 23800 Da) proteolizi gerçekleştirebilen hayvansal pankreatik ekstraktlarında bulunan sindirim enzimidir. Bir serin proteazdır ve peptid bağlarını fenilalanin, tirozin ve triptofan rezidülerinden sonraki karboksil gruplarından hidrolizler. Kimotripsinojen prekürsörü şeklinde pankreasta depolanır ve çok adımlı bir süreçte tripsin tarafından aktive edilir. Saf kimotripsin pahalı bir enzimdir ve yalnızca diagnostik ve analitik uygulamalarda kullanılır. Süt protein hidrolizatlarının deallerjenasyonunda çok kullanılır [3].

Pepsin (EC 3.4.23.1 ve M_r 34500 Da) gıda proteinlerini peptidlere parçalamak için hemen hemen tüm omurgalıların midelerinde ana hücreler tarafından salgılanan asidik proteazdır. Pepsin 1836'da Theodor Schwann tarafından keşfedildi ve keşfedilen ilk hayvansal enzimdir. Aktif enzim onun zimojen formundan (pepsinojen, hidroklorik asit varlığında kendiliğinden katalizi ile) salınır. Pepsin bir aspartil proteazdır ve pH 1-2 arasında optimum aktivite gösterir, pH 6'nın üzerinde inaktive olur ve iki hidrofobik amino asit arasındaki peptid bağlarının hidrolizini katalizler.

Renin (rennet, kimosin, EC 3.4.23.4 ve M_r 30700) anne sütünü sindirmek için her bir memelinin midesinde üretilen doğal kompleks bir enzimdir. Renin sütü pıhtılaştırıcı proteolitik bir enzim içerir. Hayvansal bazlı rennet için en yaygın kaynak yeni doğan sütle beslenmiş buzağının kesilen şirdenidir. Pepsine benzer proteazdır ve bütün süt veren memelilerin midelerinde inaktif pro-renin prekürsörü olarak bulunur. Pepsinin işleviyle ya da kendi kendine katalizle aktif renine dönüşür. Süt endüstrisinde süt kazeininin çöktürülmesinde çok kullanılır. Çözünmez para- κ -kazein ve C-uçlu glikopeptid yaratmak için κ -kazeindeki tek bir peptid bağınyı ayırma spesifisitesi ile özelleşmiş doğal enzimdir ve stabil hoş kokulu lor üretimi için süt endüstrisinde kullanılır [3].

Üçüncü grup proteaz kaynağı bakteri, fungus, maya ve virüs orijinli olan mikrobiyal proteazlardır. Bitkisel ve hayvansal proteazlara dünya çapında oluşan talep nedeni ile ihtiyacın karşılanması için mikrobiyal proteazlara olan ilgi artmıştır. Mikroorganizmalar sahip oldukları geniş biyokimyasal çeşitlilik ve genetik manipülasyonlara duyarlılıkları nedeni ile mükemmel enzim kaynakları haline gelmişlerdir. Mikrobiyal proteazlar dünya çapındaki enzim satışının yaklaşık % 40'ını karşılarlar. Mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamalar için hemen hemen tüm karakteristiklerinin istenilen yönde değiştirilebilmesi mümkün olduğundan mikrobiyal kaynaklı proteazlar bitki ve hayvansal kaynaklı proteazlara tercih edilmektedirler [3].

Mikrobiyal proteazlar asidik, nötral ve alkali koşullar altında aktivite göstermelerine ya da enzimin aktif bölgesindeki grup karakteristiğine göre sınıflandırılabilirler. Ayrıca mikrobiyal kaynaklı proteazlar kendi aralarında aktif bölgedeki grup karakteristiğine göre metallo-(EC. 3.4.24), aspartik-(EC. 3.4.23), sistein ya da sülfidril-(EC.3.4.22) ve serin-(EC.3.4.21) proteazlar olmak üzere sınıflandırılırlar [23].

Bakteriyel kaynaklı proteazlar arasında en çok kullanılan ticari nötral ve alkali proteazlar *Bacillus* cinsi organizmalar tarafından üretilirler. Bakteriyel nötral proteazlar pH 5-8 aralığında aktiftirler ve bağıl olarak düşük termotoleransa sahiptirler. Gıdaları hidrolizlediklerinde hidrolizatlarında daha az acı tat

oluşturduklarından gıda endüstrisinde hayvansal proteazlara tercih edilirler. Nötraz olarak da bilinen nötral proteazlar doğal bitki proteaz inhibitörlerine karşı duyarsızdırlar ve bu sebeple de fırıncılık endüstrisinde kullanılırlar. Bakteriyel nötral proteazlar hidrofobik amino asit çiftlerine karşı sahip oldukları yüksek afinite ile karakterize edilirler. Sahip oldukları düşük termotoleransları gıda hidrolizatlarının üretimi sırasında reaktivitelerinin kontrolü için avantajlıdır. Bazı nötral proteazlar metalloproteazlar grubuna üyedirler ve aktivite gösterebilmek için iki değerlikli metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Serin proteazlar şelat yapıcı ajanlardan etkilenmezler.

Bakteriyel alkali proteazlar pH 10 gibi yüksek alkali pH değerlerinde sahip oldukları yüksek aktiviteleri ile karakterize edilirler ve geniş bir substrat spesifitesine sahiptirler. Optimal sıcaklıkları 60°C civarındadır. Bakteriyel alkali proteazların bu özellikleri onları deterjan endüstrisi tarafından kullanılmalrı için uygun kılar [3]. Alkali proteaz üreticisi olan *Bacillus* türleri tablo 2.9’da verilmiştir [29].

Tablo 2.9: Alkalen proteaz üreticisi *Bacillus* türleri [29]

<i>Bacillus</i> türleri ve suşları
<i>Bacillus alcalophilus</i> ATCC 21522
<i>B. alcalophilus</i>
<i>B. alcalophilus</i> subsp. <i>halodurans</i> KP1239
<i>B. amyloliquefaciens</i>
<i>B. circulans</i>
<i>B. coagulans</i>
<i>B. firmus</i>
<i>B. intermedius</i>
<i>B. lentus</i>
<i>B. licheniformis</i>
<i>B. proteolyticus</i>
<i>B. pumilus</i>
<i>B. sphaericus</i>
<i>B. subtilis</i>
<i>B. subtilis</i> var. <i>amylosacchariticus</i>
<i>B. thuringiensis</i>

Gram-negatif bakterilerin bazıları da alkali proteaz üreticisi olarak tanımlanmışlardır. Bu gruba örnek olarak *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas maltophila*, *Xanthomonas maltophila*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio metschnikovii* türleri verilebilir. *Bacillus* cinsine benzer cinse sahip olan spiral şekilli Gram-pozitif bakteri *Kurthia spiroforme*’de alkali proteaz üreticisidir.

Mantarlar bakterilerden daha geniş kapsamlı enzim üreticileridirler. Örneğin; *Aspergillus oryzae* asit, nötral ve alkali proteazları birlikte üretir. Ayrıca fungal proteazlar pH 4-11 gibi geniş bir pH aralığında aktivite gösterirler. Bakteriyel kaynaklı enzimler ile karşılaştırıldıklarında bakteriyel enzimlerden daha düşük reaksiyon hızına ve daha kötü bir termotoleransa sahiptirler. Fungal enzimler katı-hal fermentasyon süreci ile üretilirler. Fungal asit proteazlar pH 4-4.5 arasında optimal pH'ya sahip olmalarına rağmen pH 2.5-6.0 arasında stabildirler. Bu enzimler özellikle peynir üretim endüstrisinde dar pH ve sıcaklık spesifiteleri nedeni ile tercih edilirler. Fungal nötral proteazlar ya da metalloproteazlar pH 7.0'de aktifirler ve şelat yapıcı ajanlar tarafından inhibe edilirler. Besin protein hidrolizatlarının acılığının azaltılmasında kullanılırlar. Fungal alkali proteazlar ise genellikle gıda proteinleri modifikasyonlarında kullanılırlar [3]. *Aspergillus* türleri ise özellikle detaylı olarak çalışılan fungal proteaz üreticisidirler. Fungal türler tarafından üretilen alkali proteazlar tablo 2.10'da verilmiştir [29].

Tablo 2.10: Alkalen proteaz üreticisi bazı fungus türleri [29]

Fungal türler
<i>Aspergillus flavus</i>
<i>A. fumigatus</i>
<i>A. melleus</i>
<i>A. niger</i>
<i>A. oryzae</i>
<i>A. sydowi</i>
<i>Cephalosporium</i> sp. KSM 388
<i>Chyrysosporium keratinophilum</i>
<i>Conidiobolus coronatus</i>
<i>Fusarium graminearum</i>
<i>Paecilomyces marquandii</i>
<i>P. lilacinus</i>
<i>Penicillium griseofulvin</i>
<i>P. liliacinum</i> No.2093
<i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Scedosporium apiospermum</i>
<i>Tritirachium album</i> Limber

Alkali proteaz üreticisi mayalar *Candida hypolitica*, *Yarrowia hypolitica* ve *Aureobasidium pullulans*'dır. Bununla birlikte literatürde alkalifilik aktinomisetler ile ilgili çok az çalışmaya rastlanmaktadır. Alkali proteaz üreticisi olduğu bildirilen farklı *Streptomyces* türleri arasında *Streptomyces rectus* var. *proteolyticus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces moderatus* NRRL 3150, *Streptomyces diastaticus* SS1, *S. corchorusii* ST36 ve *S. pactum* DSM 40530 vardır. Alkalifilik

aktinomisetlerin diğ er tipleri içinde *Nocardiosis dassonvillei* ve *Oerskovia xanthineolytica* örnekleri verilebilir [29]. Viral proteazlar özellikle virüs prot enlerine olan hassasiyetleri dolayısıyla önemlidirler. Viral proteazlar viral replikasyon ve birleşimi koordine etmek ve düzenlemek için optimize edilmişlerdir. Yapılan araştırmalarda viral proteazların üç boyutlu yapısı ve sentetik inhibitörler ile etkileşimi odak noktası olmuştur. Serin, aspartik ve sistein peptidazlar değişik virüslerde bulunurlar. Virüs orijinli peptidazların hepsi endopeptidazlardır [3].

2.5. Üretim

2.5.1. Alkalifilik mikroorganizmalar

Bütün mikroorganizmalar optimal büyüme için pH'ya bağımlılık gösterirler ve büyük bir kısmının pH bağımlılığı nötr veya nötr pH'ya yakın bölgelerdedir. pH aralığı nötr pH değerlerinin üzerine çıktıkça bu pH değerlerinde büyüeyebilen mikroorganizma sayısı azalır. Yüksek alkali çevrelerde büyüeyebilme yeteneğine sahip olan mikroorganizmalara alkalifilik mikroorganizmalar denir. Alkalifilik mikroorganizmalar alkali proteaz aktivitesi gösterirler ve bu mikroorganizmalar sodalı topraklar, göller ve çöller gibi doğal alkali çevrelerde yaşayan ekolojik ve kimyasal yaklaşımları detaylı olarak çalışılmış mikroorganizmalardır. Adı geçen doğal ortamların pH değerleri 10 ya da üzerindedir [29].

Alkalifilik mikroorganizmalar kendi arasında da alkalifilik ve alkalitolerant olmak üzere iki büyük gruba ayrılır. Alkalifil tanımlaması pH 10 üzerinde büyüeyebilen optimal büyüme pH'sı 9 olan pH 7 ve daha düşük pH değerlerinde büyümeleri imkansız olan mikroorganizmalar için kullanılır. Diğ er yandan pH 10 civarında büyüme yeteneğine sahip buna karşılık optimal büyüme pH'sı nötral pH civarında olan grupta alkalitolerantlar olarak tanımlanırlar. Ekstrem alkalifiller kendi aralarında da fakültatif ve zorunlu alkalifiller olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. Fakültatif alkalifiller pH 10 ve üzeri pH değerlerinde optimal büyüme gösterirler fakat nötral pH'da da iyi bir şekilde büyüeyebilirler. Zorunlu alkalifiller ise nötral pH değerlerinde büyüme yeteneğine sahip değildirler [31].

2.5.2. Alkalen proteaz üretimi

Alkalifilik mikroorganizmaların büyük bir kısmı alkalen proteaz üretirken önemli olanları istenen ve yüksek miktarda ürün üreten organizmalardır. Bu organizmalar ile yapılan üretimlerde esas olan optimal üretim koşullarında artan miktarlarda enzim üretimidir. Alkalen proteazın endüstriyel üretiminde ortam kompleks karbohidratlar, proteinler ve diğer ortam bileşenleri ile desteklenir. Teknolojik üretimler alkalen proteaz ürününün geliştirilmesi, fermentasyon ortamı ve ürün koşullarının optimizasyonu ile ekonomik anlamda daha makul üretimler için geliştirilmektedir.

Mikrobiyal fermentasyon proseslerinde soyun geliştirilmesi ticari anlamda anahtar rol oynar. Vahşi türlerin sınırlı miktarlarda istenen enzimi üretmesi ticari uygulamalarda genellikle kullanışlıdır. Bununla birlikte birçok durumda spesifik ortamda kültürün yayılması gibi basit seçim metodlarının uygulanması vasıtası ile üründe dikkate değer artışlar elde edilebilir [29].

Endüstriyel kullanım amaçlı alkalen proteaz enzimi üretimi bakteri ya da mantar gibi farklı kaynaklardan yapılır. Endüstriyel uygulamalarda proteazların kullanılmasının fizibilitesi bazı faktörlere bağlıdır. Jonsson ve Martin [30] 1965'te mantar kültürleri ile yaptıkları çalışmalarda proteaz üretiminin büyük oranda kullanılan kültür ve ortam koşullarına bağlı olduğunu bulmuşlardır. Buna bağlı olarak da ticari anlamda yüksek miktarlarda proteaz eldesi fermentasyon ortamının optimizasyonu ile ilgilidir. Organik ve inorganik azot kaynakları, metal iyonları, sürfaktanlar, fungusidler ve fenolik bileşiklerin proteaz üretimine etkisi de 1992 yılında Banerjee ve Bhattacharya [31] tarafından fungal *Rhizopus oryzae* 'den izole edilen alkalen proteaz enzim üretimi üzerinde çalışılmıştır. Organik azot proteaz üretimi üzerinde en iyi sonucu vermekle birlikte ekonomik olması açısından alkalen proteazın endüstriyel üretimleri için inorganik tuzları tercih edilmektedir. % 0.2 sodyum nitrat miktarı en iyi tuz konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Metal iyonları (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Ag^{3+} , Pb^{2+} , Hg^{2+}) ve sürfaktanlar (Tween 80, SDS, Triton X-100) proteaz üretimi için indirgeyici etkiye sahip iken fungusidler ve fenolik bileşikler inhibitör etkisi yaratmaktadırlar [7].

2.6. Alkalen Proteazların Özellikleri

2.6.1. Optimum pH ve sıcaklık

Alkalen proteazların optimum pH aralığı genellikle pH 9-11 arasında olmakla birlikte optimum pH değerleri pH 11.5, pH 11-12, pH 12.3 ve pH 12-13 olan birkaç istisna durumda vardır. Yüksek izoelektrik nokta değerlerine sahiptirler ve genellikle pH 6-12 arasında stabildirler. Alkalen proteazların optimum sıcaklık değerleri 50-70°C arasındadır. Alkalifilik *Bacillus* sp. B 18' den izole edilen enzim istisna olarak 85°C gibi yüksek bir optimum sıcaklık değerine sahiptir. *Bacillus*, *Streptomyces* ve *Thermus* cinslerinden izole edilen alkalen proteazlar da yüksek sıcaklıkta bir miktar termostabilite göstermekle birlikte ortama Ca^{2+} iyonlarının ilavesi ile enzim termostabilitesinde artışlar gözlenir [29].

2.6.2. Moleküler ağırlıklar

Alkalen proteazların molekül ağırlıkları 15-30 kDa aralığında değişmekle birlikte birkaç yayında 31.6 kDa, 33 kDa, 36 kDa ve 45 kDa gibi daha yüksek moleküler ağırlığa sahip olan enzimlerin var olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, *Kurthia spiroforme*'den izole edilen enzimin 8 kDa gibi çok düşük molekül ağırlığına sahip olduğu da bilinmektedir. Bazı *Bacillus* cinslerinden izole edilen alkalen proteazların çoklu alt birimlere sahip olduğu gözlenmiştir. Bu enzimlerin çoklu alt birimleri protein molekülündeki glutamin ya da asparagin kalıntılarının dönüşümsüz deaminasyonu gibi enzimatik olmayan bir yolla ya da protein molekülünün otoproteolizi ile oluşur [29].

2.6.3. Metal iyonu ihtiyacı ve inhibitörler

Alkalen proteazlar maksimum aktivite için Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} gibi iki değerlikli metal iyonları ya da bu metal iyonlarının kombinasyonlarına ihtiyaç duyarlar. Bu kationlar enzimi termal denatürasyona karşı korurlar ve yüksek sıcaklıklarda enzimin aktif konformasyonunun korunmasında hayati öneme sahiptirler.

İnhibisyon çalışmaları enzimin doğası, aktif merkezinin yapılanması ve enzimin kofaktör ihtiyacı konusunda bilgi verir. Alkalen proteazlar fenilmetilsülfonil florür (PMSF) ve diizopropil florofosfat (DFP) ile komple inhibe edilirler. PMSF aktif bölgedeki serin kalıntısı için özgün bir inhibitördür ve ilavesi durumunda enzim aktivitesindeki komple kayıp gözlenir. Bu inhibisyon tipine uyan enzimler serin proteazlar olarak tanımlanırlar. Ayrıca alkalen proteazların bazıları metal iyonuna ihtiyaç gösterdikleri için bu tip proteazlar EDTA gibi şelat yapıcı ajanların ilavesi ile birlikte aktivitelerini kaybederler [29].

2.6.4. Substrat spesifitesi

Alkalen proteazlar doğal proteinleri hidrolizledikleri başarı ile bazı sentetik substratları da hidrolizlerler. Alkalen proteazlar ve/veya subtilizinlerin kazeine karşı hemoglobin veya BSA'ya olduğundan daha aktif oldukları tespit edilmiştir. Enzim tirozin, fenilalanin ya da lösin gibi aromatik ya da hidrofobik amino asit kalıntılarına karşı da spesifik özellik gösterir [29].

2.6.5. Tez çalışmasında kullanılan *Bacillus marmariensis* GMBE 72 enziminin özellikleri

Bacillus marmariensis GMBE 72 enziminin kimotripsin benzer serin alkalen proteaz olduğu belirlenmiştir. Molekül ağırlığı 26.4 kDa, optimum pH'sı 11, optimum sıcaklığı 60°C'dir. Enzim PMSF ile şiddetle inhibe olduğundan bir serin alkalen proteazdır.

2.7. Proteazların Endüstriyel Uygulamaları

İdeal deterjan proteazlar yiyecek, kan ve diğer vücut salgularından dolayı lekelerin büyük bir kısmının uzaklaşmasını kolaylaştırmak için geniş substrat spesifitesine sahip olmalıdırlar. Bir deterjan içinde bir proteazın en iyi performansı için anahtar parametre onun pI'sıdır. Deterjan çözeltisinin pH'ı ile pI'sı birbirine uyumlu ise proteazın bu uygulama için çok uygun olduğu kabul edilir. Alkalifilik *Bacillus* cinsi tarafından üretilen Esperase ve Savinase T (Novo Endüstrisi) çok yüksek izoelektrik

noktaya sahip (pI 11) iki ticari proteazdır bu yüzden adı geçen enzimler daha yüksek pH değerlerine dayanabilirler. Son zamanlarda endüstride kullanılan bütün deterjan proteazlar *Bacillus* türleri tarafından üretilen serin proteazlardır. *Conidiobolus coronatus*'tan elde edilen bir alkalin proteazın Hindistan'da üretilen ticari deterjanlarda kullanıldığı belirtilmiştir [3]. *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen Subtilisin Carlsberg ve *Bacillus amyloliquefaciens* tarafından üretilen Subtilisin Novo'da deterjan formülasyonlarında kullanılan iki enzimdir. Her iki subtilisinde 27.5 kDa'luk molekül ağırlığına sahip olup birbirlerinden 58 amino asitlik farka sahip oldukları belirlenmiştir. Bu enzimler pH 8-10 aralığında maksimum aktivite göstermektedirler. Deterjan formülasyonlarında kullanılan enzimlerden beklenen özellikler arasında geniş bir pH aralığında aktif ve stabil kalabilmenin yanında 40-50°C sıcaklıkların üzerinde bile aktivite ve iyi bir stabilite, sürfaktanlar, parfümler ve beyazlatıcılar gibi deterjan içerikleri ile uyum gösterebilme ve farklı proteinleri hidrolizleyebilme yeteneği gibi özellikler aranmaktadır [74].

Deterjanlara alkalin proteaz ilavesinin amacı protein kökenli lekeleri %35-40 uzaklaştırarak temizleme etkisini arttırmaktır [32]. Bakterilerden özellikle yüksek sıcaklık ve pH'larda büyüyen bir *Bacillus* soyu tarafından üretilen proteaz enzimleri deterjanlara katkı maddesi olarak eklenerek sıcak su ile daha etkin temizlik sağlayarak yıkama olanağını vermektedir. Biyoteknolojide uygulama olanağı bulacağı düşüncesi termofilik enzimlere olan ilgiyi arttırmıştır. Dolayısıyla tekstil ve deterjan endüstrisinde özellikle termofilik ve alkalifilik mikroorganizmalar tarafından üretilen amilaz ve proteaz üreticisi olan *Bacillus* soylarının taranmasına, izolasyonuna ve nitelendirmesine yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır.

Deri prosesi sepileme, tabaklama, ıslatma ve kıl giderme gibi bazı adımlar içerir. Deri prosesinin geleneksel metodları kirlilik ve atık su problemleri yaratan sodyum sülfür gibi zararlı kimyasallar içerir. Bu kimyasallara alternatif olarak enzimlerin kullanımı çevresel kirliliği azaltmada ve deri kalitesindeki düzelmede başarılı olmuştur. Proteazlar derinin kollajen olmayan yapılarının seçimli hidrolizi ile globulinler ve albuminler gibi fibril yapıda olmayan proteinlerin uzaklaştırılmasında kullanılmıştır.

Gıda endüstrisinde proteazların kullanımı eski zamanlara dayanır. Proteazlar gıda endüstrisinde rutin olarak peynir yapımı, fırıncılık, soya hidrolizatlarının hazırlanması ve et yumuşatma gibi çeşitli amaçlar için kullanılır. Buğday unu fırıncılık prosesinin en büyük bileşenidir ve fırın hamurlarının özelliklerini belirleyen gluten olarak adlandırılan suda çözünmeyen bir protein içerir. *Aspergillus oryzae*'den elde edilen endo ve ekzoproteinazlar sınırlı proteoliz ile buğday glutenini modifiye etmek için kullanılır. Fungal proteazlar beyaz ekmek ve poğaçaların yapımında da başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Fungal proteazların aşırı miktarları ekmeği hamurumsu bir hale getirir. Enzim ilavesi özellikle sert hamurlar ve elastiki hamurlar için uygundur. Hamurun enzimatik muamelesi onun elle ve makine ile üretimini kolaylaştırır ve ürünlerin daha geniş bir aralıkta üretimine izin verir. Proteazların ilavesi artan somun hacimlerinde karışma zamanını yaklaşık % 25 oranında azaltmaktadır. Özellikle *Bacillus subtilis* bakteriyel proteazları kek, bisküvi ve kraker yapımında kullanılır. Bu proteazlar hamurların yumuşamasını geciktirmek için kullanılır ve özellikle kraker üretiminde çok önemlidir. Bakteriyel proteazlar hamurun kuvveti ve uzama kabiliyetini arttırmak için kullanılır [3].

Süt en az iki proteinaz içerir. Plazmin (alkalen süt proteinaz) ve katepsin D (asit süt proteinaz) ve olası diğer proteinazlar da iki tiyol proteinaz, trombin ve bir aminopeptidazdır. Aktivite koşulları ve teknolojik önemi dikkate alındığında plazmin en önemli doğal proteinazdır ve en ilgi çeken konu olmuştur [35, 36]. Süt endüstrisinde proteazların en büyük uygulaması peynir üretimindedir. Süt-pıhtılaştırıcı enzimler; Hayvansal peynir mayaları, mikrobiyal süt pıhtılaştırıcıları ve genetik olarak yapılmış kimozin olmak üzere üç ana kategoriye ayrılır. Hayvansal ve mikrobiyal süt-pıhtılaştırıcı proteazların her ikisi de asit aspartat proteazların bir sınıfına aittir ve moleküler ağırlıkları 30-40 kDa arasındadır. Peynir mayası sığırların şirdeninden ekstrakte edilir ve pepsin aktivitesi için en yüksek kimozin oranını içerir. Sütü pıhtılaştırmasının yanı sıra proteazlar kazeinin hidrolizinde, peynir olgunlaştırmasının hızlandırılmasında, peynirin göreceli özelliklerinin düzeltilmesinde ve tadın attırılmasında kullanılırlar. Buzağı renneti % 75-95 rennin (kimozin), % 5-25 pepsin içermektedir. Sığır renneti % 70-99 pepsin, % 1-9 rennin içermektedir. Buzağı rennini sınırlı proteolitik aktivitesiyle yüksek kazein koagüle edici yeteneğe sahiptir. Pepsin gibi diğer süt pıhtılaştırıcı proteazların birçoğundan

farklı olarak, rennin peynirin olgunlaştırma işlemine karışmaz. Aşırı olgunlaştırma, daha az lor verimine ve bazı acı peptidlerin birikmesine sebep olur. Rennin diğer tüm çöktürücülere nazaran standart bir süt pıhtılaştırıcı enzimdir. Süt pıhtılaştırıcı enzimler fenilalanin-metionin bağına hidrolizlerler. Koagülasyon genellikle kapa kazein misellerinin % 95'i veya daha fazlası hidroliz edildiğinde başlar. Mikrobiyal rennet proteazları buzağı rennetinden daha proteolitiklerdir.

Protein hidrolizatları küçük çocuklarda normal ve klinik gıda malzemelerine katkı maddesi ve tatlandırıcı ajanlar olarak sağlık ve diyet ürünlerinin oluşumu gibi bazı uygulamalara sahiptir. Protein hidrolizatlarının acı tadı onların gıda ve sağlık bakım ürünlerinde kullanımlarına büyük bir engel oluşturmaktadır. Acılığın yoğunluğu hidrolizat içindeki hidrofobik amino asitlerin sayısı ile orantılıdır. Peptid merkezindeki prolin kalıntılarının varlığı da acılığa katkıda bulunur. Prolin ve hidrofobik amino asitleri ayırabilen peptidazlar protein hidrolizatlarının acılığının giderilmesinde kullanılır. Laktik asit bakterilerinden elde edilen aminopeptidazlar Debitrase ticari adı altında mevcuttur. Karboksipeptidaz A hidrofobik amino asitlere yüksek spesifisiteye sahip olduğundan acılık giderme için büyük bir potansiyele sahiptir.

Yüksek içerikte iyi kaliteli protein içerdiklerinden dolayı soya fasulyeleri zengin bir besin kaynağı olarak işe yarar. Proteazlar diğer soya ürünleri ve soya sosu hazırlamak için eski zamanlardan beri kullanılmıştır. Fungal alkalen ve nötral proteazlar soya sosu prosesinde önemli bir rol oynar. Soya proteinlerinin proteolitik modifikasyonu onların fonksiyonel özelliklerini düzeltmeye yarar. pH 8'de alkalaz ile soya proteinleri muamelesi yüksek çözünürlük, iyi protein ürünü ve düşük acılıкта çözünür hidrolizatlar ile sonuçlanır.

Yapay tatlandırıcılar olarak aspartam kullanımı gıda ve ilaç yöneticileri tarafından uygun görülmüştür. Aspartam L-aspartik asit ve L-fenilalanin metil esterinin birleşimi olan bir dipeptiddir. İki amino asidin L-konfigürasyonu aspartamin tatlı tadından sorumludur. *Bacillus thermoprotolyticus* tarafından üretilen termolizinin immobilize hazırlanışı aspartamın enzimatik sentezinde kullanılır.

Proteazların geniş spesifisitesi ve çeşitliliği tedavi edici ajanların gelişiminde büyük bir avantaj olarak kullanılır. Subtilizin ya da kollejenaz yanık ve yara tedavisinde

antibiyotiklerle kombinasyonu ile kullanılır. *Escherichia coli*'den izole edilen Asparaginaz lenfositik lösemilerin çeşitli formlarında kan akışından asparagini elimine etmek için kullanılır [3].

2.8. Tez Çalışmasında Kullanılan Kinetik ve Termodinamik Bağlılar

2.8.1. K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi için Michaelis-Menten denklemi

Bacillus marmariensis GMBE 72 alkalin proteaz enzimi ile kazein hidrolizinde enzimin K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi için yatışkın hal (steady-state) yaklaşımına göre türetilmiş ve başlangıç hızı koşullarında geçerli aşağıda yazılı Michaelis-Menten denklemi (2.1) ve onun resiprokal formu (2.2) kullanılmıştır [35].

$$v = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (2.1)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (2.2)$$

Bu denklemlerde :

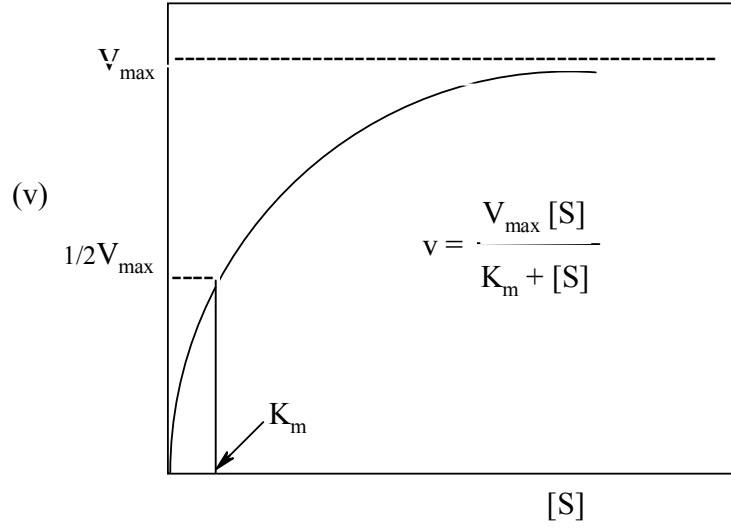
v : 30°C'de ve pH 10.5'da ölçülen kazein hidroliz reaksiyonunun başlangıç hızını ($U \text{ ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$)

[S]: 50 mM pH 10.5 NaOH-Glisin-NaCl tamponu çözeltisi içinde çözünmüş kazeinin başlangıç konsantrasyonunu (mg ml^{-1}),

K_m : Kazein hidrolizi için belirlenen koşullarda enzimin Michaelis-Menten sabitini (mg ml^{-1} kazein),

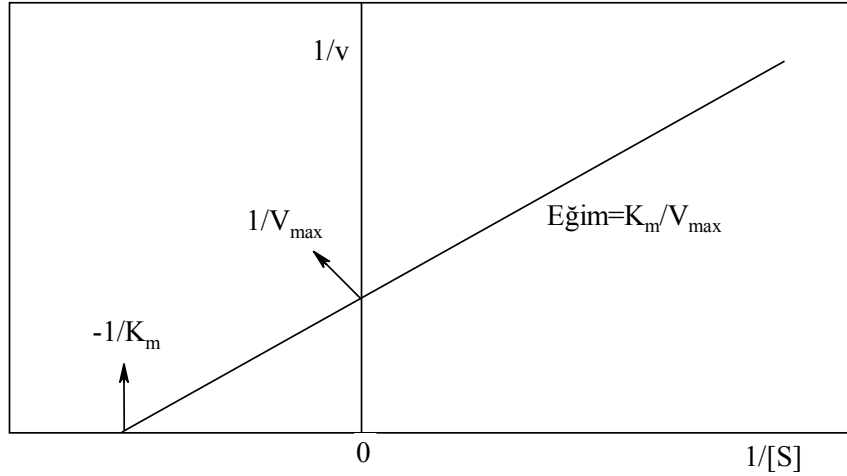
V_m : Kazein hidroliz reaksiyonu için ulaşılabilecek maksimal başlangıç hızını ($U \text{ ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$) göstermektedir.

(2.1) nolu denklem v 'ye karşı [S] gelecek şekilde işaretlendiğinde şekil 2.30'da görülen hiperbol elde edilir.



Şekil 2.30: v 'ye karşı $[S]$ diyagramı

(2.2) nolu denklem $1/v$ ye karşı $1/[S]$ gelecek şekilde işaretlendiğinde şekil 2.31'de görülen lineer doğru elde edilir. Lineweaver-Burk diyagramı olarak adlandırılan bu grafikteki lineer doğrunun eğiminden ve $1/v$ ile $1/[S]$ eksenleri üzerindeki kesim noktalarından K_m ve V_m değerleri hesaplanır.



Şekil 2.31: Lineweaver-Burk diyagramının görünüşü

Enzimin V_m değeri ile reaksiyon ortamındaki toplam enzim konsantrasyonu arasında aşağıdaki bağıntı vardır:

$$V_m = k_{cat} \cdot [E]_t \quad (2.3)$$

$[E]_t$: toplam enzim konsantrasyonunu,

k_{cat} : enzim için katalitik hız sabiti ya da turn-over sayısını göstermektedir, (dakika⁻¹).

2.8.2. Hidroliz reaksiyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi

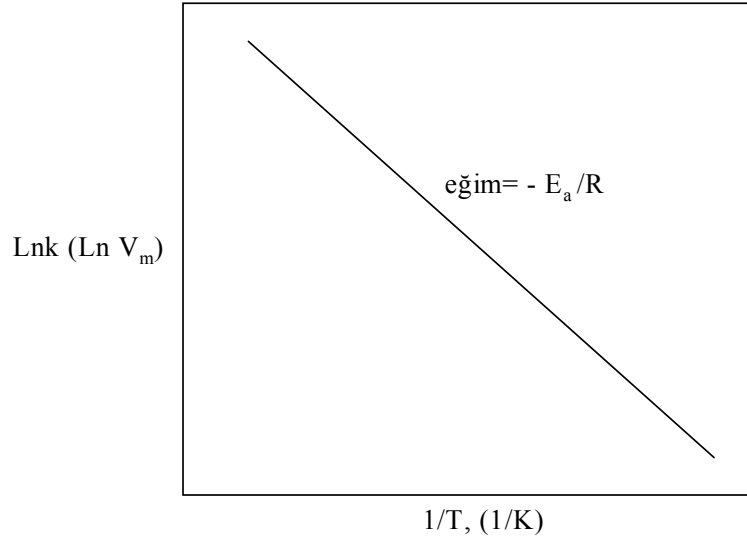
Bir reaksiyonun hız sabiti (k) ile Arrhenius aktivasyon enerjisi (E_a) arasındaki bağıntı Arrhenius denklemi ile verilir.

$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (2.4)$$

veya

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (2.5)$$

A: Belirli bir reaksiyona ilişkin bir sabittir. $\ln k$ 'ya karşı $1/T$ çizimi lineer olup şekil 2.32'de gösterilmiştir.



Şekil 2.32: Farklı sıcaklıklarda ölçülen hız sabitinin ($\ln k$) $1/T$ 'ye karşı işaretlenmesiyle elde edilen E_a aktivasyon enerjisi

Enzimatik kataliz reaksiyonunda katalitik hız sabiti (k_{cat}) birinci mertebeli hız sabitidir. Dolayısıyla $\log k_{cat}$ ya da $\log (V_m / [E]_t)$ 'ye karşı $1/T$ çizimi de katalitik adım için E_a aktivasyon enerjisi değerini verir. Pratikte ise $\log(V_m / [E]_t)$ yerine $\log V_m$ çizilebilir çünkü bir enzim çözeltisinin V_m değeri k_{cat} ile doğru orantılıdır. Birçok enzimatik reaksiyon için V_m 'in değeri birkaç hız sabitine bağlı olabilir ve bunların her biri sıcaklığın değişmesiyle farklı şekilde etkilenir. Bu durumda Arrhenius çiziminden hesaplanan E_a görünen bir ortalama değer olur.

2.8.3. Enzimin termal inaktivasyonu söz konusu olduğunda kinetik bağıntılar

Enzimlerin tersinir olmayan inaktivasyonunun mekanizması aşağıda gösterildiği gibi iki adımlı süreç olarak düşünülebilir.



E_n , E_t ve E_i sırasıyla enzimin başlangıç, geçiş hali (transient) ve inaktive olmuş şekillerini gösterir. k_i enzimin birinci merteye inaktivasyon hız sabitidir (dak^{-1}). k_{+1} ve k_{-1} ise inaktivasyona hassas hale gelmiş geçiş hali ile enzimin doğal hali arasındaki denge reaksiyonunun ileri ve geriye doğru olan hız sabitleridir.

Birinci adım sonunda tersinmez inaktivasyona daha duyarlı olan enzimin geçiş hali oluşur. İnaktive edici koşullar sürdüğü takdirde ikinci adım sonunda enzimin geçiş hali birinci dereceden inaktivasyon kinetiği izleyerek tersinmez inaktivasyona uğrar.

Görünen inaktivasyon hızı (v_i) aşağıdaki gibi hesaplanabilir:

$$v_i = \frac{dE_T}{dt} = -k_i \cdot E_T \quad (2.7)$$

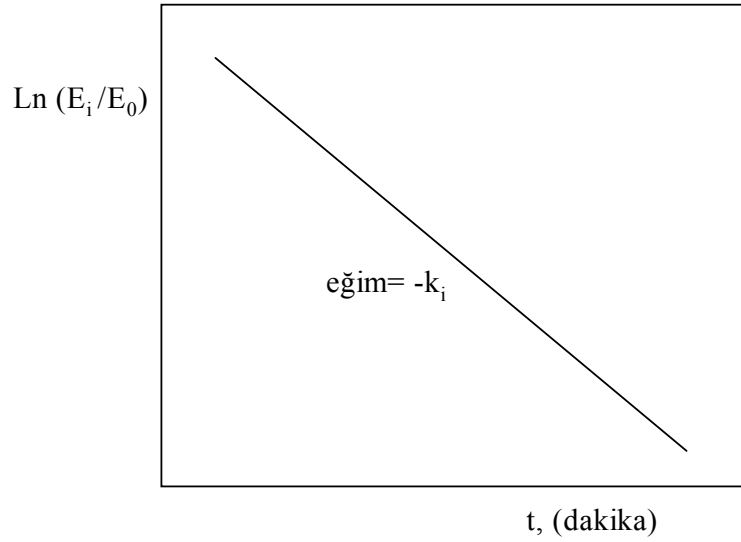
$$\int_{E_T}^{E_i} \frac{dE_T}{E_T} = -k_i \int_0^t dt \quad (2.8)$$

$$\text{Ln} \left(\frac{E_i}{E_T} \right) = -k_i \cdot t \quad (2.9)$$

Bu denklemde k_i , enzimin tersinmez inaktivasyonunun hız sabiti, t , zaman, E_i ve E_T enzimin sırası ile inaktive ve geçiş hallerinin konsantrasyonlarıdır. Ancak inaktivasyon hız sabitini belirlemede bu konsantrasyon terimleri yerine enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğundan dolayı enzimatik reaksiyonların başlangıç hızları kullanılır. İnaktivasyon başlamadan hemen önce enzimin başlangıç konsantrasyonu E_0 ile gösterilirse $E_0 = E_T$ olacağından (2.9) denklemi,

$$\ln \left(\frac{E_i}{E_0} \right) = -k_i \cdot t \quad (2.10)$$

şeklinde yazılabilir. Bu durumda E_0 ve E_i sırasıyla tersinmez inaktivasyon başlamadan önce ve tersinmez inaktivasyondan sonraki başlangıç hızları olarak tanımlanır. (2.10) denklemini $\ln (E_i / E_0)$ 'a karşı t (zaman) işaretlendiğinde bir lineer doğru verir ve inaktivasyon hız sabiti, (k_i), doğrunun eğiminden belirlenir (Şekil 2.33).



Şekil 2.33: İnaktivasyon hız sabiti grafiği

(2.10) denkleminde $E_0 = 2E_i$ olduğu zaman $t = t_{1/2}$ olur. Buna enzimin yarı ömür süresi denir. k_i ile $t_{1/2}$ değerleri arasında,

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_i} = \frac{0.693}{k_i} \quad (2.11)$$

bağıntısı vardır [36].

2.8.4. Enzimin inaktivasyonunun aktivasyon enerjisi ($E_{a,i}$)

Alkalin proteaz enziminin yüksek sıcaklıklardaki termal inaktivasyonunun (2.5) denklemini ile ifade edildiği göz önüne alınarak buradaki inaktivasyon reaksiyonunun aktivasyon enerjisinin hesaplanmasında da Arrhenius bağıntısı geçerlidir. Bu

durumda grafik çizilirken değişik sıcaklıklardaki enzimin inaktivasyonunun hız sabitleri (k_i değerleri) dikkate alınmalıdır. Enzimin inaktivasyonunun aktivasyon enerjisi, ($E_{a,i}$), $\ln k_i$ 'ye karşı $1 / T$ 'nin işaretlenmesiyle elde edilen Arrhenius grafiğinden hesaplanır. Grafikte elde edilen lineer doğrunun eğimi;

$$\text{Eğim} = -\frac{E_{a,i}}{R} \quad (2.12)$$

dir. Buradaki R gaz sabiti $8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ alındığında $E_{a,i}$ 'nin birimi J mol^{-1} 'dür.

2.8.5. Enzimin termal inaktivasyonuna ilişkin termodinamik bağıntılar

Her bir sıcaklık değeri için inaktivasyonun entalpisi (ΔH_i),

$$\Delta H_i = E_{a,i} - RT \quad (2.13)$$

Her bir sıcaklık için inaktivasyonun aktivasyon serbest enerjisi (ΔG_i),

$$\Delta G_i = -RT \ln \left(\frac{k_i h}{k_B T} \right) \quad (2.14)$$

Her bir sıcaklık için inaktivasyonun entropisi (ΔS_i),

$$\Delta S_i = (\Delta H_i - \Delta G_i)/T \quad (2.15)$$

bağıntıları ile hesaplanır. ΔG_i ve ΔH_i 'nin birimi kJ mol^{-1} , ΔS_i 'in birimi $\text{kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ dir. k_i ; inaktivasyon hız sabiti, (dak^{-1}), h ; Planck sabiti ($6.63 \times 10^{-34} \text{ J s}$), k_B ; Boltzman sabiti ($1.38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) 'dir.

2.8.6. Substrat hidrolizine ilişkin termodinamik bağıntılar

Substrat hidrolizinin aktivasyon enerjisi,

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln \left(\frac{k_{cat} h}{k_B T} \right) \quad (2.16)$$

Substrat hidrolizinin aktivasyon entalpisi,

$$\Delta H^\ddagger = \Delta E_a - RT \quad (2.17)$$

Substrat hidrolizinin aktivasyon entropisi,

$$\Delta S^\ddagger = (\Delta H^\ddagger - \Delta G^\ddagger) / T \quad (2.18)$$

Tranzisyon hali bağlanma serbest enerjisi,

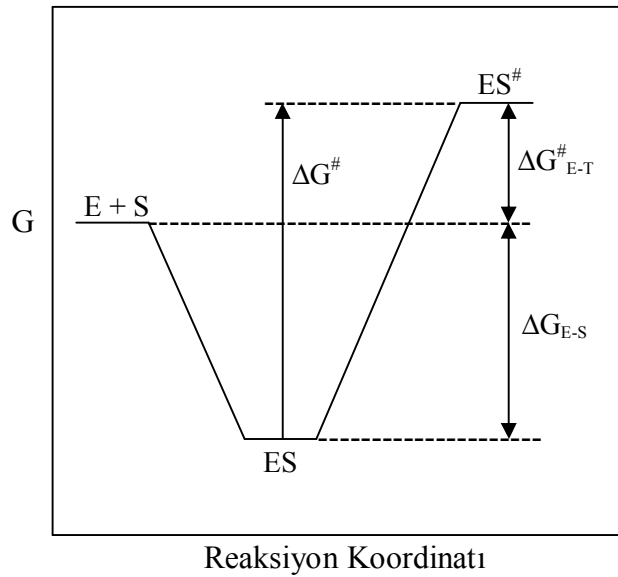
$$\Delta G_{E-T}^\ddagger = RT \ln \frac{k_{cat}}{K_m} \quad (2.19)$$

Substrat bağlamanın serbest enerjisi,

$$\Delta G_{E-S} = -RT \ln K_m^{-1} \quad (2.20)$$

ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger ve ΔG_{E-S} ' in birimleri kJ mol^{-1} , ΔS^\ddagger 'in $\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ 'dir. k_{cat} ; katalitik hız sabiti, (dak^{-1}), h ; Planck sabiti ($6.63 \times 10^{-34} \text{ J s}$), k_B ; Boltzman sabiti ($1.38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) 'dir [35].

Enzimle katalizlenen substrat hidroliz reaksiyonunun termodinamik parametrelerini içeren serbest enerji düzeyi diyagramı Şekil 2.34'de verilmiştir.



Şekil 2.34: Enzim katalizli hidroliz reaksiyonunun serbest enerji düzeyi diyagramı

2.8.7. Sıcaklığın K_m üzerine etkisi

Denge halindeki bir reaksiyonun standart serbest enerjisi için 2.21; denge sabitinin sıcaklıkla değişimini veren Van't Hoff denklemi 2.22 denklemleri ile verilir [35, 93].

$$\Delta G^0 = -2.303 RT \log K_{eq} \quad (2.21)$$

$$\frac{d \ln K_{eq}}{d\left(\frac{1}{T}\right)} = -\frac{\Delta H^0}{R} \quad (2.22)$$

K_{eq} = denge sabiti

R; gaz sabiti olup değeri, $8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ 'dir.

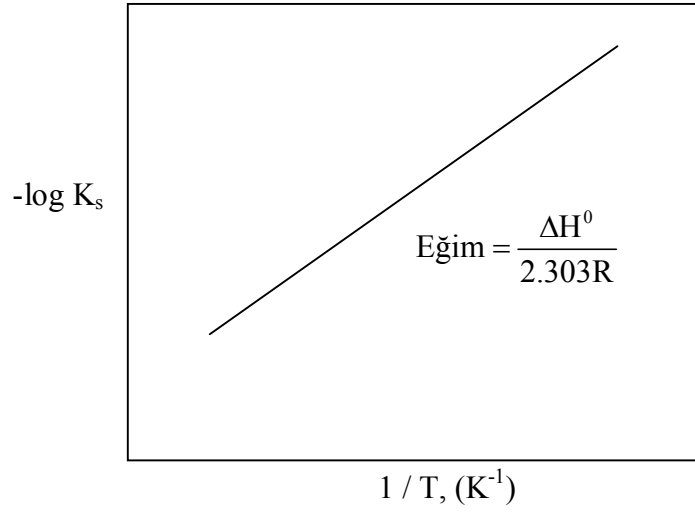
2.22 denkleminde yararlanılarak $-\log K_{eq}$ 'a karşı $1/T$ işaretlendiğinde elde edilen lineer doğrunun eğimi $\Delta H^0/2.303R$ 'dir. Buradan ΔH^0 hesaplanır.

ΔH^0 : Standart entalpi değişimi olup birimi kJ mol^{-1} 'dür.

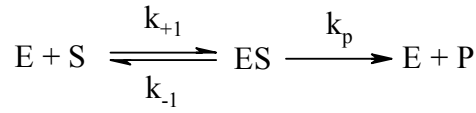
Enzimatik reaksiyonlarda kinetik yatışkın halden çok (steady-state), hızlı denge sistemine göre gerçekleşirse $K_m = K_s$ olur. K_s : ES kompleksinin dissosiasyon sabitidir (denge sabiti). Bu durumda $-\log K_s$ 'e karşı $1/T$ grafiği $ES \rightleftharpoons E + S$ reaksiyonu için ΔH^0 'ı hesaplama olanağı verir [35, 93].

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \quad (2.23)$$

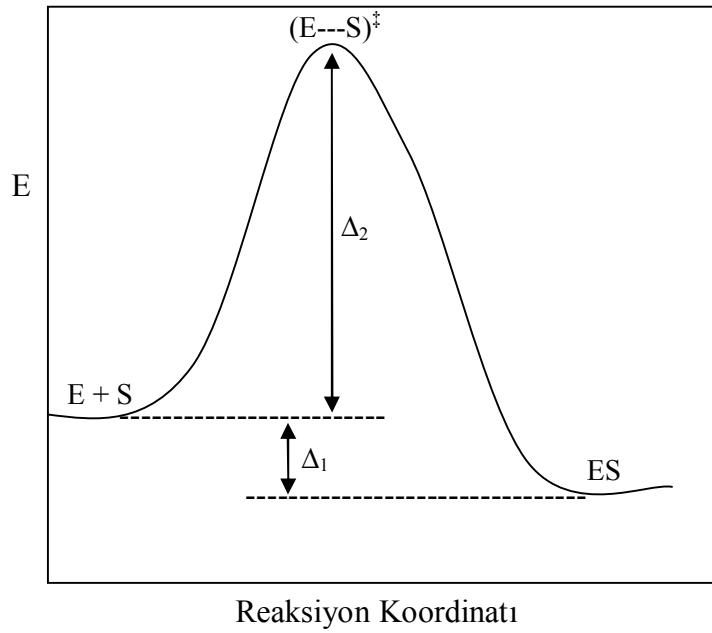
ΔG^0 ve ΔH^0 'nin birimi kJ mol^{-1} , ΔS^0 'in birimi $\text{kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ 'dir.



Şekil 2.35: Farklı sıcaklık değerlerindeki K_m 'in belirlenmesi vasıtasıyla reaksiyonun standart entalpi, (ΔH^0), değişimi değerinin belirlendiği grafik



şeklinde ifade edilen bir enzimatik reaksiyonda ES kompleksi oluşum reaksiyonunun enerji diyagramı Şekil 2.36'da verilmiştir.



Şekil 2.36: Enzim ile substrattan ES ürününün oluşumuna ilişkin reaksiyonun enerji profili. $(E---S)^\ddagger$ aktive geçiş halini göstermektedir

Şekil 2.36'daki Δ_1 enerji farkı $E + S \rightleftharpoons ES$ toplam reaksiyonu için K_s , ΔG^0 , ΔH^0 ve ΔS^0 ile tanımlanır. ES kompleksinin geçiş halindeki $[E \cdots S]^\ddagger$ formu için Δ_2 enerji farkı analog olarak K^\ddagger , ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger ile tanımlanır. K^\ddagger pseudo denge sabiti olup (2.24) denklemi ile tanımlanır. Burada $[E \cdots S]^\ddagger$ aslında yatışkın hali temsil eder. Bu nedenle K^\ddagger denge sabiti olup K_s 'den çok K_m 'e analogdur [35, 93].

$$K^\ddagger = \frac{[E \cdots S]}{[E][S]} \quad [E \cdots S]^\ddagger = K^\ddagger [E][S] \quad (2.24)$$

ES oluşumdaki k_1 hız sabiti için (2.25), (2.26) ya da (2.27) denklemleri yazılır.

$$k_1 = \frac{k_B T}{h} K^\ddagger \quad (2.25)$$

ya da

$$k_1 = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (2.26)$$

ya da

$$\Delta G^\ddagger = -2.303 RT \log \frac{k_1 h}{k_B T} \quad (2.27)$$

ΔG^\ddagger (2.28) denklemiyle de tanımlanabilir;

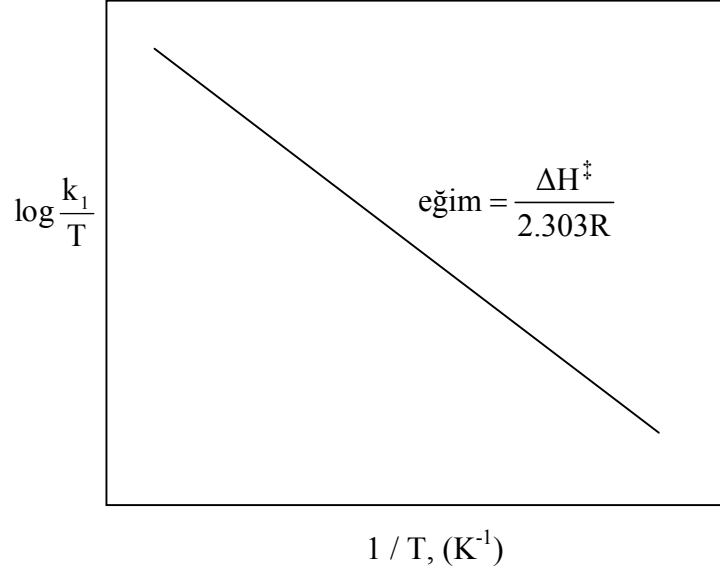
$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger \quad (2.28)$$

(2.27) denklemi (2.28)'de yerine koyulursa (2.29) numaralı aşağıdaki lineer denklem elde edilir;

$$\log \frac{k_1}{T} = -\frac{\Delta H^\ddagger}{2.303R} \frac{1}{T} + \log \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{2.303R} \quad (2.29)$$

ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger 'nin birimleri kJ mol^{-1} , ΔS^\ddagger 'in $\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ 'dir. h ; Planck sabiti (6.63×10^{-34} J s), k_B ; Boltzman sabiti ($1.38 \times 10^{-23} \text{J K}^{-1}$)'dir [35].

Eğer farklı sıcaklıklardaki k_1 değerleri hesaplanırsa, $\log (k_1 / T)$ 'ye karşı $1 / T$ grafiği çizildiğinde elde edilen lineer doğrunun eğiminden aktive geçiş hali entalpisi, (ΔH^\ddagger), değeri belirlenebilir (Şekil 2.37) [35, 93].

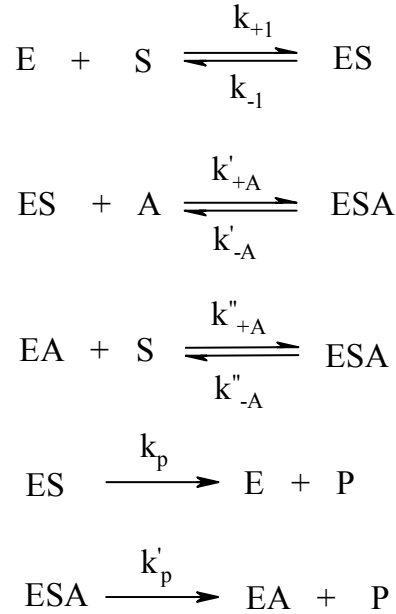
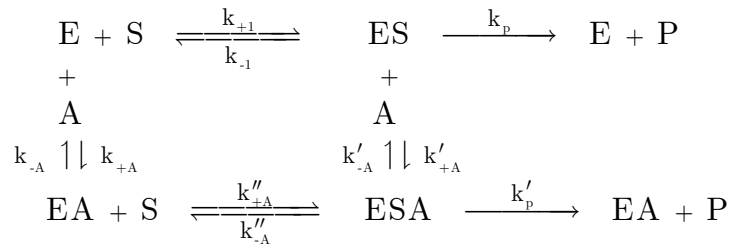


Şekil 2.37: ΔH^\ddagger , $E + S \xrightarrow{k_1} ES$ reaksiyonunun değişik sıcaklıklarda hız sabitinin ölçülmesi vasıtasıyla çizilen $\log (k_1 / T)$ ' ye karşı $1 / T$ grafiğinin eğiminden belirlenebilir

Buradaki ΔH^\ddagger değeri yatışkın hal yaklaşımı için hesaplanan değer olup hızlı denge yaklaşımında hesaplanan ΔH^0 'ın analogudur.

2.8.8. Enzim aktivasyonu söz konusu olduğunda kullanılan kinetik bağıntılar

Aktivatörler enzimlerle katalizlenen reaksiyonların hızını arttıran maddelerdir. Enzim aktivasyonunda iki temel hal söz konusudur. Bunlardan ilkinde aktivatör reaksiyonun hızını artırır, fakat reaksiyon aktivatör yokluğunda da oluşur. Bu tip aktivasyona zorunlu olmayan (non-essential) aktivasyon denir. İkinci tipte ise enzimin gerçek substratı substrat-aktivatör (SA) kompleksi'dir. Zorunlu olmayan aktivasyonda mekanizma (reaksiyon şeması) ve denge denklemleri:



$$K_m = \frac{k_{-1} + k_p}{k_{+1}} = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]} \quad K_A = \frac{k_{-A}}{k_{+A}} = \frac{[\text{E}][\text{A}]}{[\text{EA}]}$$

$$[\text{ES}] = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{K_m} \quad K_m = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]} \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_p}{k_{+1}} \quad K'_A = \alpha K_A$$

$$[\text{ESA}] = \frac{[\text{ES}][\text{A}]}{K'_A} \quad K'_A = \frac{[\text{ES}][\text{A}]}{[\text{ESA}]} \quad K'_A = \frac{k'_{-A}}{k'_{+A}} \quad K''_A = \alpha K_m$$

$$[\text{ESA}] = \frac{[\text{EA}][\text{S}]}{K''_A} \quad K''_A = \frac{[\text{EA}][\text{S}]}{[\text{ESA}]} \quad K''_A = \frac{k''_{-A}}{k''_{+A}} \quad k'_p = \beta k_p$$

$$[\text{EA}] = \frac{[\text{E}][\text{A}]}{K_A} \quad K_A = \frac{[\text{E}][\text{A}]}{[\text{EA}]} \quad K_A = \frac{k_{-A}}{k_{+A}}$$

$v_A = k_p \cdot [ES] + k'_p \cdot [ESA]$ ve $V_m = k_p \cdot [E]_t$ olduğu dikkate alınarak aktivasyon olması halinde reaksiyonun hız denklemi aşağıda gösterildiği şekillerde olur ($k_p = k_{cat}$ dır).

$$v_A = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m \cdot \frac{\left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)}{\left(1 + \frac{\beta \cdot [A]}{\alpha K_A}\right)} + [S] \cdot \frac{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_A}\right)}{\left(1 + \frac{\beta \cdot [A]}{\alpha K_A}\right)}} \quad (2.30)$$

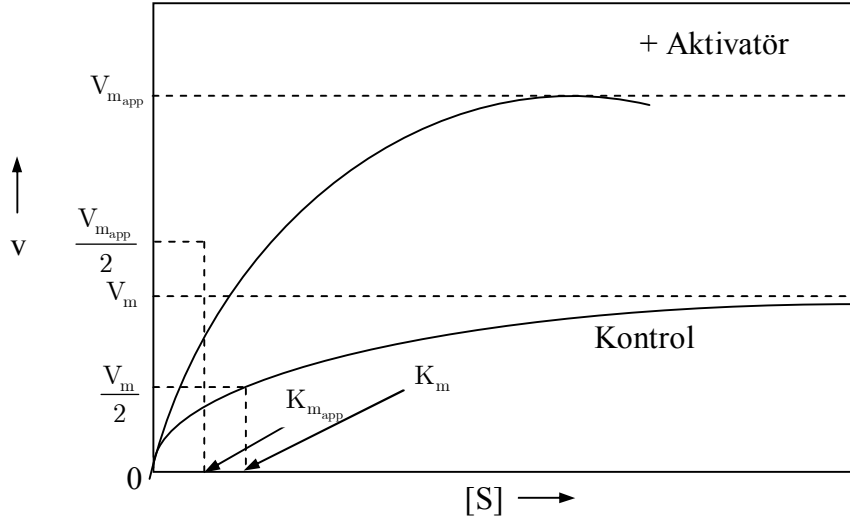
$$v_A = \frac{V_m \cdot \frac{\left(1 + \frac{\beta \cdot [A]}{\alpha K_A}\right)}{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_A}\right)} \cdot [S]}{K_m \cdot \frac{\left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)}{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_A}\right)} + [S]} \quad (2.31)$$

Dolayısıyla herhangi bir aktivatör konsantrasyonunda;

$$V_{mapp} = V_m \cdot \frac{\left(1 + \frac{\beta \cdot [A]}{\alpha K_A}\right)}{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_A}\right)} \quad (2.32)$$

$$K_{mapp} = K_m \cdot \frac{\left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)}{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_A}\right)} \quad (2.33)$$

olur. Sonsuz yüksek aktivatör konsantrasyonunda çalışılırsa; $K_{mapp} = \alpha K_m$ ve $V_{mapp} = \beta V_m$ haline indirgenir. Gerçek olmayan aktivatör varlığında v 'ye karşı $[S]$ diyagramı şekil 2.38'de gösterilmiştir [38].

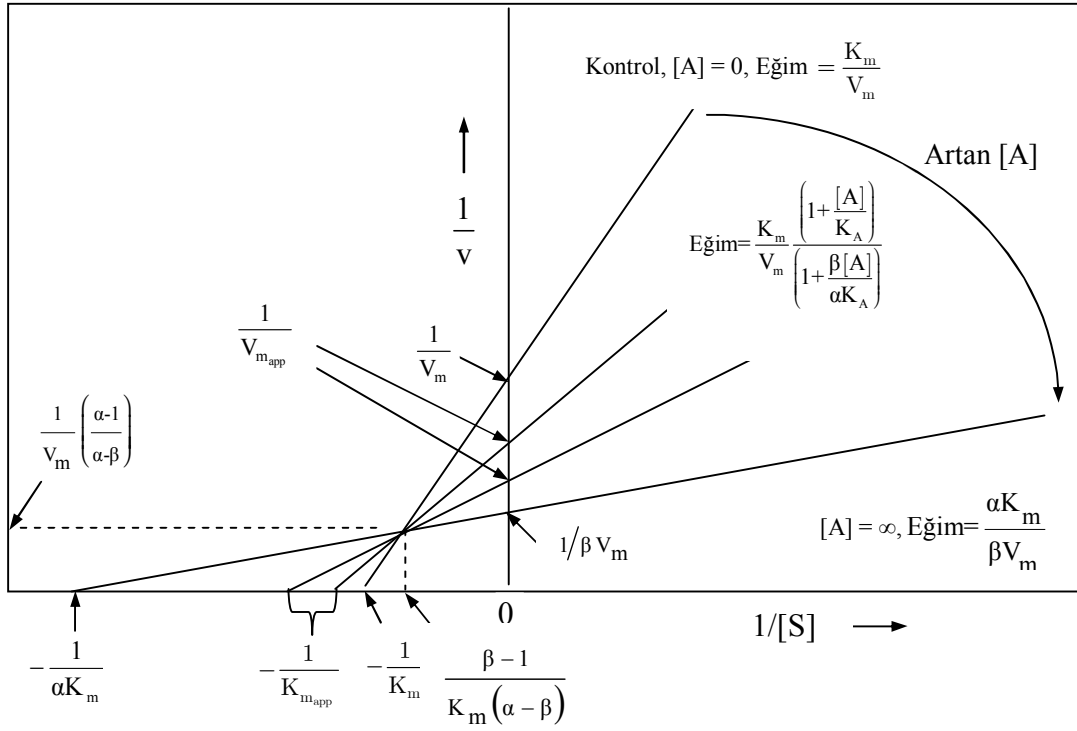


Şekil 2.38: Gerçek olmayan aktivatör varlığında v 'ye karşı $[S]$ diyagramı

Diğer taraftan (2.31) denkleminin resiprokali alınıp düzenlenirse;

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{\left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)}{\left(1 + \frac{\beta \cdot [A]}{\alpha K_A}\right)} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \cdot \frac{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_A}\right)}{\left(1 + \frac{\beta \cdot [A]}{\alpha K_A}\right)} \quad (2.34)$$

denklemini elde edilir. Bu denklemden türetilen Lineweaver-Burk diyagramı şekil 2.39'da gösterilmiştir [38].



Şekil 2.39: Gerçek olmayan aktivasyon için Lineweaver-Burk diyagramı

2.9. Alkalin Proteaz Enziminin Otokatalitik İnaktivasyonu (Otoproteolizi)

Alkalin proteaz enziminin otolitik hidrolizi kendi molekülü üzerinde katalitik etki göstermesi sonucu hidrolitik yıkıma uğramasıdır. Enzimin otolitik hidrolizi enzim çözeltisinde protein konsantrasyonunun azalması ile izlenir [39].

2.10. Tez Çalışmasında Kullanılan İstatistiksel Hesaplamalar

Aritmetik ortalama dağılımdaki değerler toplamının veri sayısına bölünmesiyle bulunan değerdir. Aritmetik ortalama aşağıdaki formülde gösterildiği gibi hesaplanır.

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 \dots + X_n}{n} \quad (2.35)$$

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n} \quad (2.36)$$

Standart sapma dağılımdaki tüm verilerin aritmetik ortalamaya göre sapmalarının standart ölçüsüdür.

$$S = \sqrt{\frac{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}{n-1}} \quad (2.37)$$

Standart hata (ortalamanın standart sapması, SEM), örneklerin aritmetik ortalamasının hatasını ifade eder.

$$SEM = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (2.38)$$

Deneysel çalışmalarda örnekle ortalaması standart hatası ile birlikte ifade edilmelidir. Tez çalışmasında bulunan değerler ortalama \pm ortalamanın standart sapması şeklinde verilmiştir [40].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Araçları

3.1.1. Araştırma olanakları (Cihaz vb.)

Araştırma, TÜBİTAK-MAM-GMBE Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuvarı'nın olanakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Kimyasallar

Bakteriyel hücre kültürasyonunda kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup Oxoid (Hampshire, UK), Fluka (İsviçre), Difco (Michigan, ABD) ve Merck (Darmstadt, Almanya)'den sağlanmıştır. Kazein ve enzim saflaştırılmasında kullanılan DEAE-selüloz Sigma Chemical Ltd. (St Louis, ABD)'den alınmıştır. Çalışmada kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Merck (A.G., Almanya) ve Sigma Chemical Ltd. (St Louis, ABD)'den temin edilmiştir.

3.1.3. Mikroorganizma

Tez çalışmasında kullanılan mikroorganizma *Bacillus marmariensis* GMBE 72 Yalova-Elmalık Köyü katkısız mantar komposttan TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü (GMBE), Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuvarı tarafından izole edilen bir mikroorganizma olup TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Kültür Koleksiyonunda muhafaza edilmektedir. Mikroorganizma *Bacillus* soyları içinde yeni tanılanmış olup aynı zamanda DSMZ (Almanya) ve JCM (Japonya) kültür koleksiyonları merkezlerinde sırasıyla *Bacillus marmariensis* sp. nov. DSM 21297 ve JCM 15719 aksesyon numaraları ile depolanmıştır (Ek-A).

Mikroorganizmanın stok kültürleri aşı kültür ortamına % 50 oranında gliserin ilave edilip eppendorf tüplere bir ml olacak şekilde dağıtılarak hazırlanmış ve -70 °C'da (Snijders Scientific Biolab, Holland) stoklanmıştır.

3.1.4. *Bacillus marmariensis* GMBE 72'den alkalen proteaz enziminin üretimi

Alkalen proteaz üretimi için aşı kültür hazırlanmasında ve fermentasyonda literatürde tanımlanan kültür ortamı kullanılmıştır [10]. Ortam bileşimi (ağırlık/hacim) (a/h); % 0.1 çözünebilir nişasta, % 0.5 pepton, % 0.5 maya özütü, % 0.1 K₂HPO₄, % 0.02 MgSO₄.7H₂O içermektedir.

Ortam bileşenleri d.H₂O'da çözülerek 900 mL'ye tamamlanıp 121°C'da 1.5 atm basınçta 20 dakika sterilize edilmiş ve ortam pH'sı ayrı olarak 121°C'da 1.5 atm basınçta 20 dakika süre ile sterilize edilmiş 100 mL % 10'luk sodyum sesquikarbonat tampon çözeltisi ile aseptik koşullarda pH 10.5'e ayarlanmıştır. % 10'luk pH 10.5 sodyum sesquikarbonat tampon çözeltisinin hazırlanması ek-B'de verilmiştir.

Aşı kültür hazırlanması: Aşı kültür ortamı 250 ml'lik erlenlerde 50 ml besiyeri olacak şekilde hazırlanıp -70 °C'de saklanan suşun stok kültürlerinden 200 µl ilave edilerek aşılınmış ve 37°C'de 120 rpm'de çalkalanarak 22 saat süre ile inkübe edilmiştir.

Alkalen proteaz üretimi: 2 lt'lik erlenmayerdeki 500 ml fermentasyon ortamı 22 saat büyütülmüş aşı kültürü ile %1 (h/h) oranında aseptik olarak aşılandıktan sonra 37°C'da ve 120 rpm çalkalama hızında 54 saat süre ile inkübe edilerek enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonun izlenmesi ve sonlandırılması Kazan ve diğ., [41]'ne göre yapılmıştır. Hücre büyümesi spektrofotometrede 660 nm'de optik yoğunluk ölçümü ile saat başı numune alınarak alkalen proteaz aktivitesi Takami ve diğ., [42], tarafından tanımlanan yöntemle göre enzim çözeltisindeki protein miktar tayini ise Sedmak ve Grossberg, [43], ve Spector, T , [44], tarafından tanımlanan yöntemle göre belirlenmiştir. Alkalen proteaz aktivite tayin yöntemi ve protein miktarı tayin yöntemi sırası ile bölüm 3.1.5 ve bölüm 3.1.6'da detaylı olarak verilmiştir.

3.1.5. Alkalen proteaz aktivitesinin belirlenmesi

Alkalen proteaz aktivitesi Takami ve diğ., [42], tarafından tanımlanan kazeinin substrat olarak kullanıldığı yönteme göre belirlenmiştir.

0.5 ml enzim çözeltisi 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisinde hazırlanmış %0.6'lık kazein çözeltisi ile karıştırılarak reaksiyon çözeltisi 20 dakika süre ile 30°C'da inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ilave edilen reaksiyon karışımı kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda reaksiyon karışımlarına 2.5 ml trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi ilave edilerek reaksiyon durdurulmuş ve 30 dakika süre ile 30°C'da inkübasyona devam edilmiştir. Süre bitiminde reaksiyon karışımı kaba filtre kağıdından süzülerek filtrattan 0.5 ml alınmıştır. 0.5 ml filtrat üzerine 2.5 ml 0.5 M Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilmiştir. İyice karıştırılan reaksiyon karışımının üzerine 0.5 ml iki kez seyreltilmiş Folin-Ciocalteu ayırıcı eklenerek karışım 30 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminde oluşan mavi rengin şiddeti 660 nm'de (BioRad Smart Spec 3000) köre karşı absorbansın ölçülmesi ile belirlenmiştir. Enzim aktivitesi tayin yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanması ek-B'de verilmiştir.

Alkalen proteaz aktivitesi standart tirozin grafiği oluşturularak (ek-A) aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Enzim Aktivitesi (U ml}^{-1}\text{dak}^{-1}) = \frac{\frac{\text{OD}_{660}}{\text{Eğim}} \times \text{Reaksiyon Hacmi (mL)} \times \text{Seyrelme Faktörü}}{\text{Enzim Çözeltisinin Hacmi (mL)} \times \text{Reaksiyon Süresi (dak)}}$$

Bir birim alkalen proteaz aktivitesi (1 U); pH 10.5 ve 30°C'da, dakikada 1µg tirozin üretebilmek için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.1.5.1. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması

Alkalen proteaz aktivitesi hesaplanmasında kullanılan tirozin standart grafiğinin oluşturulması için 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tamponunda 0-50 µg ml⁻¹

tirozin içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Kör olarak tirozin yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ilave edilen reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonda tirozin bulunduran her bir çözeltiden 0.5 ml alınarak üzerine 2.5 ml 0.5 M Na₂CO₃ ve iki kez seyreltilmiş 0.5 ml Folin- Ciocalteu ayırıcı ilave edilerek iyice karıştırılmış ve reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 30 dakika süre ile bekletilmiştir. Süre bitiminde oluşan mavi rengin şiddeti 660 nm'de köre karşı absorbansın ölçülmesi ile belirlenmiştir.

OD₆₆₀'a karşı tirozin konsantrasyonunun (mg ml⁻¹) işaretlenmesinden elde edilen standart doğrunun (ek-A) eğimi belirlenerek alkalen proteaz aktivitesi hesabında kullanılmıştır.

3.1.6. Alkale proteaz çözeltilerinde protein miktarı tayini

Enzim örneklerindeki protein miktarı Coomassie Blue boyası bağlama yöntemi ile belirlenmiş [43, 44] ve standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır.

1 ml enzim çözeltisi üzerine 1 ml Coomassie Blue reaktifi ilave edilerek iyice karıştırılmış ve 2-30 dakikalık bekleme süresini takiben örnek çözeltisinde oluşan mavi rengin şiddeti 595 nm'de okunmuştur.

Enzim çözeltisindeki protein miktarı protein standart grafiği (ek-A) oluşturularak aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Protein (mg ml}^{-1}\text{)} = \frac{\text{OD}_{595}}{\text{Eğim}} \times \text{Seyrelme Faktörü}$$

3.1.6.1. Protein standart grafiğinin hazırlanması

10 mg BSA 10 ml distile suda çözülerek 1 mg ml⁻¹ olacak şekilde BSA çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiden 1 ml alınmış üzerine 9 ml d.H₂O eklenerek 1/10 oranında seyreltilmiştir. Konsantrasyon duyarlılık sınırı içinde kalan standartlar (5, 10, 15, 20, 25, 30 µg BSA ml⁻¹) uygun seyreltmeler yapılarak son hacim 1 ml

olacak şekilde hazırlanmışlardır. Hazırlanan 1 ml örnek üzerine 1 ml Coomassie Blue reaktifi ilave edildikten sonra karışımın absorbans değeri 595 nm'de okunmuştur.

OD₅₉₅'e karşı BSA konsantrasyonunun ($\mu\text{g ml}^{-1}$) işaretlenmesinden elde edilen standart doğrunun eğimi belirlenerek örneklerdeki protein miktarı hesabında kullanılmıştır. BSA standart doğrusunun grafiği ek-A'da verilmiştir.

3.2. *Bacillus marmariensis* GMBE 72'den İzole Edilen Alkalin Proteaz Enziminin Saflaştırılması

Bacillus marmariensis GMBE 72 suşu tarafından üretilen alkalin proteaz enzimi hücre dışına salgılanan bir enzim olduğundan fermentasyon sonunda hücreler santrifüjlenerek (SIGMA 6K15 model santrifüj; 9000g, 30dak, 0-4°C) ortamdan uzaklaştırılmış ve kültür üst sıvısı enzim saflaştırması ve karakterizasyonu çalışmalarında kullanılmak üzere +4°C'da saklanmıştır. Saflaştırma çalışmasında kullanılan konvansiyonel saflaştırma basamakları aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

3.2.1. Alkalin proteaz enziminin kültür üst sıvısından çöktürülmesi için uygun amonyum sülfat doygunluğunun belirlenmesi

Kültür üst sıvısında bulunan alkalin proteaz enziminin çöktürülmesi amacı ile en uygun amonyum sülfat doygunluğunun belirlenmesi için kültür üst sıvısında % 50, 55, 60, 65, 70 ve 75 amonyum sülfat doygunluğunda çöktürmeler denenmiştir [8, 41]. Amonyum sülfat çöktürmeleri sırasında izlenen yol aşağıda açıklanmıştır.

İstenen doygunluğa karşılık gelen amonyum sülfat miktarı 100 ml kültür üst sıvısına çözünmesine izin verecek şekilde karıştırılarak yavaş yavaş ilave edilmiştir. Amonyum sülfat çöktürmeleri çöktürme ortamı pH değeri pH: 9.04 ve pH: 6.50 olacak şekilde iki farklı pH değerinde gerçekleştirilmiştir.

Amonyum sülfat ilavesinin bitiminde elde edilen süspansiyon çözeltisi 3 saat süre ile karışmaya bırakılmıştır. Süre bitiminde süspansiyon çözeltisi içindeki protein agregatları 12000 rpm'de 55 dakika süre ile santrifüjlenerek çöktürülmüş ve üst sıvı ile çökelti ayrılmıştır. Çöken protein (pellet) 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisinin minimum miktarında çözülerek yine aynı tampon çözeltisine karşı gece boyunca diyaliz edilmiştir. Amonyum sülfat çöktürmeleri ve diyaliz işlemlerinin hepsi +4°C'da gerçekleştirilmiştir.

Diyalizden alınan diyalizatın alkalen proteaz enzim aktivitesi ve protein miktarı sırası ile bölüm 3.1.5 ve bölüm 3.1.6'da verilen yöntemlere göre belirlenmiş ve her bir amonyum sülfat konsantrasyonu için saflaştırma katsayısı ile saflaştırma verimi hesaplanmıştır.

3.2.2. Alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisi kolonundan elüsyonu

Uygun saflaştırma katsayısı değeri ile sonlandırılan amonyum sülfat çöktürmesi aşamasından sonra enzimin daha ileri derecede saflaştırılması için iyon değişim kolon kromatografisi gerçekleştirilmiştir. Çöktürme sonrasında elde edilen diyalizat dietilaminoetil-selüloz (DEAE-selüloz) kromatografi kolonuna (25 cm x 2.5 cm çap) yüklenmiştir. Yükleme öncesinde DEAE-selüloz kolon materyali rejenere edilerek kolona doldurulmuş ve kolon 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile dengelenmiştir. Enzim ile yüklenmiş kolon öncelikle 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile 15 ml saat⁻¹ akış hızında yıkanmıştır. Yıkama sonrasında kolondan alınan 5.0 mL'lik her fraksiyonda alkalen proteaz enzim aktivitesi ve protein miktarı sırası ile bölüm 3.1.5 ve bölüm 3.1.6'da verilen yöntemlere göre belirlenmiştir.

50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile kolondan yıkanan fraksiyonlarda alkalen proteaz aktivitesine rastlanmadığı için kolonda bağlı kalan enzim 250 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile yıkanarak kolondan yıkanmıştır.

Kolon yıkamasından alınan fraksiyonlarda alkalen proteaz enzim aktivitesi ve protein miktarı sırası ile bölüm 3.1.5 ve bölüm 3.1.6'da verilen yöntemlere göre tayin edilmiş ve fraksiyonlarda alkalen proteaz aktivitesi belirlenmiştir.

DEAE-selüloz kolonunun 250 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile yıkanması sonucu elde edilen son saflaştırma katsayısı değerinin iyileştirilmesi amacı ile kolona kademeli yıkama uygulanmıştır. Kolon 0, 50, 100, 150, 200 ve 250 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile yıkanmıştır.

Kolonun 200 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile yapılan yıkamasından alınan yüksek spesifik aktiviteli fraksiyonlar bir araya toplanarak 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisine karşı +4°C'da gece boyunca diyaliz edilmiş ve diyalizattaki alkalen proteaz enzim aktivitesi ve protein miktarı tayini sırasıyla bölüm 3.1.5 ve bölüm 3.1.6'da verilen yöntemlere göre belirlenmiştir.

DEAE-selüloz kolonunun 50, 100, 150, 200 ve 250 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile yıkanması tamamlandıktan sonra kolonda halen kalmış olabilecek alkalen proteaz aktivitesinin kontrol edilmesi amacı ile kolon 500 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile yıkanmış ve toplanan fraksiyonlarda alkalen proteaz aktivitesi ve protein miktarı tayini yapılmıştır. Yüksek iyonik kudret varlığı nedeni ile bastırılan alkalen proteaz aktivitesinin olabileceği düşüncesi ile biraraya toplanan fraksiyonlar 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisine karşı +4°C'da gece boyunca diyaliz edilmiş ve diyalizattaki alkalen proteaz enzim aktivitesi bölüm 3.1.5'de verilen yöntemlere göre belirlenmiştir. Kolonun yıkanması sırasında kullanılan tampon çözeltilerinin hazırlanması ek-B'de verilmiştir.

3.3. *Bacillus marmariensis* GMBE 72'den Saflaştırılan Alkalen Proteaz Enziminin Karakterizasyonu

3.3.1. *Bacillus marmariensis* GMBE 72'den saflaştırılan serbest alkalen proteaz enziminin molekül ağırlığının belirlenmesi

Bacillus marmariensis GMBE 72 soyundan DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisi sonunda saflaştırılan alkalen proteaz enziminin molekül ağırlığı sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile belirlenmiştir. SDS-PAGE'i [45] tarafından verilen metoda göre %5 (w/v) yükleme jeli ve %12 (w/v) ayırıcı jel kullanılarak örneklerin 90 dakika süre ile 150 V'da (BioRad Mini Protean marka elektroforez sistemi) yürütülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Elektroforez jellerinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları ek-B'de verilmiştir.

Kimyasallar sırası ile cam bir beherde hazırlanmıştır. Toplam hacmi 5 ml olan ayırma jeli polimerleşme başlamadan önce süratle hazırlanan kasete dökülmüştür. Jelin üst kısmı izopropil alkol ile düzgünleştirilerek 20–30 dakika süre ile jelin donması beklenmiştir. Jel donduktan sonra üzerindeki alkol distile su ile yıkanarak alınmıştır. Örnek yükleme jeli ise daha önce hazırlanıp dondurulan yürütme jelinin üzerine dökülerek jele hemen tarak yerleştirilmiş ve 20 dakika süre ile yükleme jelinin de donması için beklenmiştir.

Örneklerin hazırlanması: 40 µl 2X denatürasyon çözeltisi ile 40 µl enzim çözeltisi bir eppendorfta karıştırılmıştır. Hazırlanan örnekler kaynayan suda 120 sn süre ile bekletilerek denatüre edilmişlerdir. Örnekler jele yüklenmeden önce 2 mM fenilmetansülfonilflorür (PMSF) ile muamele edilmişlerdir.

Elektroforez sonrası jel üzerindeki protein bantları Coomassie Brilliant Blue R-250 ve gümüş boyama yöntemi ile görünür hale getirilmişlerdir. Protein marker olarak 10-225 kDa aralığında dokuz protein içeren Promega Broad Range Molecular Weight Markers V849A kullanılmış ve alkalen proteaz enziminin moleküler ağırlığı Image Analyzer System (UVI BTS-20.M) cihazı kullanılarak saptanmıştır. Elektroforez sırasında kullanılan çözeltilerin hazırlanması ek-B'de verilmiştir.

3.3.1.1. Örneklerin gümüş boyama yöntemi ile boyanması

Gümüş boyama için Damerval ve diğ., [46], tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Elektroforez sisteminden alınan protein yüklü jeller aşağıda belirtilen çözeltilerde belirtilen sürelerde bekletilerek protein bantları jel üzerinde görünür hale getirilmişlerdir. Çözeltilerin hepsi taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

Fiksasyon çözeltisi	1 saat
Çözelti 2	20 dak.
Distile su	10 dak.
Çözelti 3	5 dak.
Distile su	3x20 sn
Gümüş çözeltisi	45 dak.
Distile su	5 sn
Gelişme çözeltisi	İzler belirene kadar, çalkalayarak
Stop çözeltisi	5 sn
Bekletme çözeltisi	+4°C'da uzun süre

Elektroforezi tamamlanan ve analizlenen jel distile su ile ıslatılmış Whatman kurutma kağıdına yerleştirilerek üzeri gergin film ile kaplanmış ve jel kurutucuda kurutulmuştur. Gümüş boyama yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanması ek-B'de verilmiştir.

3.3.1.2. Örneklerin Coomassie Brilliant Blue R-250 boyama yöntemi ile boyanması

Coomassie Brilliant Blue R-250 boyama için Spector, T., [44], ve Sedmak, ve Grossberg, [43] tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Elektroforezi tamamlanan jel örneği sistemden alınarak boyama çözeltisinin içinde bekletilmiştir. Ardından arıtma çözeltisine alınan jel üzerindeki bantlar belirene kadar bu çözeltide bekletilmiş ve bekleme süresince de jelin içinde bulunduğu çözelti sık sık değiştirilmiştir.

Analizi tamamlanan jel distile su ile ıslatılmış Whatman kurutma kağıdına yerleştirilerek üzeri gergin film ile kaplanmış ve jel kurutucuda kurutulmuştur. CBB R-250 boyama yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanması ek-B’de verilmiştir.

3.3.2. *Bacillus marmariensis* GMBE 72’den saflaştırılan serbest alkale proteaz enziminin optimum sıcaklığının ve sıcaklık kararlılığının belirlenmesi

Bacillus marmariensis GMBE 72’den izole edilen alkale proteaz enziminin sıcaklık profili 30 ile 80°C’lar arasında Ca^{+2} ve Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda Kazan ve diğ., [41]’ne göre belirlenmiştir. Enzimin sıcaklık profilinin belirlenmesi için 0.5 ml enzim çözeltisi (1214.67 U mg^{-1} spesifik aktivite, 0.05 $mgml^{-1}$ protein) 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisinde hazırlanan % 0.6’lık kazein çözeltisinin 2.5 ml’si ile karıştırılarak 30 ile 80°C aralığında Ca^{+2} ve Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda 20 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Süre bitiminde enziminin Ca^{+2} ve Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda her sıcaklığa karşılık gelen aktivite değeri bölüm 3.1.5’de verilen alkale proteaz aktivite tayin yöntemine göre belirlenmiştir. En yüksek aktivite değeri %100 olarak kabul edilmiş ve hesaplanan diğer aktivite değerleri en yüksek aktivite değerine bölünerek % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır. Her sıcaklık değeri için hesaplanan % bağıl aktivite değeri o sıcaklığa karşı grafiğe geçirilerek enzimin Ca^{+2} ve Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir.

Enzimin termal kararlılığının belirlenmesi amacı ile 0.5 ml enzim çözeltisi (1214.67 U mg^{-1} spesifik aktivite, 0.05 $mg ml^{-1}$ protein) 30 ile 80°C aralığındaki sıcaklık değerlerinde 2 saat süre ile ön inkübasyona tabii tutulmuş ve ardından enzim çözeltisinin aktivitesi bölüm 3.1.5’de verilen alkale proteaz aktivite tayin yöntemine göre belirlenmiştir. Enzim çözeltisinin aktivitesi pH 10.5 ve 30°C’da tayin edilen aktivite değerine oranlanarak % kalan aktivite olarak hesaplanmıştır. Her bir sıcaklık değeri için hesaplanan % kalan aktivite değeri o sıcaklığa karşı grafiğe geçirilerek enzimin sıcaklık stabilite profili belirlenmiştir.

3.3.3. *Bacillus marmariensis* GMBE 72'den saflaştırılan serbest alkalen proteaz enziminin optimum pH değerinin ve pH kararlılığının belirlenmesi

Bacillus marmariensis GMBE 72'den izole edilen alkalen proteaz enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi için 0.5 ml enzim çözeltisi (1214.67 U mg⁻¹ spesifik aktivite, 0.05 mg ml⁻¹ protein) pH: 8-11.5 aralığında 50 mM NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltilerinde pH:12-13 aralığında 200 mM NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltilerinde hazırlanan %0.6'lık kazein çözeltisinin 2.5 ml'si ile karıştırılarak 20 dakika süre ile inkübe edilmiştir [41]. Süre bitiminde enziminin her pH değerine karşılık gelen aktivite değeri bölüm 3.1.5'de verilen alkalen proteaz aktivite tayin yöntemine göre belirlenmiştir. En yüksek aktivite değeri %100 olarak kabul edilmiş ve hesaplanan diğer aktivite değerleri en yüksek aktivite değerine bölünerek % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır. Her pH değeri için hesaplanan % bağıl aktivite değeri pH'ya karşı grafiğe geçirilerek enzimin optimum pH değeri belirlenmiştir.

Enzimin pH kararlılığının belirlenmesi amacı ile 0.05 ml enzim çözeltisi (1214.67 U mg⁻¹ spesifik aktivite, 0.05 mg ml⁻¹ protein) 50 mM pH 8-11.5 NaOH-glisin ve 200 mM pH 12-13 NaOH-glisin tampon çözeltilerinin 0.450 ml'si ile karıştırılarak 7 gün süre ile oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra her pH değerine karşılık gelen enzim aktivitesi bölüm 3.1.5'de verilen alkalen proteaz aktivite tayin yöntemine göre belirlenmiştir. Her bir pH değerindeki sıfır anı % 100 kabul edilerek enzim çözeltilerinin kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır. pH'ya karşı kalan aktivite değerleri grafiğe geçirilerek enzimin pH stabilite profili belirlenmiştir.

3.3.4. *Bacillus marmariensis* GMBE 72'den saflaştırılan serbest alkalen proteaz enziminin kazein hidrolizinin Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesi

Alkalen proteaz enziminin kazein hidrolizinin aktivasyon enerjisi Arrhenius lineer grafiğinin eğiminden belirlenmiştir. Bölüm 3.3.2'de anlatılan optimum sıcaklık çalışmasından her bir sıcaklık değeri için elde edilen aktivite değerlerinin logaritmasının (lnv) mutlak sıcaklığın resiprokal (1/T), (K⁻¹) değerlerine karşı çizilmesi ile oluşturulan doğrunun eğiminden alkalen proteaz enziminin kazein hidrolizinin Arrhenius aktivasyon enerjisi değeri (E_a) hesaplanmıştır [38].

3.3.5 *Bacillus marmariensis* GMBE 72'den saflaştırılan serbest alkale proteaz enziminin kazein hidrolizinin kinetik parametrelerinin belirlenmesi

Bacillus marmariensis GMBE 72'den saflaştırılan alkale proteaz enziminin kazein hidrolizinin kinetik parametrelerini belirlemek amacı ile öncelikle çalışılacak substrat konsantrasyonu aralığı tespit edilmiştir [37, 41]. 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10 mM substrat konsantrasyonu aralığında hazırlanan substrat çözeltileri ile enzimin başlangıç hızı değerleri belirlenmiştir. Yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanmış 2.5 ml substrat çözeltisi ile 0.5 ml uygun oranda seyreltilmiş enzim çözeltisi (2781.18 U mg⁻¹ spesifik aktivite, 0.0662 mg ml⁻¹ protein) karıştırılarak 30°C'daki su banyosunda 3 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi bulunduran reaksiyon karışımı kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda farklı substrat konsantrasyonlarındaki enzim çözeltilerinin başlangıç hızları bölüm 3.1.5'de verilen alkale proteaz aktivitesi tayin yöntemine göre belirlenmiştir. Her bir substrat konsantrasyonuna karşılık gelen başlangıç hızına karşı başlangıç substrat konsantrasyonu değeri işaretlenerek substrat inhibisyonunun başladığı konsantrasyon değeri belirlenmiştir. Alkale proteaz enziminin kazein hidrolizinin kinetik parametreleri (K_m, V_m) ise Lineweaver-Burk diyagramı oluşturularak [35] aşağıda belirtilen yöntem gereğince belirlenmiştir.

Substrat çözeltileri reaksiyon ortamındaki başlangıç substrat konsantrasyonu; 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 6.0 mM kazein olacak şekilde 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisinde çözümlenerek hazırlanmıştır. Yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanmış 2.5 ml substrat çözeltisi ile 0.5 ml uygun oranda seyreltilmiş enzim çözeltisi (2781.18 U mg⁻¹ spesifik aktivite, 0.0662 mg ml⁻¹ protein) karıştırılarak 30°C'daki su banyosunda 3 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi bulunduran reaksiyon karışımı kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda farklı substrat konsantrasyonlarındaki enzim çözeltilerinin başlangıç hızları bölüm 3.1.5'de verilen alkale proteaz aktivitesi tayin yöntemine göre belirlenmiştir. Daha sonra başlangıç substrat konsantrasyonlarının resiprokal değerlerine (1/[S]) karşı başlangıç hızlarının resiprokal değerleri (1/v) işaretlenerek Lineweaver-Burk diyagramı oluşturulmuş

elde edilen lineer doğrunun eğiminden ve y eksenini kesim noktasından enzimin kazein hidrolizinin K_m , V_m değerleri ve bu değerler yardımı ile de k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri hesaplanmıştır. k_{cat} hesaplamasında kullanılan $[E_t] = 2.73 \times 10^{-3} \mu M$ olarak alınmıştır.

3.3.6. *Bacillus marmariensis* GMBE 72'den saflaştırılan serbest alkalen proteaz enziminin substrat spesifitesinin belirlenmesi

3.3.6.1. Alkalen proteaz enziminin p-nitroanilid (p-NA) konjuge sentetik substratlara karşı spesifitesinin belirlenmesi

Alkalen proteaz enziminin substrat spesifitesini belirlemek amacı ile p-nitroanilid ile konjuge edilmiş sentetik peptid substratları kullanılmıştır. Kullanılan sentetik substratlar; N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA, N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA, L-Leu-pNA ve N α -benzoyl-L-Arg-pNA (L-BAPNA) olarak belirlenmiştir [8,41]. Her bir substratın dimetilsülfoksitteki (DMSO) stok çözeltisi kullanım sırasında taze olarak hazırlanmıştır.

0.025 ml substrat çözeltisi 0.465 ml 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile karıştırılarak 37°C'da 5 dakika süre ile ön inkübasyona tabii tutulmuştur. Süre bitiminde üzerine 0.01 ml enzim çözeltisi (2229.63 U mg⁻¹ spesifik aktivite, 0.188 mg ml⁻¹ protein) ilave edilen reaksiyon karışımı 37°C'da 10 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi bulunduran reaksiyon karışımı kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda reaksiyon karışımının üzerine 0.1 ml % 2'lik asetik asit ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Oluşan sarı rengin şiddeti 410 nm'de köre karşı absorbansın ölçülmesi ile belirlenmiştir.

Reaksiyon çözeltilerindeki alkalen proteaz aktivitesi aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır (ϵ : molar absorpsiyon katsayısı olup değeri 9780 M⁻¹ cm⁻¹'dir).

$$\text{Enzim Aktivitesi} = \frac{\text{Reaksiyon çözeltisinin hacmi (mL)} \times \text{Absorbans}}{\text{Enzim çözeltisinin hacmi (mL)} \times \epsilon (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times \text{Işık yolu (cm)}} \times \frac{1}{\text{Süre (dak)}}$$

Bir birim alkalen proteaz aktivitesi (1 U); 37°C ve pH 10.5’da dakikada 1µmol p-NA üretebilmek için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.3.6.2. Alkalen proteaz enziminin protein substratlara karşı spesifitesinin belirlenmesi

Alkalen proteaz enziminin protein substratlara karşı spesifitesini belirlemek amacı ile hemoglobin (Hb), keratin [49, 50, 51], sığır serum albumini (BSA) [49], süttozu ve jelatin’den [50] oluşan protein substratları kullanılmıştır. Substratların % 0.6’lık çözeltileri 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisinde çözülerek hazırlanmıştır.

0.5 ml enzim çözeltisi (2055.61 U mg⁻¹ spesifik aktivite, 0.0874 mg ml⁻¹ protein) 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisinde hazırlanmış %0.6’lık substrat çözeltisi ile karıştırılarak 20 dakika süre ile 30°C’da inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ilave edilen reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Süre bitiminde reaksiyon karışımı üzerine 2.5 ml TCA çözeltisi ilave edilerek reaksiyon durdurulmuş ve 30 dakika süre ile 30°C’da inkübasyona devam edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyon çözeltisi kaba filtre kağıdından süzülerek filtrattan 0.5 ml alınmıştır. 0.5 ml filtrat üzerine 2.5 ml 0.5 M Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilmiştir. İyice karıştırılan reaksiyon karışımlarının üzerine 0.5 ml iki kez seyreltilmiş Folin-Ciocalteu ayırıcı eklenip karışım 30 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminde oluşan mavi rengin şiddeti 660 nm’de köre karşı absorbansın ölçülmesi ile belirlenmiştir.

Kazein substratını bulduran enzim çözeltisinin aktivitesi %100 kabul edilmiş ve hesaplanan diğer aktivite değerleri bu aktivite değerine oranlanarak % bağıl aktivite olarak verilmiştir. Reaksiyon çözeltilerindeki alkalen proteaz aktivitesi aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Enzim Aktivitesi} = \frac{\frac{\text{OD}_{660}}{\text{Eğim}} \times \text{Reaksiyon Hacmi (mL)} \times \text{Seyrelme Faktörü}}{\text{Enzim Çözeltisinin Hacmi (mL)} \times \text{Reaksiyon Süresi (dak)}}$$

Bir birim alkalen proteaz aktivitesi (1 U); 30°C ve pH 10.5'da dakikada 1µg tirozin üretebilmek için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.3.7. Alkalen proteaz enziminin N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA, N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA hidrolizinin kinetik parametrelerinin belirlenmesi

Alkalen proteaz enziminin N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA, N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA hidrolizinin kinetik parametreleri (K_m , V_m) Lineweaver-Burk diyagramları oluşturularak belirlenmiştir.

Substrat çözeltilerinin reaksiyon ortamındaki başlangıç substrat konsantrasyonu; N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ve N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA için; 0.5, 0.625, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0 ve 2.5 mM, N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA için 1.25, 1.50, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0 ve 6.0 mM, N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 ve 25.0 mM substrat olacak şekilde DMSO'de çözülerek stok çözeltileri hazırlanmıştır. Yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanmış 0.025 ml substrat stok çözeltileri üzerine 0.465 ml 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ilave edilerek karışım 37°C'da 5 dakika süre ile ön inkübasyona tabii tutulmuştur. İnkübasyon sonunda karışım üzerine 0.01 ml enzim çözeltisi (N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ve N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA için 2055.61 U mg⁻¹ spesifik aktivite, 0.0874 mg ml⁻¹ protein, N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA, N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA için 2672.69 U mg⁻¹ spesifik aktivite, 0.052 mg ml⁻¹ protein) ilave edilmiş ve reaksiyon karışımı 37°C'daki su banyosunda 3 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi bulunduran reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Süre bitiminde reaksiyon karışımlarının üzerine 0.1 ml % 2'lik asetik asit çözeltisi ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Oluşan sarı rengin şiddeti 410 nm'de köre karşı absorbansın ölçülmesi ile belirlenmiştir. Reaksiyon çözeltilerindeki alkalen proteaz aktivitesi bölüm 3.3.6.1'de verilen formül ile hesaplanmıştır. Daha sonra başlangıç substrat konsantrasyonlarının resiprokal değerlerine (1/[S]) karşı

başlangıç hızlarının resiprokal değerleri ($1/v$) işaretlenerek Lineweaver-Burk diyagramı oluşturulmuştur. Elde edilen lineer doğrunun eğiminden ve y eksenini kesim noktasından enzimin N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA ve N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA hidrolizinin K_m , V_m değerleri ve bu değerler yardımı ile de k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri hesaplanmıştır. k_{cat} hesaplamasında kullanılan $[E_t]$ değerleri N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ve N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA için $[E_t] = 0.0036 \mu M$, N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA ve N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA için $[E_t] = 0.0021 \mu M$ olarak hesaplanmıştır.

3.3.8. *Bacillus marmariensis* GMBE 72'den saflaştırılan serbest alkalen proteaz üzerine aktif bölge yönelimli inhibitörlerin geri dönüşümsüz inhibisyon etkisinin belirlenmesi

Alkalin proteaz enziminin aktif bölgesinde yer alan enzimatik katalizden sorumlu amino asitlerin belirlenmesi için enzim preparatları amino asit modifikasyonu için kullanılan aktif bölge yönelimli inhibitörler ile muamele edilerek enzimin geri dönüşümsüz inhibisyona uğraması sağlanmıştır. Bu amaçla kullanılan inhibitörler ve özgün olarak bağ yaptıkları amino asitler yöntemde verilmiş olup aşağıda belirtildiği şekilde Kazan ve diğ., [41]'ne göre hazırlanmışlardır.

Fenilmetansülfonilflorür (PMSF, Serin), N-bromosüksinimid (Triptofan) ve N-p-tosil-L-fenil alanin kloro-metil keton (TPCK, Histidin) sırasıyla mutlak etanol, aseton ve metanolde çözülerek stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan inhibitörler reaksiyon ortamında 1, 2 ve 4 mM konsantrasyonlarında olacak şekilde 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisi ile seyreltilmişlerdir. N-etilasetimidat (Lizin), iyodoasetat (Histidin), dietil-pirokarbonat (DEPC, Histidin), N- α -p-tosil-L-lizin kloro-metil keton (TLCK, Histidin), fenilglioksal (Arginin), N-etil-5-fenil-izookzasolium-3'-sülfonat yada Woodward K reaktifi (Aspartat), iyodoasetik asit, iyodoasetimidat ve N-etilmaleimidat (Sistein) 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisinde çözülerek stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan inhibitörler reaksiyon ortamında 1, 2 ve 4 mM konsantrasyonlarında olacak şekilde 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisi ile seyreltilmişlerdir. Bütün inhibitörler kullanım sırasında taze olarak hazırlanmışlardır.

0.05 ml enzim çözeltisi (2029.63 U mg⁻¹ spesifik aktivite, 0.082 mg ml⁻¹ protein) 0.440 ml 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ve 0.01 ml inhibitör çözeltisi ile karıştırılarak 30°C'da 0, ½ ve 1 saat süre ile inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi bulunduran reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Süre bitiminde 2.5 ml 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisinde hazırlanmış % 0.6'lık kazein çözeltisi ilave edilen reaksiyon karışımları 20 dakika süre ile 30°C'da inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda farklı inhibitör konsantrasyonlarını bulunduran enzim çözeltilerinin aktivitesi bölüm 3.1.5'de verilen alkalin proteaz aktivitesi tayin yöntemine göre belirlenmiştir. Enzimin kalan aktivitesi inhibitör bulundurmeyen enzim çözeltisinin aktivitesi % 100 kabul edilerek % kalan aktivite olarak hesaplanmıştır.

3.3.9. *Bacillus marmariensis* GMBE 72'den saflaştırılan alkalin proteaz enziminin aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisinin belirlenmesi

Alkalin proteaz enzimi üzerine şelat oluşturucu ajan EDTA'nın etkisi Singh ve diğ., [8] ve Bayouhd ve diğ., [51]'ne göre belirlenmiştir.

5 ve 10 mM EDTA bulunduran 0.5 ml enzim çözeltisi (2055.61 U mg⁻¹ spesifik aktivite, 0.0874 mg ml⁻¹ protein) üzerine 2.5 ml 5 ve 10 mM EDTA bulunduran ve 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisinde hazırlanmış % 0.6'lık kazein çözeltisinden ilave edilen reaksiyon karışımları 20 dakika süre ile 30°C'da inkübe edilmişlerdir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi bulunduran reaksiyon karışımı kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda farklı EDTA konsantrasyonlarını bulunduran enzim çözeltilerinin aktivitesi bölüm 3.1.5'de verilen alkalin proteaz aktivite tayin yöntemine göre belirlenmiştir. Enzim aktivitesi EDTA bulundurmeyen enzim çözeltisinin aktivitesi % 100 kabul edilerek % kalan aktivite olarak hesaplanmıştır.

3.3.10. *Bacillus marmariensis* GMBE 72'den saflaştırılan serbest alkalen proteaz üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi

Alkalen proteaz aktivitesi üzerine CaCl_2 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ iki değerlikli metal iyonlarının etkisi bu iyonların enzim ve substrat çözeltisi içerisinde 5 mM konsantrasyonlarında ilavesi ile Kazan ve diğ., [41]'ne göre belirlenmiştir.

5 mM metal iyonu bulunduran 0.5 ml enzim çözeltisi ($2029.63 \text{ U mg}^{-1}$ spesifik aktivite, 0.082 mg ml^{-1} protein) üzerine 5 mM metal iyonu bulunduran % 0.6'lık kazein çözeltisinden ilave edilerek reaksiyon çözeltileri 20 dakika süre ile 30 ve 60°C sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi bulunduran reaksiyon karışımı kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda reaksiyon çözeltilerindeki kalan enzim aktivitesi bölüm 3.1.5'de verilen alkalen proteaz aktivite tayin yöntemi kullanılarak ve her iki sıcaklıkta da metal iyonu bulundurmayan enzim çözeltisinin aktivitesi % 100 kabul edilerek % kalan aktivite olarak belirlenmiştir.

3.3.11. *Bacillus marmariensis* GMBE 72'den saflaştırılan serbest alkalen proteaz üzerine yüzey aktif ajanların etkisinin belirlenmesi

Alkalen proteaz aktivitesi üzerine % 0.2 (a/h) sodyum dodesilsülfat (SDS), %2 (a/h) Tween-20, Tween-40, Tween-60 ve Tween-80 yüzey aktif ajanlarının etkisi bu ajanlar varlığında enzimin 1 saat süre ile 30 ve 60°C 'da inkübasyonunu takiben, [41], reaksiyon çözeltilerindeki enzim aktivitesinin bölüm 3.1.5'de verilen alkalen proteaz aktivitesi tayin yöntemi ile belirlenmesi vasıtasıyla incelenmiştir. SDS ve Tween 20, 40, 60, 80 sırasıyla anyonik ve non-iyonik yüzey aktif ajanlarının varlığında enzim aktivitesinin belirlenmesi amacı ile ayrı yöntemler kullanılmıştır.

SDS olması halinde; 1ml % 0.4'lük SDS üzerine 1 ml enzim çözeltisi ($2029.63 \text{ U mg}^{-1}$ spesifik aktivite, 0.082 mg ml^{-1} protein) ilave edilerek karışım 30 ve 60°C 'da 1 saat süre ile inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi bulunduran reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Süre

bitiminde karışımdan 0.5 ml alınarak üzerine 2.5 ml 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisinde hazırlanmış % 0.6'lık kazein çözeltisinden ilave edilmiştir. Reaksiyon çözeltisinin aktivitesi bölüm 3.1.5'de verilen alkalen proteaz aktivitesi tayin yöntemi kullanılarak ve % 0.4'lük SDS bulundurmayan enzim çözeltisinin aktivitesi % 100 kabul edilerek % kalan aktivite olarak hesaplanmıştır.

Tween 20, 40, 60, 80 olması halinde; 0.05 ml enzim çözeltisi (2029.63 U mg⁻¹ spesifik aktivite, 0.082 mg ml⁻¹ protein) üzerine 0.45 ml 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisinde hazırlanmış non-iyonik yüzey aktif ajandan ilave edilerek karışım 30 ve 60°C'da 1 saat süre ile inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi bulunduran reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Süre bitiminde reaksiyon karışımı üzerine 2.5 ml 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisinde hazırlanmış % 0.6'lık kazein çözeltisinden ilave edilerek reaksiyon karışımının aktivitesi bölüm 3.1.5'de verilen alkalen proteaz aktivitesi tayin yöntemine göre ve yüzey aktif ajan bulundurmayan enzim çözeltisinin aktivitesi % 100 kabul edilerek % kalan aktivite olarak hesaplanmıştır.

3.3.11.1. *Bacillus marmariensis* GMBE 72'den saflaştırılan alkalen proteazın %2 Tween-20 varlığında termal inaktivasyon kinetiğinin incelenmesi

0.5 ml enzim çözeltisi (2672.39 U mg⁻¹ spesifik aktivite, 0.052 mg ml⁻¹ protein) 30-55°C arasındaki sıcaklık değerlerinde 0-180 dakika zaman aralığında 30 dakika 60°C'da 0-6 dakika zaman aralığında birer dakika artan süreler ile % 2 (a/h) Tween-20 varlığında inkübe edilmiş süre bitiminde inkübasyondan alınan enzim çözeltisinin üzerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisinde hazırlanmış 2.5 ml % 0.6'lık kazein çözeltisinden ilave edilerek reaksiyon karışımının 30°C'da 20 dakika süre ile inkübasyonuna devam edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir sıcaklık değerine karşılık gelen enzim aktivitesi bölüm 3.1.5'de verilen alkalen proteaz aktivite tayin yöntemine göre belirlenmiştir.

Değişen zaman aralıklarında inkübe edilen ve % 2 Tween-20 bulunduran enzim çözeltisinin aktivitesi (E_i) ve % 2 Tween-20 bulunduran enzim çözeltisinin başlangıç aktivitesi (E₀) belirlendikten sonra birinci mertebe tersinmez inaktivasyon kinetiğini

ifade eden $\ln(E_i / E_0) = -k_i \cdot t$ denklemi gereğince t'ye (zaman) karşı $\ln(E_i / E_0)$ değerleri işaretlenmiştir. Elde edilen doğrunun eğiminden % 2 Tween-20 bulunduran enzim çözeltisinin artan sıcaklık değerlerindeki tersinmez termal inaktivasyon hız sabiti değerleri (k_i) hesaplanmıştır.

3.3.11.2. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının % 2 Tween-20 varlığında termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesi

% 2 Tween-20 varlığında alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi Arrhenius lineer grafiğinin eğiminden belirlenmiştir. Bölüm 3.3.11.1'de verilen termal inaktivasyon kinetiği çalışmasında her bir sıcaklık değeri için elde edilen inaktivasyon hız sabiti değerlerinin logaritmasının ($\ln k_i$) mutlak sıcaklığın resiprokal ($1/T$), (K^{-1}), değerlerine karşı çizilmesi ile oluşturulan lineer doğrunun eğiminden % 2 Tween-20 varlığında alkalen proteaz enziminin inaktivasyonunun aktivasyon enerjisi ($E_{a,i}$) değeri hesaplanmıştır.

3.3.11.3. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının % 2 Tween-20 varlığında termal inaktivasyonuna ilişkin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

% 2 Tween-20 içeren enzimin 30, 40, 45, 50, 55 ve 60°C sıcaklık değerleri için hesaplanan inaktivasyon hız sabiti (k_i) değerleri (2.14) denkleminde yerine koyularak her bir sıcaklık değeri için % 2 Tween-20 içeren enzimin inaktivasyonunun aktivasyon serbest enerjisi (ΔG_i) hesaplanmıştır. Bölüm 3.3.11.2'de hesaplanan % 2 Tween-20 içeren alkalen proteaz enziminin inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi ($E_{a,i}$) değeri (2.13) denkleminde yerine koyularak her bir sıcaklık değeri için % 2 Tween-20 içeren enzimin inaktivasyonunun entalpisi (ΔH_i) hesaplanmıştır. Her bir sıcaklık değeri için hesaplanan ΔG_i ve ΔH_i değerleri (2.15) denkleminde yerine koyularak her bir sıcaklık değerlerine karşılık gelen % 2 Tween-20 içeren enzimin inaktivasyonunun entropisi (ΔS_i) hesaplanmıştır.

3.3.11.4. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının % 2 Tween-20 varlığında kazein hidrolizine ilişkin kinetik parametrelerinin belirlenmesi

Alkaleen proteaz enziminin % 2 Tween-20 varlığında kazein hidrolizinin kinetik parametreleri (K_m , V_m) Lineweaver-Burk diyagramı oluşturularak belirlenmiştir.

Substrat çözeltileri reaksiyon ortamındaki başlangıç substrat konsantrasyonu; 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ve 3.0 mM kazein olacak şekilde ve % 2 Tween-20 bulduran 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisinde çözülerek hazırlanmıştır. Yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanmış 2.5 ml substrat çözeltisi ile 0.5 ml uygun oranda seyreltilmiş enzim çözeltisi (2672.39 U mg^{-1} spesifik aktivite, 0.052 $mg\ ml^{-1}$ protein) karıştırılarak 30°C'daki su banyosunda 3 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi bulduran reaksiyon karışımı kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda farklı substrat konsantrasyonlarındaki enzim çözeltisinin başlangıç hızları bölüm 3.1.5'de verilen alkaleen proteaz aktivitesi tayin yöntemine göre belirlenmiştir. Daha sonra başlangıç substrat konsantrasyonlarının resiprokal değerlerine ($1/[S]$) karşı başlangıç hızlarının resiprokal değerleri ($1/v$) işaretlenerek Lineweaver-Burk diyagramı oluşturulmuş elde edilen lineer doğrunun eğiminden ve y eksenini kesim noktasından enzimin kazein hidrolizinin K_m , V_m değerleri ve bu değerler yardımı ile de k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri hesaplanmıştır. k_{cat} hesaplamasında kullanılan $[E_t] = 2.14 \times 10^{-3}$ μM olarak alınmıştır.

3.3.12. *Bacillus marmariensis* GMBE 72'den saflaştırılan serbest alkaleen proteaz enzimi üzerine hidrojen peroksit etkisinin incelenmesi

Alkaleen proteaz aktivitesi üzerine %0, %5 ve %10 konsantrasyonlarındaki hidrojen peroksit (H_2O_2)'in etkisi hidrojen peroksit bulduran reaksiyon karışımının 30 ve 40°C sıcaklıklarda ve 0-75 dakika arasında değişen sürelerde inkübasyonu ile Kazan ve diğ., [41]'ne göre belirlenmesi vasıtası ile incelenmiştir.

0.05 ml enzim çözeltisi (2029.63 U mg^{-1} spesifik aktivite, 0.082 $mg\ ml^{-1}$ protein) üzerine 0.45 ml hidrojen peroksit ilave edilerek karışım 30 ve 40°C sıcaklıklarda ve

0-75 dakika arasında değişen sürelerde inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi bulduran reaksiyon karışımı kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda karışım üzerine 2.5 ml 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisinde hazırlanmış % 0.6'lık kazein çözeltisinden ilave edilerek reaksiyon karışımı 30°C'da 20 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Reaksiyon karışımının aktivitesi bölüm 3.1.5'de verilen alkalen proteaz aktivitesi tayin yöntemi kullanılarak ve hidrojen peroksit buldurmeyen enzim çözeltisinin aktivitesi % 100 kabul edilerek % kalan aktivite olarak hesaplanmıştır.

3.4. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 Alkalen Proteazının Cu²⁺ İyonları Yokluğunda ve Varlığında Termal İnaktivasyon Kinetiğinin İncelenmesi

3.4.1. Cu²⁺ içermeyen *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının termal inaktivasyon kinetiğinin incelenmesi

Cu²⁺ metal iyonlarının stabilizasyon etkisinin değerlendirilmesi amacı ile öncelikle metal iyonu buldurmeyen enzim çözeltisinin termal inaktivasyon kinetiği çalışılmıştır.

0.5 ml enzim çözeltisi (2234.23 U mg⁻¹ spesifik aktivite, 0.096 mg ml⁻¹ protein) 30, 40, 45, 50 ve 55°C'deki sıcaklık değerlerinde 0-180 dakika zaman aralığında 30 dakika, 60°C'da 0-120 dakika zaman aralığında 15 dakika, 65°C'da 0-75 dakika zaman aralığında 15 dakika, 70°C'da 0-7 dakika zaman aralığında birer dakika artan süreler ile inkübe edilmiş süre bitiminde inkübasyondan alınan enzim çözeltisinin üzerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisinde hazırlanmış 2.5 ml % 0.6'lık kazein çözeltisinden ilave edilerek reaksiyon karışımının 30°C'da 20 dakika süre ile inkübasyonuna devam edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir sıcaklık değerine karşılık gelen enzim aktivitesi bölüm 3.1.5'de verilen alkalen proteaz aktivite tayin yöntemine göre belirlenmiştir.

Değişen zaman aralıklarında inkübe edilen enzim çözeltisinin aktivitesi (E_i) ve enzimin başlangıç aktivitesi (E₀) belirlendikten sonra birinci merteye tersinmez inaktivasyon kinetiğini ifade eden $\ln (E_i / E_0) = - k_i \cdot t$ denklemi gereğince t'ye

(zaman) karşı $\ln (E_i / E_0)$ değerleri işaretlenmiştir. Elde edilen doğruların eğiminden enzimin artan sıcaklık değerlerine karşılık gelen tersinmez termal inaktivasyon hız sabiti (k_i) değerleri hesaplanmıştır.

3.4.2. Cu^{2+} içermeyen *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesi

Serbest alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonunun aktivasyon enerjisi Arrhenius lineer grafiğinin eğiminden belirlenmiştir. Bölüm 3.4.1'deki termal inaktivasyon kinetiği çalışmasında her bir sıcaklık değeri için elde edilen inaktivasyon hız sabiti değerlerinin logaritmasının ($\ln k_i$) mutlak sıcaklığın resiprokal ($1/T$), (K^{-1}) değerlerine karşı çizilmesi ile oluşturulan lineer doğrunun eğiminden serbest alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi ($E_{a,i}$) değeri hesaplanmıştır.

3.4.3. Cu^{2+} içermeyen *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının termal inaktivasyonuna ilişkin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

Enzimin kazein hidrolizinin 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70°C sıcaklık değerleri için bölüm 3.4.1'de hesaplanan inaktivasyon hız sabiti (k_i) değerleri (2.14) denkleminde yerine koyularak her bir sıcaklık için enzimin inaktivasyonunun aktivasyon serbest enerjisi (ΔG_i) hesaplanmıştır. Bölüm 3.4.2'de hesaplanan alkalen proteaz enziminin inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi ($E_{a,i}$) değeri (2.13) denkleminde yerine koyularak her bir sıcaklık değeri için enzimin inaktivasyonunun entalpisi (ΔH_i) hesaplanmıştır. Her sıcaklık değeri için hesaplanan ΔG_i ve ΔH_i değerleri de (2.15) denkleminde yerine koyularak yine her bir sıcaklık değerine karşılık gelen enzimin inaktivasyonunun entropisi (ΔS_i) hesaplanmıştır.

3.4.4. Cu²⁺ içermeyen *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının artan sıcaklık değerlerindeki kazein hidrolizine ilişkin kinetik parametrelerinin belirlenmesi

Alkalen proteaz enziminin 30, 40, 45, 50, 55, 60, 62.5, 65, 67.5 ve 70°C'da artan sıcaklık değerlerine karşılık gelen kazein hidrolizinin kinetik parametreleri (K_m , V_m) Lineweaver-Burk diyagramları oluşturularak belirlenmiştir.

Substrat çözeltisi reaksiyon ortamındaki başlangıç substrat konsantrasyonu; 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 6.0 mM kazein olacak şekilde 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisinde çözülerek hazırlanmıştır. Yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanmış 2.5 ml substrat çözeltisi ile 0.5 ml uygun oranda seyreltilmiş enzim çözeltisi (spesifik aktivite 709.89 U mg⁻¹, protein 0.096 mg ml⁻¹) karıştırılarak 30, 40, 45, 50, 55, 60, 62.5 65, 67.5 ve 70°C'daki su banyosunda 3 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi bulunduran reaksiyon karışımı kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda farklı substrat konsantrasyonlarındaki enzim çözeltisinin başlangıç hızları bölüm 3.1.5'de verilen alkalen proteaz aktivitesi tayin yöntemine göre belirlenmiştir.

Daha sonra başlangıç substrat konsantrasyonlarının resiprokal değerlerine ($1/[S]$) karşı başlangıç hızlarının resiprokal değerleri ($1/v$) işaretlenerek her bir sıcaklık değerine karşılık gelen Lineweaver-Burk diyagramı oluşturulmuş elde edilen lineer doğruların eğiminden ve y eksenini kesim noktalarından da enzimin artan sıcaklık değerlerinde kazein hidrolizinin K_m , V_m kinetik parametreleri ve bu veriler yardımı ile de k_{cat} ve k_{cat} / K_m değerleri hesaplanmıştır.

3.4.5. Cu²⁺ içermeyen *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının artan sıcaklık değerlerindeki kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

Enzimin 30, 40, 45, 50, 55, 60, 62.5, 65, 67.5 ve 70°C sıcaklık değerleri için bölüm 3.4.4'de hesaplanan k_{cat} değerleri kullanılarak kazein hidrolizinin aktivasyon serbest

enerjisi (ΔG^\ddagger) (2.16) deklemine göre hesaplanmıştır. Ln v değerlerine karşı her bir sıcaklığın resiprokal değerleri ($1/T$) işaretlenerek çizilmiş doğrunun eğiminden hesaplanmış olan enzim için Arrhenius aktivasyon enerjisi değeri kullanılarak kazein hidrolizinin aktivasyon entalpisi (ΔH^\ddagger) (2.17) denklemince hesaplanmıştır. Hesaplanan ΔG^\ddagger ve ΔH^\ddagger değerleri (2.18) denkleminde yerine koyularak kazein hidrolizinin aktivasyon entropisi (ΔS^\ddagger) hesaplanmıştır.

Farklı sıcaklıklarda bulunan K_m değerleri ve hesaplanmış olan k_{cat} değerleri (2.19) denkleminde yerine koyularak enzimin geçiş (tranzisyon) hali bağlama serbest enerjisi (ΔG_{E-T}^\ddagger) hesaplanmıştır. Substrat bağlanmanın serbest enerjisi (ΔG_{E-S}) ise farklı sıcaklıklarda bulunan ve bu sıcaklık değerlerine ait K_m değerlerinin (2.20) denkleminde yerine koyulmasıyla hesaplanmıştır.

3.4.6. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazı üzerinde en yüksek stabilizasyon etkisi gösteren Cu^{2+} iyonu konsantrasyonunun belirlenmesi

Divalent metal iyonları ile yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar enzim aktivitesi üzerinde en yüksek stabilizasyon etkisi yaratan metal iyonunun Cu^{2+} olduğunu göstermektedir. Bu iyonun en yüksek stabilizasyon etkisi gösterdiği optimum metal iyonu konsantrasyonunun belirlenmesi amacı ile 1 ile 10 mM aralığında artan konsantrasyonlardaki metal iyonunu bulunduran enzim çözeltilerinin bölüm 3.1.5'de verilen alkalen proteaz aktivitesi tayin yöntemi ile aktiviteleri tayin edilmiştir.

0.05 ml belirtilen konsantrasyonda metal iyonu bulunduran enzim çözeltisi (spesifik aktivite $2055.61 \text{ U mg}^{-1}$, protein $0.0874 \text{ mg ml}^{-1}$) üzerine enzim çözeltisi ile aynı konsantrasyonda metal iyonu bulunduran % 0.6'lık kazein çözeltisinden ilave edilerek reaksiyon karışımları 20 dakika süre ile inkübe edilmişlerdir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi bulunduran reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Süre bitiminde reaksiyon karışımlarının aktivitesi bölüm 3.1.5'de verilen alkalen proteaz aktivitesi tayin yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve artan konsantrasyonlarda metal iyonu bulunduran enzim çözeltisinin aktivitesi metal iyonu bulundurmeyen enzim çözeltisinin aktivitesine oranlanarak % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır.

3.4.7. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazıyla 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında kazein hidrolizinin aktivasyon enerjisinin belirlenmesi

Alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında kazein hidrolizinin aktivasyon enerjisi Arrhenius lineer grafiğinin eğiminden belirlenmiştir. Bölüm 3.3.2’de verilen 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında optimum sıcaklık çalışmasında her bir sıcaklık değeri için elde edilen aktivite değerlerinin logaritmasının (ln v) mutlak sıcaklığın resiprokal (1/T), (K⁻¹) değerlerine karşı çizilmesi ile oluşturulan doğrunun eğiminden Cu²⁺ iyonları varlığında alkalen proteaz enziminin kazein hidrolizinin aktivasyon enerjisi (E_a) hesaplanmıştır.

3.4.8. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazıyla 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında kazein hidrolizinin kinetik parametrelerinin belirlenmesi

Alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında kazein hidrolizinin kinetik parametreleri (K_m, V_m) Lineweaver-Burk diyagramı oluşturularak belirlenmiştir.

Substrat çözeltisi reaksiyon ortamındaki başlangıç substrat konsantrasyonu; 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 6.0 mM kazein olacak şekilde 4 mM Cu²⁺ iyonlarını bulduran 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisinde çözülerek hazırlanmıştır. Yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanmış 2.5 ml substrat çözeltisi ile 4 mM Cu²⁺ iyonlarını bulduran 0.5 ml uygun oranda seyreltilmiş enzim çözeltisi (spesifik aktivite 709.89 U mg⁻¹, protein 0.096 mg ml⁻¹) karıştırılarak 30°C’deki su banyosunda 3 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 4 mM Cu²⁺ iyonlarını içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi bulduran reaksiyon karışımı kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda farklı substrat konsantrasyonlarındaki enzim çözeltisinin başlangıç hızları bölüm 3.1.5’de verilen alkalen proteaz aktivitesi tayin yöntemine göre belirlenmiştir. Daha sonra başlangıç substrat konsantrasyonlarının resiprokal değerlerine (1/[S]) karşı başlangıç hızlarının resiprokal değerleri (1/v) işaretlenerek Lineweaver-Burk diyagramı oluşturulmuş elde edilen lineer doğrunun eğiminden ve y eksenini kesim noktasından 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında enzimin kazein hidrolizinin K_m, ve V_m kinetik parametreleri; bu parametreler yardımı ile de k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri hesaplanmıştır.

3.4.9. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında termal inaktivasyon kinetiğinin incelenmesi

Cu²⁺ iyonlarının stabilizasyon etkisinin değerlendirilmesi amacı ile 4 mM Cu²⁺ iyonu bulduran enzim çözeltilisinin termal inaktivasyon kinetiği çalışılmıştır. 0.5 ml enzim çözeltilisi (spesifik aktivite 2234.23 U mg⁻¹, protein 0.096 mg ml⁻¹) 30-55°C arasındaki sıcaklık değerlerinde 0-180 dakika zaman aralığında 30 dakika 60°C'da 0-6 dakika zaman aralığında birer dakika artan süreler ile inkübe edilmiş süre bitiminde inkübasyondan alınan enzim çözeltilisinin üzerine 4 mM Cu²⁺ metal iyonu bulduran 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltilisinde hazırlanmış 2.5 ml % 0.6'lık kazein çözeltilisinden ilave edilerek reaksiyon karışımının 30°C'da 20 dakika süre ile inkübasyonuna devam edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir sıcaklık değerine karşılık gelen aktivite değeri bölüm 3.1.5'de verilen alkalen proteaz aktivitesi tayin yöntemine göre belirlenmiştir.

Değişen zaman aralıklarında inkübe edilen ve 4 mM Cu²⁺ iyonlarını bulduran enzim çözeltilisinin aktivitesi (E_i) ve 4 mM Cu²⁺ iyonlarını bulduran enzim çözeltilisinin başlangıç aktivitesi (E₀) belirlendikten sonra birinci mertebe tersinmez inaktivasyon kinetiğini ifade eden $\ln (E_i / E_0) = - k_i \cdot t$ denklemi gereğince t'ye (zaman) karşı $\ln (E_i / E_0)$ değerleri işaretlenmiştir. Elde edilen doğrunun eğiminden de 4 mM Cu²⁺ iyonlarını bulduran enzim çözeltilisinin artan sıcaklık değerlerindeki tersinmez termal inaktivasyon hız sabiti değerleri (k_i) hesaplanmıştır.

3.4.10. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında termal inaktivasyonunun aktivasyon enerjisinin belirlenmesi

4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonunun aktivasyon enerjisi Arrhenius lineer grafiğinin eğiminden belirlenmiştir. Bölüm 3.4.9'da verilen termal inaktivasyon kinetiği çalışmasında her bir sıcaklık değeri için elde edilen inaktivasyon hız sabiti değerlerinin logaritmasının ($\ln k_i$) mutlak sıcaklığın resiprokal (1/T), (K⁻¹) değerlerine karşı çizilmesi ile oluşturulan lineer doğrunun eğiminden 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında alkalen proteaz enziminin inaktivasyonunun aktivasyon enerjisi (E_{a,i}) değeri hesaplanmıştır.

3.4.11. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında termal inaktivasyonuna ilişkin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

4 mM Cu²⁺ iyonları içeren enzimin 30, 40, 45, 50, 55 ve 60°C sıcaklık değerleri için hesaplanan inaktivasyon hız sabiti (k_i) değerleri (2.14) denkleminde yerine koyularak her bir sıcaklık değeri için 4 mM Cu²⁺ iyonları içeren enzimin inaktivasyonunun aktivasyon serbest enerjisi (ΔG_i) hesaplanmıştır.

Bölüm 3.4.10'da hesaplanan 4 mM Cu²⁺ iyonları içeren alkalen proteaz enziminin inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi ($E_{a,i}$) değeri (2.13) denkleminde yerine koyularak her bir sıcaklık değeri için 4 mM Cu²⁺ iyonları içeren enzimin inaktivasyonunun entalpisi (ΔH_i) hesaplanmıştır. Her bir sıcaklık değeri için hesaplanan ΔG_i ve ΔH_i değerleri (2.15) denkleminde yerine koyularak her bir sıcaklık değerlerine karşılık gelen 4 mM Cu²⁺ iyonları içeren enzimin inaktivasyonunun entropisi (ΔS_i) hesaplanmıştır.

3.4.12. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında artan sıcaklık değerlerindeki kazein hidrolizine ilişkin kinetik parametrelerinin belirlenmesi

Alkalin proteaz enziminin 30, 40, 45, 50, 52.5, 55, 57.5, 60, 62.5 ve 65°C'da artan sıcaklık değerlerine karşılık gelen kazein hidrolizinin kinetik parametreleri (K_m , V_m) Lineweaver-Burk diyagramları oluşturularak belirlenmiştir. Substrat çözeltisi reaksiyon ortamındaki başlangıç substrat konsantrasyonu; 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 6.0 mM kazein olacak şekilde 4 mM Cu²⁺ iyonları bulunduran 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanmış 2.5 ml substrat çözeltisi ile 0.5 ml uygun oranda seyreltilmiş enzim çözeltisi (spesifik aktivite 709.89 U mg⁻¹, protein 0.096 mg ml⁻¹) karıştırılarak 30, 40, 45, 50, 52.5, 55, 57.5, 60, 62.5 ve 65°C'daki su banyosunda 3 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi bulunduran reaksiyon

karışımı kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda farklı substrat konsantrasyonlarındaki enzim çözeltilisinin başlangıç hızları bölüm 3.1.5’de verilen alkalen proteaz aktivitesi tayin yöntemine göre belirlenmiştir.

Daha sonra başlangıç substrat konsantrasyonlarının resiprokal değerlerine ($1/[S]$) karşı başlangıç hızlarının resiprokal değerleri ($1/v$) işaretlenerek her bir sıcaklık değerine karşılık gelen Lineweaver-Burk diyagramı oluşturulmuş elde edilen lineer doğruların eğiminden ve y eksenini kesim noktalarından da enzimin artan sıcaklık değerlerinde kazein hidrolizinin K_m , V_m kinetik parametreleri ve bu veriler yardımı ile k_{cat} ve k_{cat} / K_m değerleri hesaplanmıştır.

3.4.13. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında artan sıcaklıklardaki kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

4 mM Cu^{2+} iyonları içeren enzimin bölüm 3.4.12’de farklı sıcaklık değerleri için hesaplanan k_{cat} değerleri kullanılarak kazein hidrolizinin aktivasyon serbest enerjisi (ΔG^\ddagger) (2.16) deklemine göre hesaplanmıştır. Bölüm 3.4.7’de $\ln v$ değerlerine karşı her bir sıcaklığın resiprokal değerleri ($1/T$) işaretlenerek çizilen doğrunun eğiminden hesaplanan 4 mM Cu^{2+} iyonlarını içeren enzim için Arrhenius aktivasyon enerjisi değeri kullanılarak kazein hidrolizinin aktivasyon entalpisi (ΔH^\ddagger) (2.17) denklemince hesaplanmıştır. Hesaplanan ΔG^\ddagger ve ΔH^\ddagger değerleri (2.18) denkleminde yerine koyularak kazein hidrolizinin aktivasyon entropisi (ΔS^\ddagger) hesaplanmıştır.

Farklı sıcaklık değerleri için Lineweaver-Burk diyagramlarından hesaplanan K_m değerleri ile k_{cat} değerleri (2.19) denkleminde yerine koyularak enzimin geçiş (tranzisyon) hali bağlama serbest enerjisi (ΔG_{E-T}^\ddagger) 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında hesaplanmıştır. Substrat bağlanmanın serbest enerjisi (ΔG_{E-S}) ise farklı sıcaklıklarda bulunan K_m değerlerinin (2.20) denkleminde yerine koyulmasıyla hesaplanmıştır.

3.4.14. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının 4 mM Cu²⁺ iyonları ile aktivasyonuna ilişkin kinetik parametrelerin belirlenmesi

4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında alkalen proteaz enziminin artan sıcaklık değerlerindeki görünen K_m ve V_m değerleri bölüm 3.4.12’de açıklandığı şekilde Lineweaver-Burk diyagramı oluşturularak belirlenmiştir.

3.4.15. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının 4 mM Cu²⁺ yokluğunda ve varlığında otokatalitik hidrolizinin (otokatalitik inaktivasyonunun ya da otoproteolizinin) incelenmesi

Alkalen proteazın otokatalitik hidrolizi Coomasie Blue Boyası bağlama yöntemi ile bölüm 3.1.6’da anlatıldığı şekilde 4 mM Cu²⁺ yokluğunda ve varlığında protein konsantrasyonu tayini yapılarak belirlenmiştir.

4 mM Cu²⁺ iyonları içermeyen enzim çözeltisinden (spesifik aktivite 1914 U mg⁻¹ ve protein 0.047 mg ml⁻¹) 1 ml alınarak 30, 40, 45, 50 ve 55°C sıcaklık aralığında 0 ile 180 dakika zaman aralığında 30 dakika, 60°C’da 0 ile 120 dakika zaman aralığında 30 dakika, 65°C’da 0 ile 50 dakika zaman aralığında 10 dakika, 70°C’da 0 ile 10 dakika zaman aralığında 1 dakika artan süreler ile inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 1 ml saf su kullanılmıştır.

Su banyosunda farklı sıcaklık ve sürelerde inkübe edilmiş ve oda sıcaklığına getirilmiş Cu²⁺ iyonu bulundurmayan enzim çözeltisinin Coomasie Blue Boyası bağlama yöntemiyle bölüm 3.1.6’da anlatıldığı şekilde protein konsantrasyonu tayin edilmiştir.

Aynı deney 4 mM Cu²⁺ iyonları içeren alkalen proteaz enzim çözeltisi için de tekrarlanmıştır. 4 mM Cu²⁺ iyonları içeren enzim çözeltisinden (spesifik aktivite 1914 U mg⁻¹ ve protein 0.047 mg ml⁻¹) 1 ml alınarak 30, 40, 45 ve 50°C sıcaklık aralığında 0 ile 180 dakika zaman aralığında 30 dakika, 55°C’da 0 ile 120 dakika zaman aralığında 30 dakika, 60°C’da 0 ile 6 dakika zaman aralığında 1 dakika artan süreler ile inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine son konsantrasyonu 4

mM Cu²⁺ iyonlarını bulunduran 1 ml saf su kullanılmıştır. Su banyosunda farklı sıcaklık ve sürelerde inkübe edilmiş ve oda sıcaklığına getirilmiş metal iyonu bulunduran enzim çözeltisinin Coomassie Blue Boyası bağlama yöntemiyle bölüm 3.1.6'da anlatıldığı şekilde protein konsantrasyonu tayin edilmiştir.

4 mM Cu²⁺ iyonları bulundurmeyen ve bulunduran enzim çözeltilerinin farklı süreler ve sıcaklıklardaki inkübasyonlar sonunda belirlenen protein konsantrasyonu C_i başlangıç protein konsantrasyonu C₀ olarak kabul edilip Ln(C_i/C₀) değerlerine karşı zamanın işaretlenmesinden elde edilen grafik ile enzimin birinci mertebeden mekanizmayla Ln (C_i/C₀) = - k_i . t denklemi gereğince otokatalitik hidrolize uğradığı gözlenmiştir. Grafikte elde edilen lineer doğruların eğiminden her bir sıcaklık değeri için enzimin otokatalitik hidroliz hız sabiti hesaplanmıştır. Ayrıca yine her bir sıcaklık değeri için C₀ = 2C_i eşitliği gereğince enzimin otokatalitik hidrolizin yarılanma ömrü değeri belirlenmiştir. 4 mM Cu²⁺ iyonlarının enzim üzerindeki stabilizasyon derecesini belirlemek amacı ile her bir sıcaklık değeri için stabilizasyon faktörü değeri de SF=[t_{1/2}]_{Cu²⁺-AP} : [t_{1/2}]_{AP} bağıntısından hesaplanmıştır.

3.4.16. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının 4 mM Cu²⁺ iyonları yokluğunda ve varlığında otokatalitik hidrolizinin inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesi

Bölüm 3.4.15'deki otokatalitik hidroliz çalışmasında her bir sıcaklık değeri için elde edilen otokatalitik hidroliz inaktivasyon hız sabiti değerlerinin logaritmasının (ln k_i) mutlak sıcaklığın resiprokal (1/T), (K⁻¹) değerlerine karşı çizilmesi ile oluşturulan lineer doğrunun eğiminden alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları yokluğunda ve varlığında otokatalitik hidrolizinin inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi (E_{a,i}) değeri hesaplanmıştır.

3.4.17. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının 4 mM Cu²⁺ iyonları yokluğunda ve varlığında otokatalitik hidrolizinin inaktivasyonuna ilişkin termodinamik parametrelerin belirlenmesi

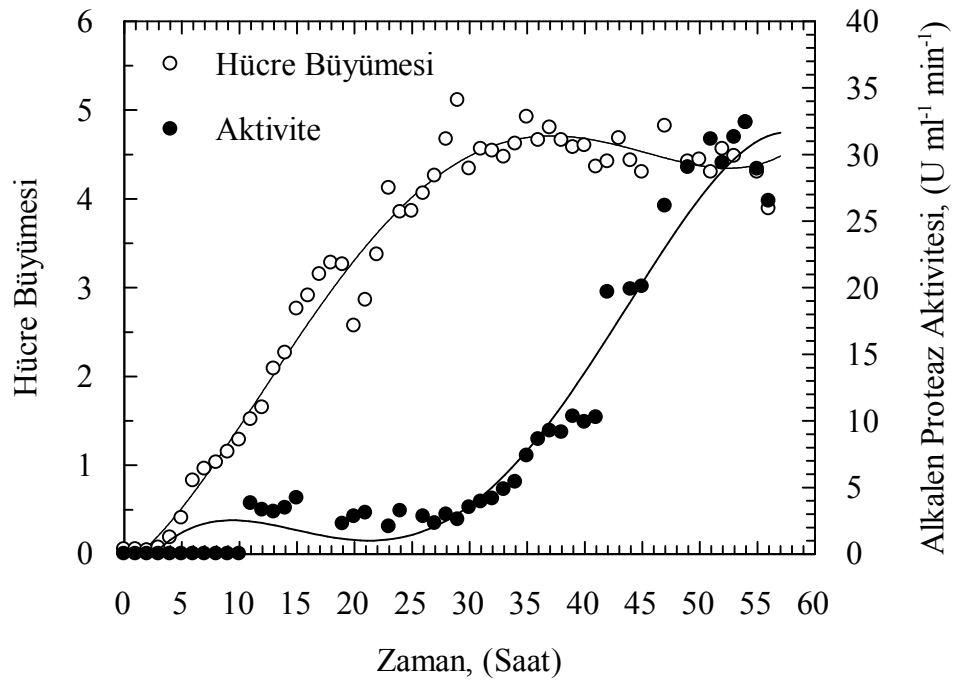
Serbest enzimin 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70°C ve 4 mM Cu²⁺ iyonları içeren enzimin 30, 40, 45, 50, 55 ve 60°C sıcaklık değerleri için hesaplanan inaktivasyon hız sabiti (k_i) değerleri (2.14) denkleminde yerine koyularak her bir sıcaklık değeri için alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları yokluğunda ve varlığında otokatalitik hidrolizinin inaktivasyonuna ilişkin inaktivasyon serbest enerjisi (ΔG_i) değeri hesaplanmıştır.

Bölüm 3.4.16'da hesaplanan 4 mM Cu²⁺ iyonları yokluğunda ve varlığında alkalen proteaz enziminin otokatalitik hidrolizinin Arrhenius aktivasyon enerjisi ($E_{a,i}$) değeri (2.13) denkleminde yerine koyularak her bir sıcaklık değeri için 4 mM Cu²⁺ iyonları yokluğunda ve varlığında enzimin otokatalitik inaktivasyonunun entalpisi (ΔH_i) hesaplanmıştır. Her bir sıcaklık değeri için hesaplanan ΔG_i ve ΔH_i değerleri (2.15) denkleminde yerine koyularak sıcaklık değerlerine karşılık gelen 4 mM Cu²⁺ iyonları yokluğunda ve varlığında enzimin otokatalitik inaktivasyonunun entropisi (ΔS_i) hesaplanmıştır.

BÖLÜM 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 Soyundan Alkalin Proteaz Enziminin Üretimi

Bacillus marmariensis GMBE 72 soyu tarafından enzim üretimi aşlamayı takip eden 11. saatte logaritmik fazın başında başlamıştır. Hücre büyümesi uyum fazını (lag faz) takiben üstel olarak devam etmiş ve fermentasyon 32. saatin sonunda stasyoner (durgun) faza girmiştir. Enzim üretimi fermentasyonun 29. saatinden itibaren hızlanmaya başlamış ve 54. saatte stasyoner faza girmiştir. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyu tarafından alkalin proteaz enziminin üretimini ve mikrobiyal büyüme gösteren grafik şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan alkalin proteaz enziminin üretimi ve hücre büyümesi

4.2. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 Soyundan İzole Edilen Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırılması

Bacillus marmariensis GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin kültür üst sıvısından pH 6.5’da % 55 amonyum sülfat doygunluğunda çöktürülmesi vasıtası ile kısmi saflaştırılması basamağı % 61.00 saflaştırma verimi ve 7.00 saflaştırma katsayısı ile takip eden DEAE-selüloz kolon kromatografisiyle ileri derecede saflaştırılması % 31.10 saflaştırma verimi ve 17.00 saflaştırma katsayısı ile gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin her bir saflaştırma adımındaki saflaştırma verimi ve saflaştırma katsayısı

Adım	Saflaştırma Verimi, (%)	Saflaştırma Katsayısı
Kültür üst sıvısı	100.00	1.00
%55 (NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi + diyaliz	61.00	7.00
DEAE-Selüloz kolonun 200 mM tampon çözeltisi ile yıkanmasından toplanan fraksiyonlar	31.10	17.00

İzlenen konvansiyonel saflaştırma basamaklarına ait detaylı sonuçlar bölüm 4.2.1 ve bölüm 4.2.2’de verilmiştir.

4.2.1. Alkalen proteaz enziminin kültür üst sıvısından çöktürülmesi için uygun amonyum sülfat doygunluğu

Kültür üst sıvısında % 50, 55, 60, 65, 70 ve 75 doygunluklarında amonyum sülfat çöktürmeleri denenmiştir. Çöktürmeler kültür üst sıvısı pH değeri pH:9.04’de ve üst sıvı pH değeri pH:6.5’e ayarlanarak yapılmıştır. Her bir % doygunluk değeri için çöktürme işlemleri en az üç kere olacak şekilde tekrarlanmıştır. Yapılan çöktürmelerin toplu sonuçları pH: 9.04 için tablo 4.2, pH: 6.5 için tablo 4.3’de verilmiştir.

Örnek	Hacim (mL)	Aktivite (U ml ⁻¹ dak ⁻¹)	Toplam Aktivite (U dak ⁻¹)	Protein (mg mL ⁻¹)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U mg ⁻¹)	Çöken Enzim (%)	Çöken Protein (%)	S.K.	Çöken Enzim %, (ort.)	Çöken Protein %, (ort.)	S.K* (ort.)
Bulk (pH:9.04)	50	20.68	1034.00	0.09	4.45	232.36	100.00		1.00			
%50	4	18.30	73.20	0.08	0.34	215.29	7.07	7.64	0.92			
Bulk (pH:9.04)	100	35.25	3525.00	0.14	13.7	257.30	100.00		1.00	6.39	8.66	0.61
%50	11	15.70	172.67	0.11	1.24	138.91	4.90	9.05	0.53			
Bulk (pH:9.04)	100	60.00	6000.00	0.15	14.60	410.96	100.00		1.00			
%50	25	17.44	436.00	0.11	2.72	160.00	7.20	9.31	0.39			
Bulk (pH:9.04)	100	36.18	3618.00	0.12	12.10	299.00	100.00		1.00			
%55	9	148.59	1337.31	0.15	1.39	962.09	36.96	11.48	3.22			
%55	9	192.05	1728.45	0.18	1.60	1078.93	47.70	13.22	3.60	41.22	11.62	3.55
Bulk (pH:9.04)	100	20.68	2068.00	0.10	10.42	198.46	100.00		1.00			
%55	7.4	109.42	808.08	0.14	1.06	762.34	39.00	10.17	3.84			
Bulk (pH:9.04)	100	12.83	1283.30	0.09	8.75	141.53	100.00		1.00			
%60	12	53.90	646.74	0.24	2.87	226.45	50.39	32.80	1.60			
%60	18	50.58	910.44	0.18	3.19	285.76	65.26	36.45	1.79			
Bulk (pH:9.04)	100	60.00	6000.00	0.15	14.60	410.96	100.00		1.00			
%60	21.5	194.50	4181.75	0.19	4.23	987.43	69.69	28.97	2.40	60.05	32.64	1.86
Bulk (pH:9.04)	100	20.68	1034.00	0.09	8.75	118.17	100.00		1.00			
%60	12	53.89	646.74	0.24	2.86	226.45	62.54	32.68	1.91			
Bulk (pH:9.04)	100	4.54	454.00	0.11	10.80	42.037	100.00		1.00			
%60	31	7.67	237.77	0.11	3.52	67.55	52.37	32.59	1.60			
Bulk (pH:9.04)	100	71.86	7186.00	0.33	32.90	218.41	100.00		1.00			
%65	50	82.32	4116.00	0.25	12.65	325.37	57.27	38.44	1.48			
Bulk (pH:9.04)	100	43.66	4366.00	0.15	14.60	299.04	100.00		1.00	58.08	45.32	1.29
%65	29	101.66	294.84	0.28	8.09	364.37	67.53	55.41	1.21			
Bulk (pH:9.04)	100	4.54	454.00	0.11	10.80	42.037	100.00		1.00			
%65	29	7.74	224.53	0.16	4.55	49.35	49.45	42.13	1.17			
Bulk (pH:9.04)	100	12.833	1283.30	0.09	8.75	141.53	100.00		1.00			
%70	11	62.093	683.02	0.18	1.97	346.88	53.20	22.51	2.45			
Bulk (pH:9.04)	100	60.00	6000.00	0.15	14.60	410.96	100.00		1.00	57.92	25.21	2.33
%70	26	140.50	3653.00	0.15	3.95	924.81	60.80	27.05	2.25			
Bulk (pH:9.04)	100	32.57	3257.00	0.07	6.90	472.02	100.00		1.00			
%70	30	64.88	1946.40	0.06	1.80	1081.33	59.76	26.08	2.29			
Bulk (pH:9.04)	100	43.66	4366.00	0.15	14.60	299.04	100.00		1.00			
%75	26	99.99	2599.74	0.52	13.52	196.95	59.54	92.60	0.65			
%75	29	80.83	2344.07	0.45	13.05	179.62	53.68	89.38	0.60	60.74	90.84	0.66
%75	20	144.70	2894.49	0.71	14.24	203.26	66.29	97.53	0.67			
Bulk (pH:9.04)	100	13.95	1395.00	0.09	8.75	159.43	100.00		1.00			
%75	10	88.50	885.00	0.73	7.34	120.57	63.44	83.88	0.70			

Tablo 4.3: Fermentasyon üst sıvısında gerçekleştirilen farklı yüzdelerdeki amonyum sülfat çöktürmelerinin toplu sonuçları (pH: 6.50)

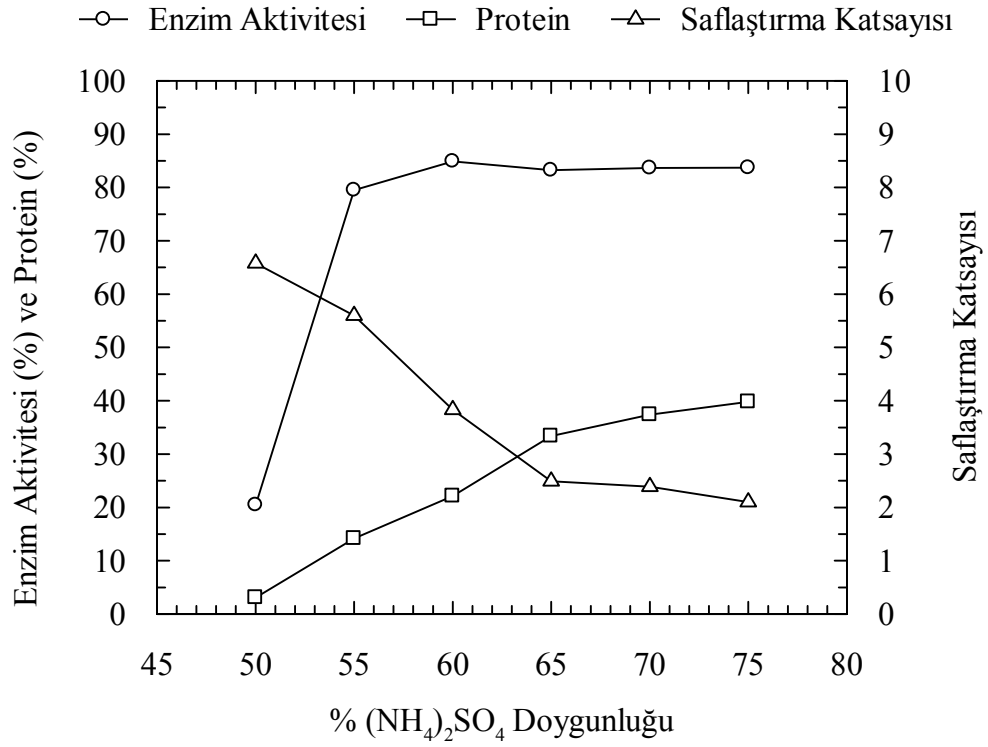
Örnek	Hacim (mL)	Aktivite (U ml ⁻¹ dak ⁻¹)	Toplam Aktivite (U dak ⁻¹)	Protein (mg mL ⁻¹)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U mg ⁻¹)	Çöken Enzim (%)	Çöken Protein (%)	S.K.*	Çöken Enzim (%), (ort.)	Çöken Protein (%), (ort.)	S.K.* (ort.)
Bulk (pH:6.50)	100	32.57	3257.00	0.043	4.28	760.98	100.00		1.00			
%50	5	133.33	666.65	0.027	0.13	5011.28	20.46	3.04	6.58	23.36	3.66	6.42
%50	8	112.30	898.40	0.025	0.20	4804.27	27.50	4.67	5.90			
%50	10	72.14	721.40	0.014	0.14	5152.85	22.14	3.27	6.77			
Bulk (pH:6.50)	100	32.57	3257.00	0.043	4.28	760.98	100.00		1.00			
%55	20	129.69	2593.80	0.031	0.61	4266.11	79.63	14.25	5.60			
Bulk (pH:6.50)	630	22.57	14219.10	0.114	71.82	197.98	100.00		1.00	76.75	12.47	5.90
%55	47	223.54	10506.38	0.221	10.38	1012.17	73.88	14.45	5.11			
%55	47	184.20	8657.40	0.133	6.25	1385.18	60.88	8.70	6.99			
Bulk (pH:6.50)	100	4.54	454.00	0.108	10.80	42.04	100.00		1.00			
%60	27	14.27	385.36	0.180	2.39	161.23	84.88	22.13	3.83			
Bulk (pH:6.50)	110	32.57	3582.70	0.069	7.59	472.03	100.00		1.00	84.05	20.57	3.83
%60	30	69.30	2079.00	0.044	1.32	1575.00	58.02	17.39	3.33			
Bulk (pH:6.50)	100	32.57	3257.00	0.043	4.28	760.98	100.00		1.00			
%60	19	142.67	2710.73	0.050	0.95	2853.40	83.22	22.19	3.74			
Bulk (pH:6.50)	100	36.99	3699.00	0.260	26.00	142.26	100.00		1.00			
%65	35	88.00	3080.00	0.248	8.68	354.83	83.26	33.38	2.49	81.03	31.25	2.49
Bulk (pH:6.50)	100	36.99	3699.00	0.298	29.80	124.13	100.00		1.00			
%65	35	78.00	2730.00	0.248	8.68	314.51	78.80	29.12	2.53			
Bulk (pH:6.50)	100	32.57	3257.00	0.043	4.28	760.98	100.00		1.00			
%70	23	118.48	2725.04	0.069	1.60	1822.77	83.66	37.38	2.39	83.14	34.57	2.39
%70	20	134.56	2691.20	0.068	1.36	1984.50	82.63	31.77	2.60			
Bulk (pH:6.50)	100	32.57	3257.00	0.043	4.28	760.98	100.00		1.00			
%75	22	123.94	2726.68	0.071	1.56	1747.87	83.71	36.45	2.29	84.21	38.08	2.21
%75	24	114.98	2759.52	0.071	1.70	1623.24	84.72	39.72	2.13			

* S.K. Saflaştırma katsayısı

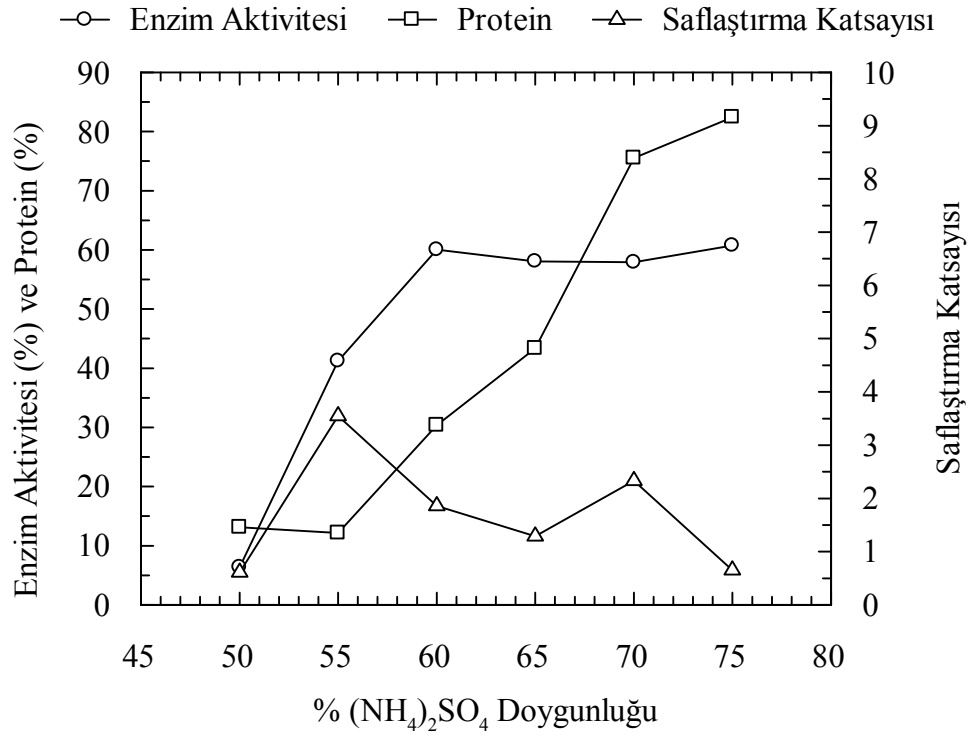
Tablo 4.4: Fermentasyon üst sıvısında pH: 6.50 ve pH:9.04 gerçekleştirilen farklı yüzdelerdeki amonyum sülfat çöktürmelerinin toplu sonuçları

(NH ₄) ₂ SO ₄ Doymunluğu (%)	Çöken Enzim, (%)		Çöken Protein, (%)		Saflaştırma Katsayısı	
	pH: 6.50	pH: 9.04	pH: 6.50	pH: 9.04	pH: 6.50	pH: 9.04
50	20.46	6.39	3.66	8.66	6.42	0.61
55	76.75	41.22	12.47	11.62	5.90	3.55
60	84.05	60.05	20.57	32.64	3.83	1.86
65	81.03	58.08	31.25	45.32	2.49	1.29
70	83.14	57.92	34.57	25.21	2.39	2.33
75	84.21	60.74	38.08	90.84	2.21	0.66

İki farklı pH değerinde yapılan çöktürmeler karşılaştırıldığında pH 6.50'da gerçekleştirilen % 55 amonyum sülfat çöktürmelerinin her bir yüzde doymunluk değeri için daha yüksek saflaştırma katsayısı değerlerine sahip olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.4). Saflaştırılarak tez çalışmasında karakterizasyon amaçlı kullanılacak protein molekülünün katalitik performansına ihtiyaç duyulması nedeni ile en fazla miktarda enzimin çöktürüldüğü ve en yüksek saflaştırma katsayısı değerine sahip doymunluk yüzdesinin elde edildiği basamak tercih edilmiştir. Bu amaçla; pH:6.50'da gerçekleştirilen % 50 ve 55 çöktürmelerinin saflaştırma katsayısı ve çöken enzim yüzdesi değerleri karşılaştırıldığında % 50 doymunlukta saflaştırma katsayısı değerinin daha yüksek olduğu gözlenmekle birlikte çöken enzim yüzdesinin % 20.46 olduğu bu değerinde % 55 çöktürmesine göre daha düşük olduğu görülmüştür. % 55 doymunluk değerinde saflaştırma katsayısı bir önceki yüzde değerine göre % 14.89 düşmekle birlikte çöken enzim yüzdesi yaklaşık 3.9 kat artmıştır. Üst sıvıdan kazanılan enzimin katalitik performansına ihtiyaç duyulması nedeniyle saflaştırma basamaklarının hedefi en yüksek miktarda enzimi kültür üst sıvısından ayırmak olmuştur. Bu amaca en uygun çöktürme değeri de pH 6.50'da %55 amonyum sülfat çöktürmesi değeri olarak belirlenmiştir. pH 6.50'da gerçekleştirilen farklı amonyum sülfat doymunluklarındaki alkalen proteaz çöktürmelerine karşılık gelen enzim aktivitesi (%), protein (%) ve saflaştırma katsayısı değerleri şekil 4.2' de verilmiştir. pH 9.04'de gerçekleştirilen denemeler incelendiğinde her bir doymunluk değerine karşılık gelen çöken enzim yüzdesi ve saflaştırma katsayısı değerlerinin pH 6.50 çöktürmelerine göre daha düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca pH 9.04'de gerçekleştirilen çöktürmelerde tekrarlayan sonuçlara ulaşmak zor olmuştur. pH 9.04'de gerçekleştirilen farklı amonyum sülfat doymunluklarındaki alkalen proteaz çöktürmelerine karşılık gelen enzim aktivitesi (%), protein (%) ve saflaştırma katsayısı değerleri şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.2: pH 6.50’de artan amonyum sülfat doygunluklarındaki alkalen proteaz çöktürmeleri



Şekil 4.3: pH 9.04’de artan amonyum sülfat doygunluklarındaki alkalen proteaz çöktürmeleri

pH 6.50'da gerçekleştirilen % 55 amonyum sülfat çöktürmesinin ardından santrifüjlenerek çöktürülen protein 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisinin minimum miktarında çözülerek +4°C'da gece boyunca yine aynı tampon çözeltisine karşı diyaliz edilmiş diyalizden alınan diyalizatta alkalen proteaz aktivitesi ve protein miktarı hesaplanmıştır. Kültür üst sıvısından saflaştırılan alkalen proteaz enziminin kısmi saflaştırma tablosu tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.5: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin kısmi saflaştırma tablosu

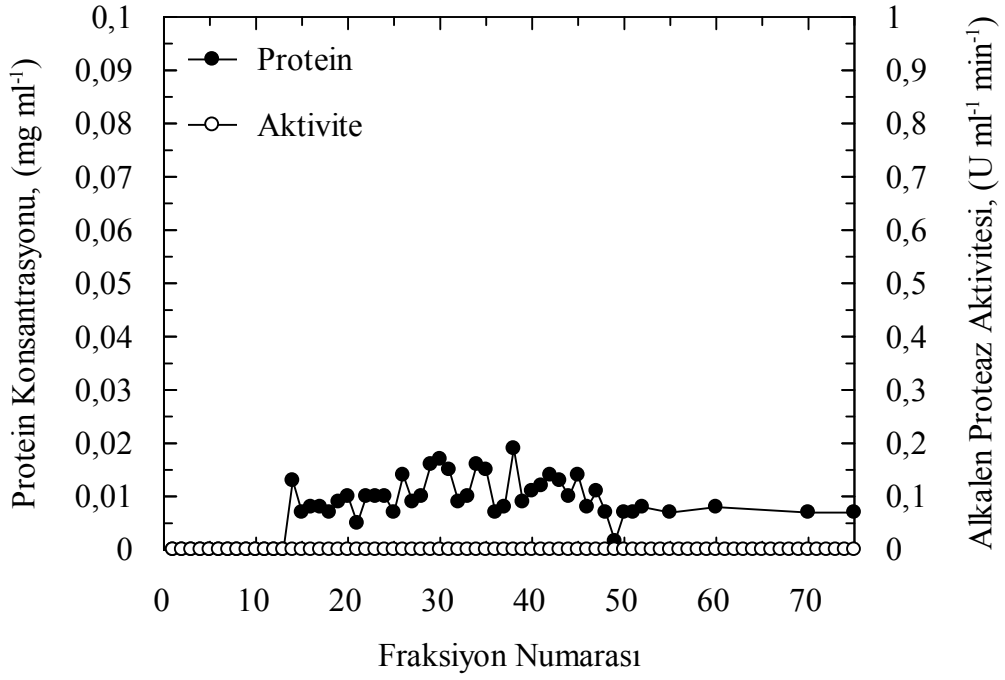
Adım	V (mL)	Aktivite (U ml ⁻¹ dak ⁻¹)	Toplam Aktivite (U)	Protein (mg mL ⁻¹)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U mg ⁻¹)	Saflaştırma Verimi (%)	S.K.
Kültür Üst Sıvısı	630	22.57	14219	0.114	71.82	197.98	100.00	1.00
%55 (NH ₄) ₂ SO ₄ Çöktürmesi+ Diyaliz	47	184.20	8657	0.133	6.25	1385.18	61.00	7.00

(S.K. saflaştırma katsayısı)

Alkalen proteaz enziminin üst sıvıdan pH 6.50'da % 55 amonyum sülfat çöktürmesi kısmi saflaştırma basamağı % 61.00 saflaştırma verimi ve 7.00 saflaştırma katsayısı değeri ile sonlandırılmıştır.

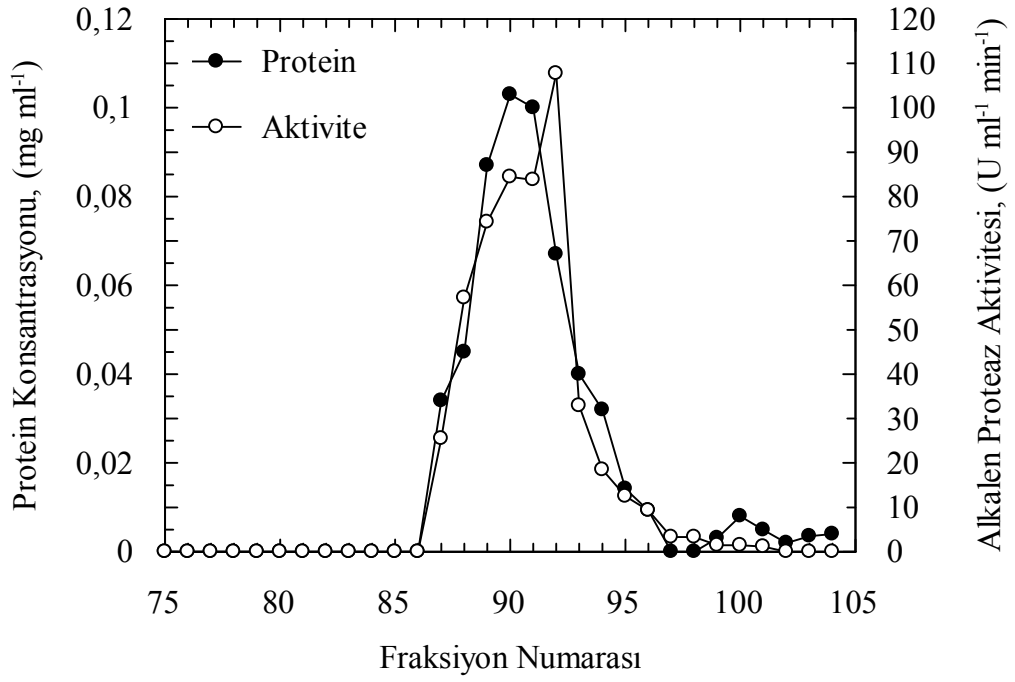
4.2.2. Alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisi kolonundan elüsyonu

Bacillus marmariensis GMBE 72'den izole edilen alkalen proteaz enzimi için pH 6.50'da gerçekleştirilen % 55 amonyum sülfat çöktürmesini takip eden bir ileri saflaştırma basamağı çöktürmeden elde edilen diyalizatın DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisi kolonundan elüsyonu olmuştur. Kolonun elüsyonu öncelikle [41] tarafından tanımlanan yöntemle gerçekleştirilmiş ve kolon 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Yıkama sonunda fraksiyon toplayıcıda toplanan ilk 75 fraksiyonda kontaminant proteinlerin bir kısmının yıkandığı gözlenmiş fakat alkalen proteaz aktivitesine rastlanmamıştır. 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile yapılan yıkamanın elüsyon grafiği şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz kromatografi kolonundan 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile elüsyonu

50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile kolondan yıkanan fraksiyonlarda alkalen proteaz aktivitesine rastlanmadığı için kolonda adsorblanan enzimin 250 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile yıkaması yapılmıştır. Kolon elüsyonundan alınan fraksiyonlarda alkalen proteaz aktivitesi ve protein miktar tayini yapılmış ve 86-95 nolu tüpler arasındaki fraksiyonlarda alkalen proteaz aktivitesi gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz kromatografi kolonundan 250 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile elüsyonu

Bacillus marmariensis GMBE 72'den izole edilen alkalen proteaz enziminin 250 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile kolondan yıkanması sonrası elde edilen saflaştırma tablosu tablo 4.6'da verilmiştir.

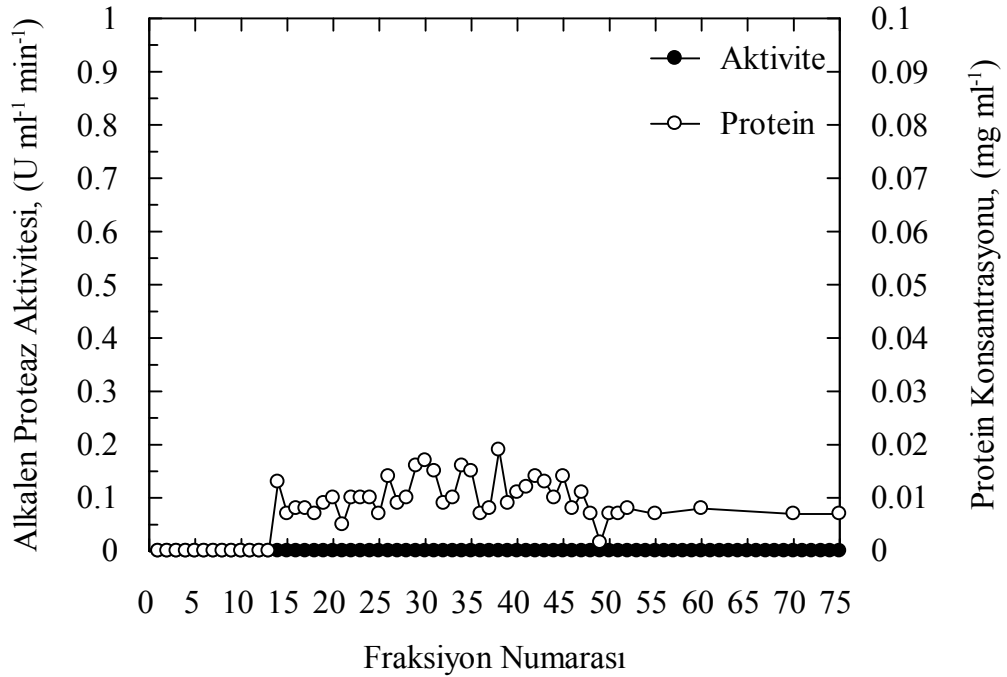
Tablo 4.6: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin saflaştırma tablosu, (S.K. saflaştırma katsayısı)

Adım	V (mL)	Aktivite (Uml ⁻¹ dak ⁻¹)	Toplam Aktivite (U)	Protein (mg mL ⁻¹)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U mg ⁻¹)	Saflaştırma Verimi (%)	S.K.
Kültür Üst Sıvısı	630	22.57	14219.00	0.114	71.82	197.98	100.00	1.00

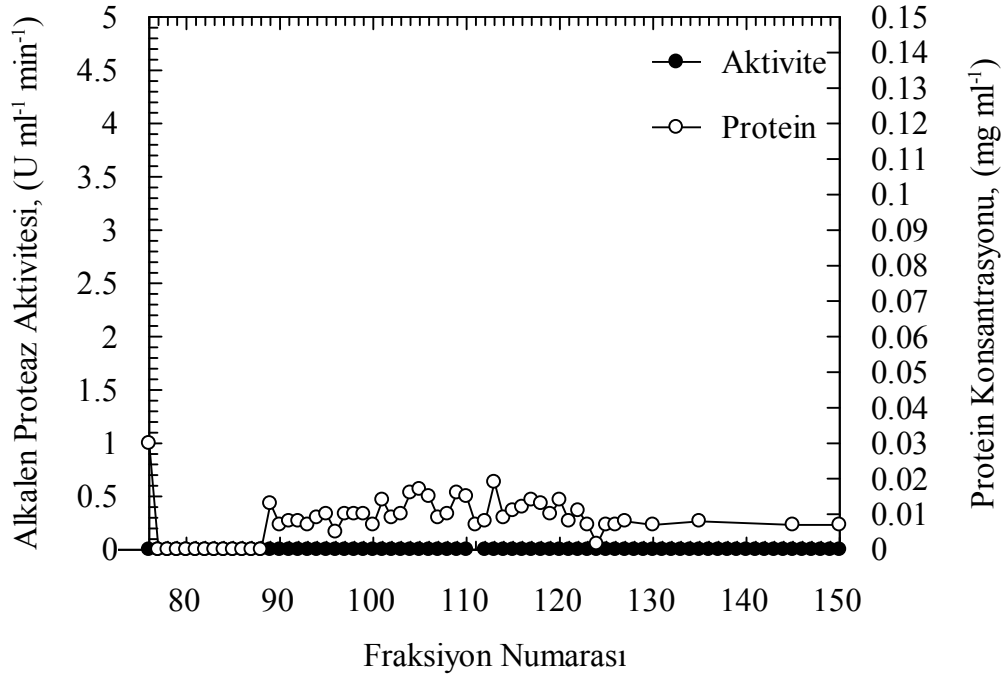
%55(NH ₄) ₂ SO ₄ Çöktürmesi + Diyaliz	47	184.20	8657.00	0.133	6.25	1385.18	61.00	7.00

DEAE-Selüloz Kolonun 250 mM Tampon Çözeltisi ile Yıkamasından Toplanmış Fraksiyonlar	24	72.88	1749.13	0.05	1.20	1457.60	12.30	7.40

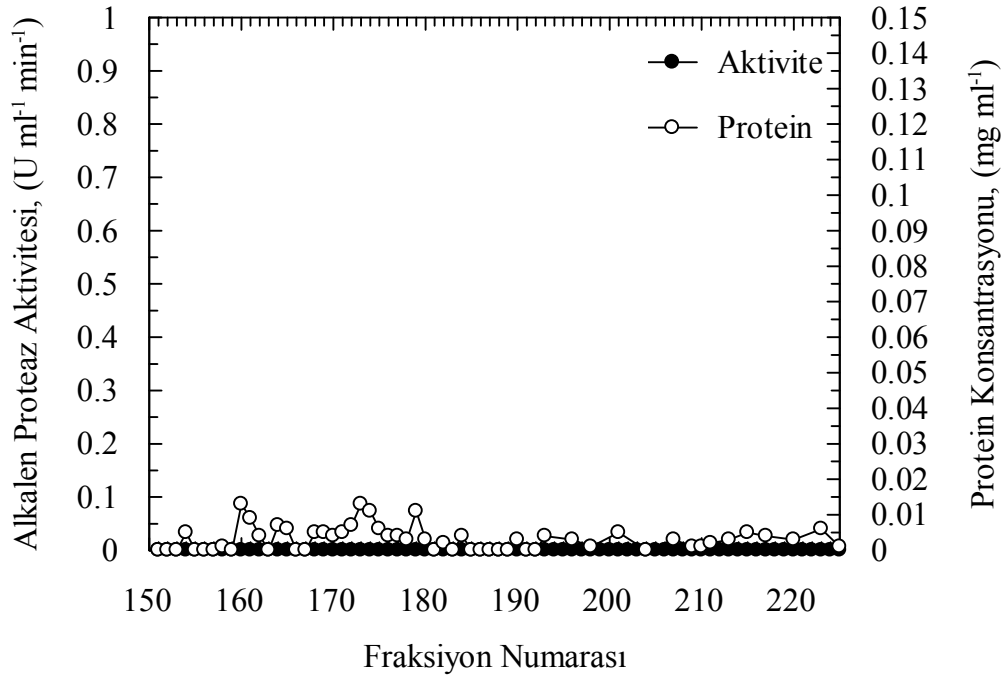
250 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile kolondan yıkanarak alınan enzimin saflaştırma tablosu incelendiğinde enzimin kolon çıktısının saflaştırma katsayısı değerinin 7.4 saflaştırma veriminin % 12.3 olduğu görülmüştür. Elüsyon sonrasında elde edilen enzim çözeltisinin saflaştırma verimi ve saflaştırma katsayısı değerinin iyileştirilmesi amacı ile amonyum sülfat çöktürmesi sonrası elde edilen diyalizatın kolon yıkaması için 50 mM NaOH-glisin tampon çözeltisinde hazırlanmış içinde 0-250 mM konsantrasyon aralığında 50 mM'lık artan konsantrasyonlarda NaCl içeren tampon çözeltileri ile ardışık elüsyonlar uygulanmıştır. Ardışık elüsyonda 200 mM NaCl içeren tampon çözeltisi ile yapılan elüsyondan toplanan fraksiyonlarda alkalen proteaz enzim aktivitesi gözlenmiştir. Sırasıyla 0-50-100-150-200-250 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltileri ile yapılan ardışık elüsyon sonunda her bir farklı NaCl konsantrasyonundaki elüsyon grafiği sırasıyla şekil 4.6, şekil 4.7, şekil 4.8, şekil 4.9, şekil 4.10 ve şekil 4.11'de verilmiştir.



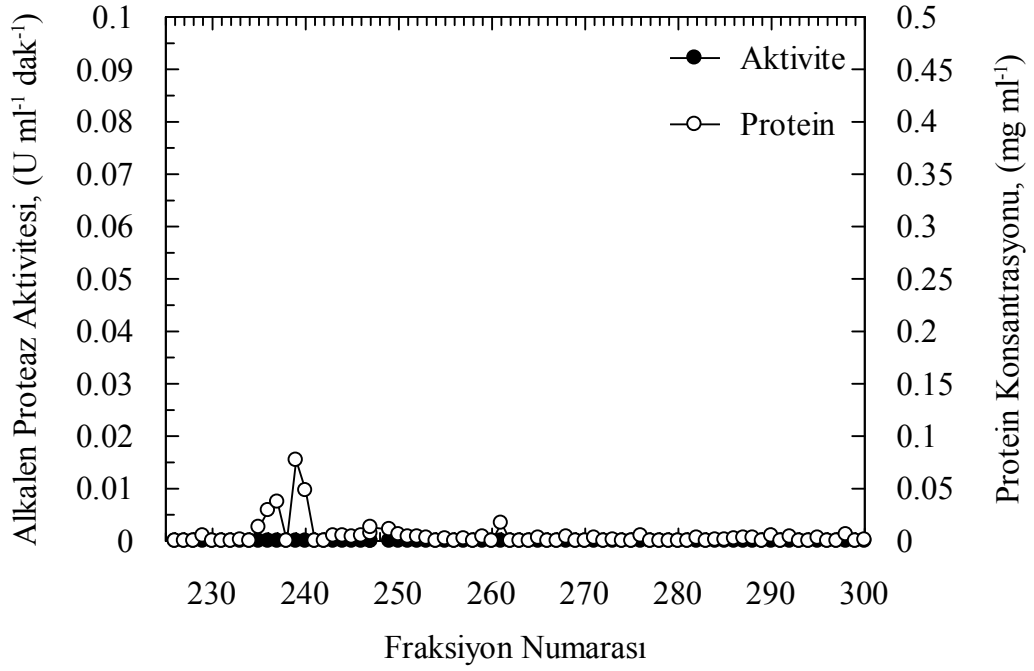
Şekil 4.6: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz kromatografi kolonundan 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile elüsyonu



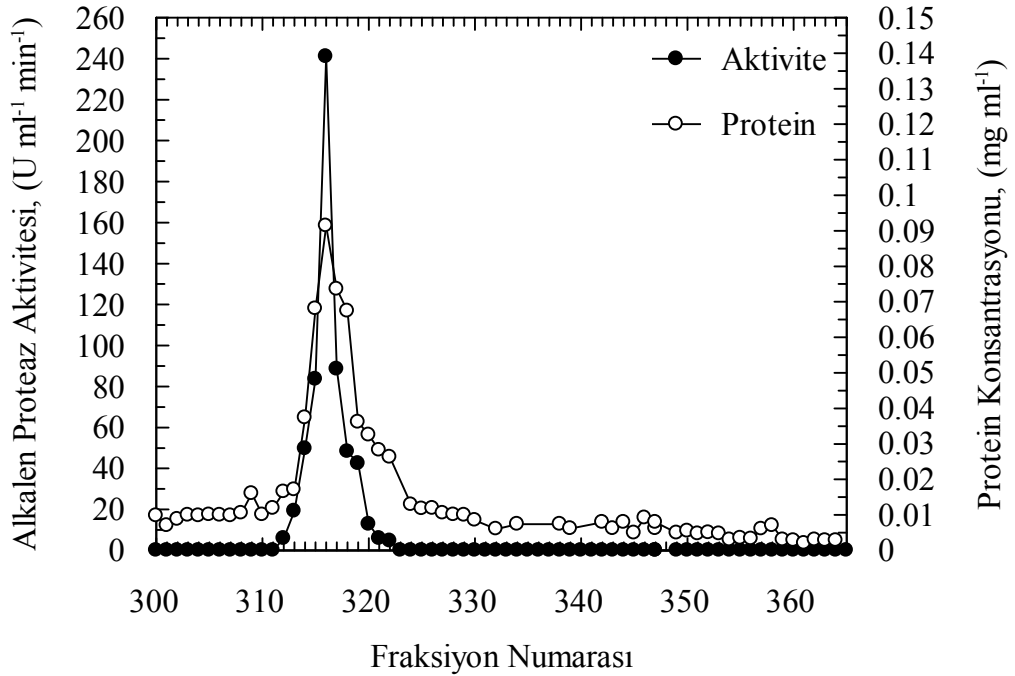
Şekil 4.7: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz kromatografi kolonundan 50 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile elüsyonu



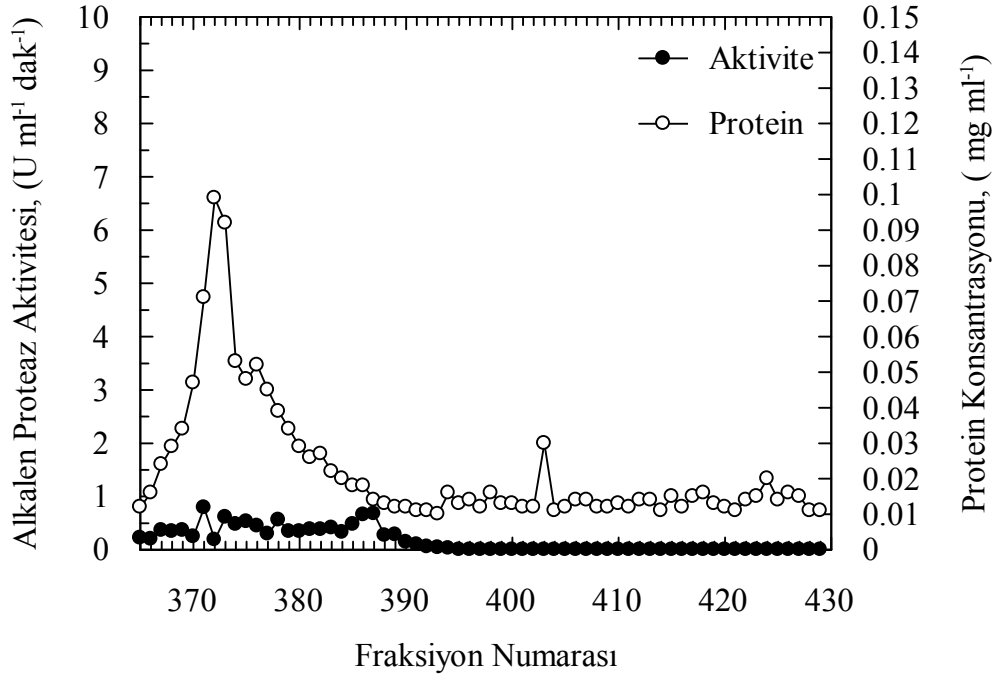
Şekil 4.8: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz kromatografi kolonundan 100 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile elüsyonu



Şekil 4.9: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz kromatografi kolonundan 150 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile elüsyonu



Şekil 4.10: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz kromatografi kolonundan 200 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile elüsyonu



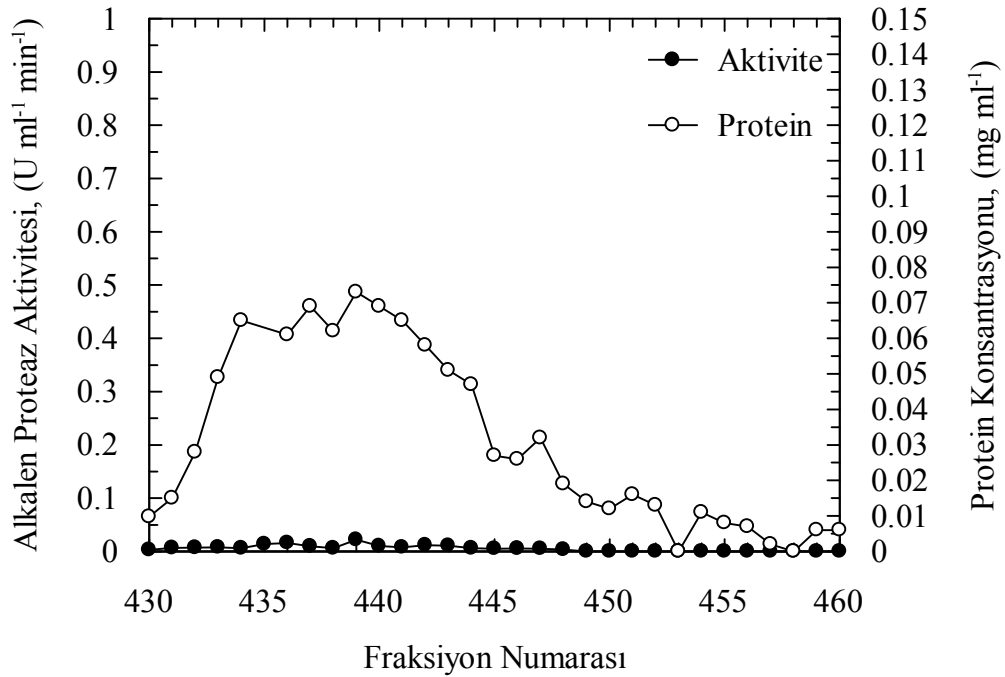
Şekil 4.11: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz kromatografi kolonundan 250 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile elüsyonu

50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile yapılan yıkamada fraksiyon toplayıcıda toplanan ilk 75 fraksiyonda bir önceki denemede olduğu gibi bir miktar kontaminant protein uzaklaştırılmış fakat alkalen proteaz aktivitesine rastlanmamıştır (Şekil 4.6). Kolonun yıkanmasına kademeli yıkama ile devam edilmiş kolon 50, 100 ve 150 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltileri ile yıkanmış her basamakta kontaminant proteinlerin uzaklaştırıldığı gözlemlendiği halde artan NaCl konsantrasyonuna rağmen alkalen proteaz aktivitesine rastlanmamıştır (Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9).

200 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile yapılan yıkama sonunda kolondan alınan fraksiyonlarda 312-320 nolu fraksiyonlar arasında alkalen proteaz aktivitesi gözlenmiştir (Şekil 4.10). Yıkama sonrasında bu fraksiyonlardan yüksek spesifik aktiviteli olanlar bir araya toplanarak 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisine karşı gece boyunca diyaliz edilmiş ve daha sonraki karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere +4°C'da saklanmıştır.

200 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile yapılan yıkama sonrasında ardışık elüsyona 250 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile devam edilmiştir. Bu konsantrasyon değerinde de kolondan alınan fraksiyonlarda kontaminant protein varlığına rastlanmasına karşılık alkalen proteaz aktivitesi gözlenmemiştir (Şekil 4.11).

Bu aşamadan sonra kolon yüksek iyonik kudretteki tampon çözelti ile elüsyona rağmen kolonda bağlı kalmış olabilecek enzim aktivitesi varlığının araştırılması amacı ile 500 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. 500 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile yapılan yıkamanın elüsyon grafiği şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz kromatografi kolonundan 500 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile elüsyonu

Yıkama sonrasında kolondan alınan fraksiyonlarda kontaminant protein gözlenmesine karşılık alkalen proteaz enzim aktivitesine rastlanmamıştır. Enzim aktivitesinin gözlenmemesinin nedeninin yüksek iyonik kudret olabileceği düşüncesi ile kolondan toplanan fraksiyonlar bir araya getirilerek gece boyunca +4°C’da 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisine karşı diyaliz edilmiş diyalizden alınan

diyalizatta alkalen proteaz aktivitesi tayini yapılmış ve enzim çözeltisinde alkalen proteaz aktivitesine rastlanmamıştır. Kolon kromatografisi çalışmalarının tümü +4°C’da gerçekleştirilmiş olup her ardışık elüsyon basamağından sonra kolondan toplanan fraksiyonlar bir araya getirilerek gece boyunca +4°C’da 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisine karşı diyaliz edilmiştir.

Bacillus marmariensis GMBE 72’den izole edilen alkalen proteaz enziminin DEAE-selüloz kromatografi kolonundan 200 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi ile elüsyonu sonunda enzimin kültür üst sıvısından saflaştırılması; % 31.10 saflaştırma verimi ve 16.92 saflaştırma katsayısı ile gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin saflaştırma tablosu

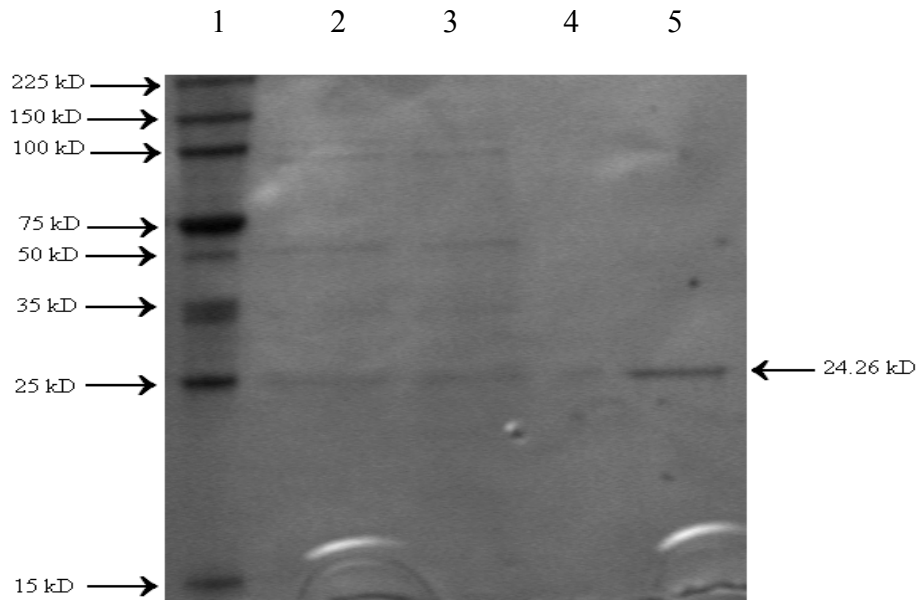
Adım	V (m)	Aktivite (Uml ⁻¹ dak ⁻¹)	Toplam Aktivite (U)	Protein (mgmL ⁻¹)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U mg ⁻¹)	Saflaştırma Verimi (%)	S.K.*
Kültür Üst Sıvısı	630	22.57	14219	0.114	71.82	197.98	100.00	1.00
%55 (NH ₄) ₂ SO ₄ Çöktürmesi+ Diyaliz	47	184.20	8657.40	0.133	6.25	1385.18	60.90	7.00
DEAE-Selüloz Kolonun 200 mM Tampon Çözeltisi ile Elüsyonundan Toplanmış Fraksiyonlar	24	184.20	4420.80	0.055	1.32	3349.10	31.10	17.00

(S.K. saflaştırma katsayısı)

4.3. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 Soyundan Saflaştırılan Alkalen Proteaz Enziminin Karakterizasyonu

4.3.1. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin moleküler ağırlığı

Bacillus marmariensis GMBE 72'den DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisi sonunda saflaştırılan alkalen proteaz enziminin molekül ağırlığı sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile 24.26 kDa olarak belirlenmiş olup protein molekülü tek band protein olarak gözlenmiştir. Enzimin SDS-PAGE fotoğrafı şekil 4.13'de verilmiştir.

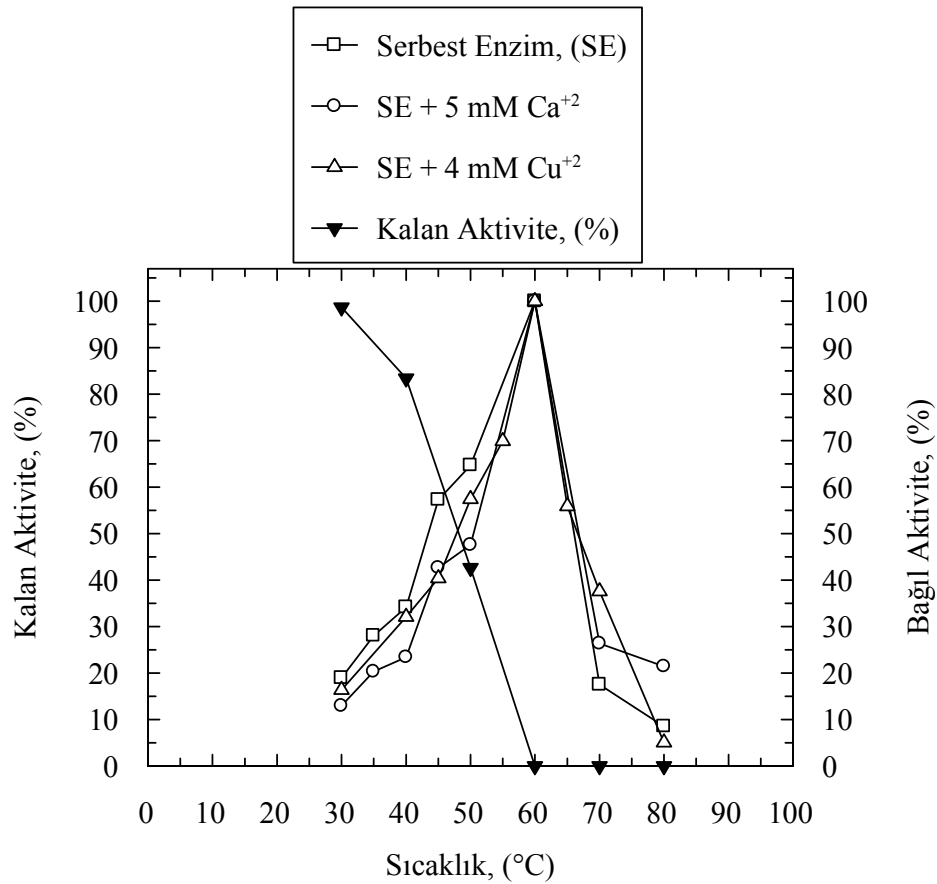


Şekil 4.13: Alkalen proteaz enziminin %12'lik SDS-jel elektroforezi. 1: Promega Broad Range Protein Molecular Weight Markers (V849A); 2: Kültür üst sıvısı, 3: % 55 amonyum sülfat çöktürmesi, 4: DEAE-selüloz kolon elüatı 5: 2 mM PMSF ile muamele edilmiş DEAE-selüloz kolon elüatı

4.3.2. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin sıcaklık profili

Bacillus marmariensis GMBE 72'den izole edilen alkalen proteaz enziminin sıcaklık profili 30 ile 80°C'lar arasında 5 mM Ca²⁺ ve 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda belirlenmiştir.

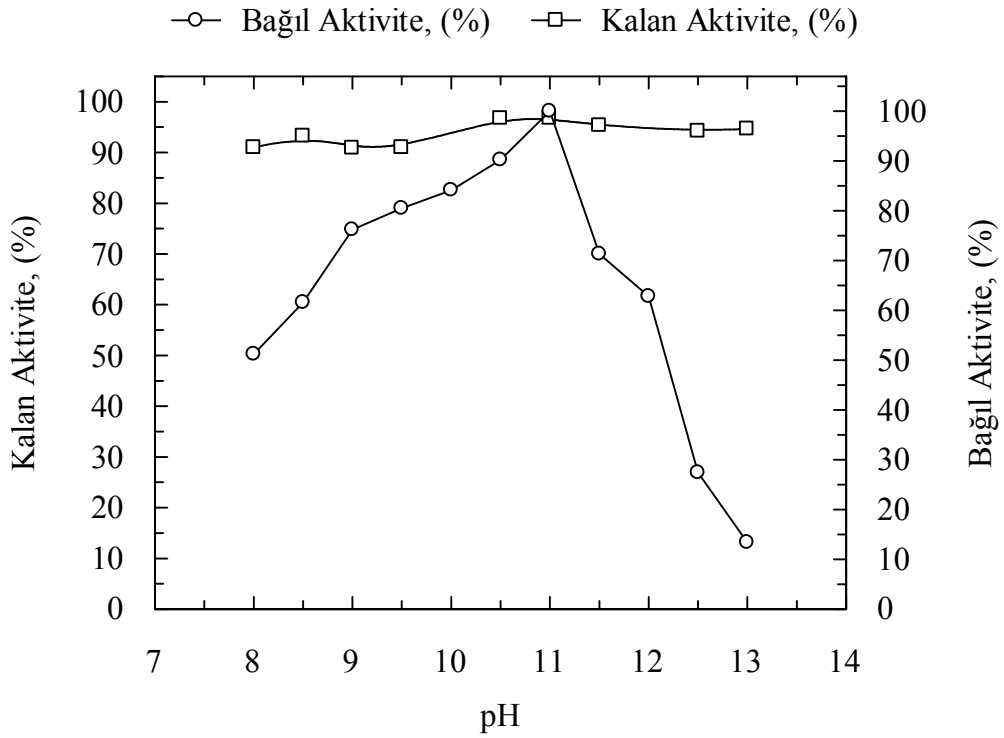
Alkalin proteaz aktivitesi için optimum sıcaklık değeri Ca²⁺ ve Cu²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda 60°C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.14). Enzimin sıcaklık stabilitesi incelendiğinde Enzimin sıcaklık stabilitesi incelendiğinde 2 saat ön inkübasyondan sonra 30°C'da kararlı olduğu, 40 ve 50°C sıcaklıklarda aktivitesinin sırasıyla % 16 ve 57'sini kaybettiği ve 60°C sıcaklıkta ise tamamı ile inaktive olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14). Ayrıca enzimin oda sıcaklığında 4 gün süre ile bekletildikten sonra aktivitesini % 100 oranında koruduğu da gözlenmiştir.



Şekil 4.14: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalin proteaz enziminin sıcaklık stabilitesi ve Ca²⁺ ve Cu²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda sıcaklık stabilitesi ve optimal sıcaklık profili

4.3.3. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin pH profili

Alkalin proteaz enzim aktivitesi için optimum pH değeri pH: 8-11.5 aralığında 50 mM NaOH-glisin, pH:12-13 aralığında 200 mM NaOH-glisin tampon çözeltileri varlığında pH 11 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.15). Enzim pH 8.0-13.0 aralığında, pH: 8-11.5 aralığında 50 mM NaOH-glisin, pH:12-13 aralığında 200 mM NaOH-glisin tampon çözeltileri varlığında, oda sıcaklığında 7 gün süre ile stabilitesini korumuştur (Şekil 4.15).

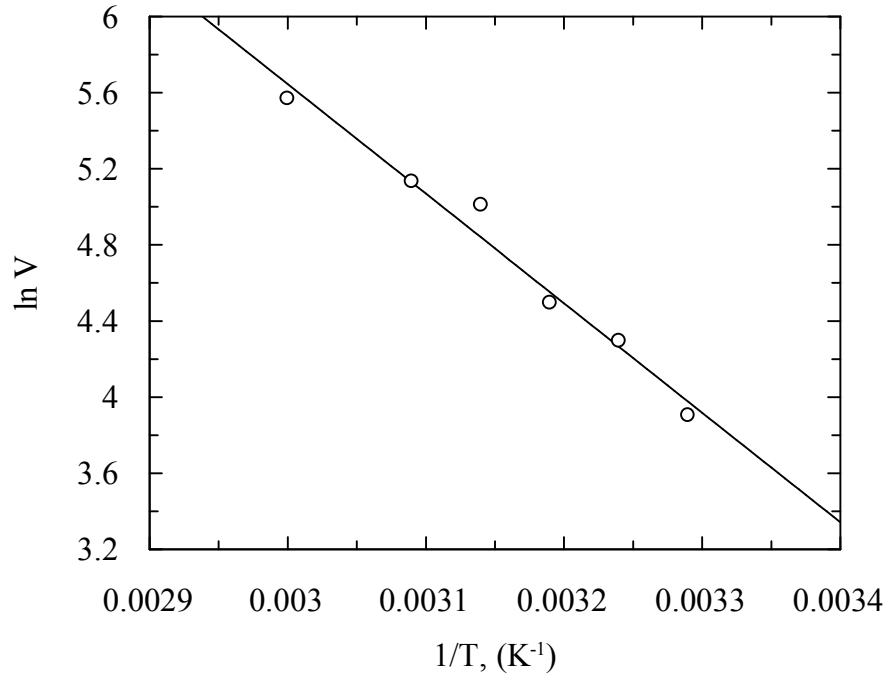


Şekil 4.15: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalin proteaz enziminin pH stabilitesi ve optimal pH profili

4.3.4. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalin proteaz enziminin kazein hidrolizinin Arrhenius aktivasyon enerjisi

Serbest alkalin proteazın kazein hidrolizinin Arrhenius aktivasyon enerjisi bölüm 3.3.2'de açıklandığı şekilde 30-80°C'lar arasında 5°C'lık artan sıcaklık değerlerinde ölçülen başlangıç hızlarının logaritmik değerlerinin ($\ln v$) mutlak sıcaklığın resiprokal [$1/T$, (K^{-1})] değerlerine karşı işaretlenmesiyle elde edilen Arrhenius

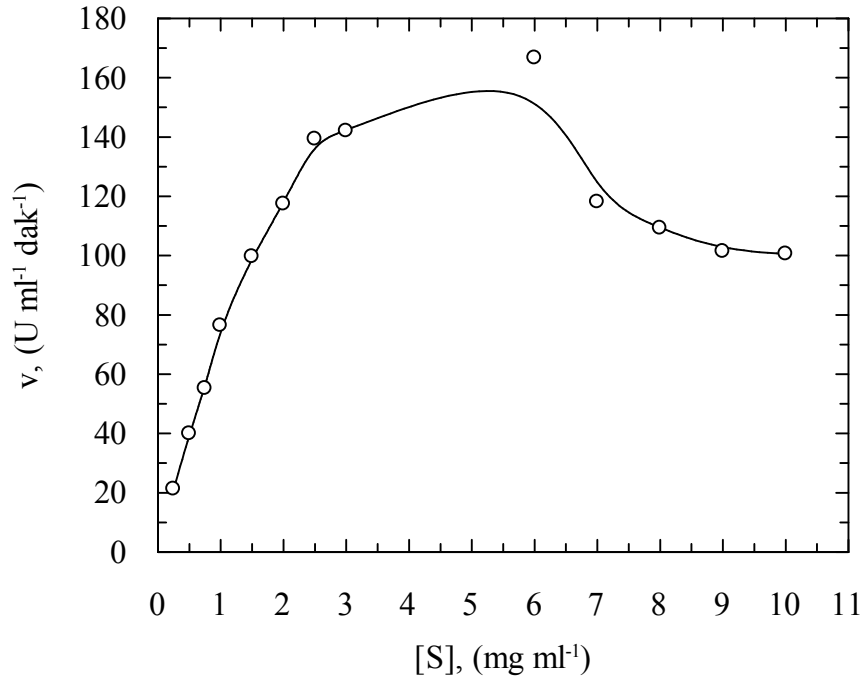
diyagramındaki doğrunun eğiminden hesaplanmıştır. Buna göre serbest alkale proteaz enziminin kazein hidrolizinin Arrhenius aktivasyon enerjisi (E_a) 48.09 kJ mol⁻¹ (11.49 kcal mol⁻¹) olarak hesaplanmıştır. Kazein hidrolizinin Arrhenius aktivasyon enerjisinin hesaplanmasında kullanılan Arrhenius lineer grafiği şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.16: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan serbest alkale proteaz enziminin kazein hidrolizinin aktivasyon enerjisinin belirlenmesinde kullanılan Arrhenius grafiği (doğru için $r = 0.9880$ 'dir)

4.3.5. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin kazein hidrolizinin kinetik parametreleri

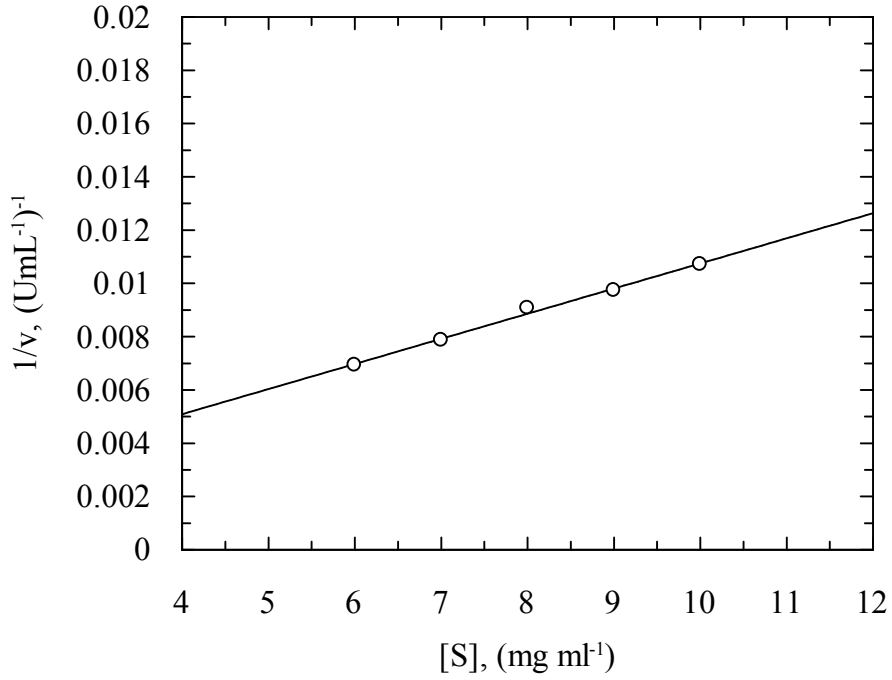
Bacillus marmariensis GMBE 72'den izole edilen serbest alkale proteaz enziminin kazein hidrolizinin kinetik parametrelerini belirlemek amacı ile öncelikle çalışılacak substrat konsantrasyonu aralığını tespit etmek için 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10 mM konsantrasyon değerlerinde hazırlanan substrat çözeltileri ile 30°C'da ve pH 10.5'de enzimin başlangıç hızı değerleri ölçülmüştür. Elde edilen veriler Lineweaver-Burk diyagramına geçirildiğinde substratın enzim üzerinde inhibisyon yarattığı konsantrasyon değeri 7 mM ve üzerindeki substrat konsantrasyonu değerleri olarak belirlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin başlangıç hızının başlangıç substrat konsantrasyonu değeri ile değişimi

Tespit edilen substrat inhibisyonunun gerçekleştiği substrat konsantrasyonu değerlerine karşı okunan $1/v$ değerlerinin substrat konsantrasyonlarına karşı işaretlenmesi ile elde edilen grafiğin eğiminden de alkalen proteaz enzimi üzerinde kazein substratı tarafından gerçekleştirilen substrat inhibisyonunun inhibisyon sabiti (K_s) değeri hesaplanmıştır.

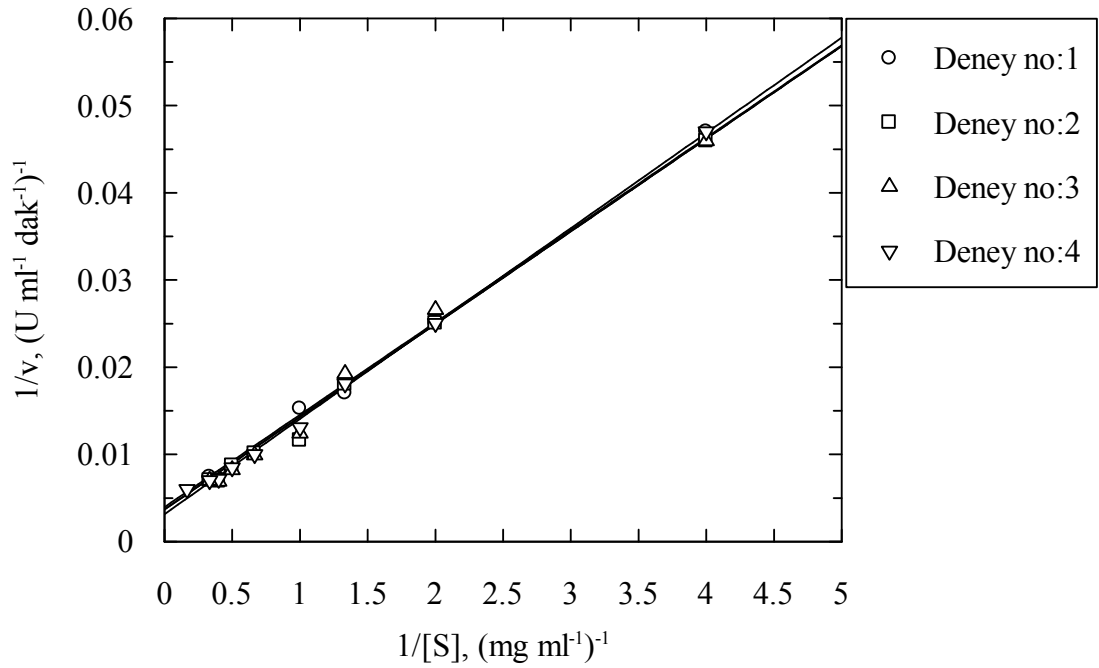
Alkalin proteaz enziminin substrat inhibisyonu sabiti 14.45 mg ml^{-1} olarak tespit edilmiş ve substrat inhibisyonunun belirlenmesinde kullanılan $1/v$ 'ye karşı $[S]$ diyagramı şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.18. Substrat inhibisyonunun inhibisyon sabitinin (K_s) belirlenmesinde kullanılan $1/v$ 'ye karşı $[S]$ diyagramı ($r = 0.9970$ 'dir)

Alkalin proteaz enziminin aktivitesi üzerinde substrat inhibisyonu yaratmayan substrat konsantrasyonu değerleri olan 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 ve 6.0 mM konsantrasyonlarında ölçülen başlangıç hızlarının resiprokal değerlerine ($1/v$) karşı başlangıç substrat konsantrasyonlarının resiprokal değerlerinin ($1/[S]$) işaretlenmesiyle oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramı ise şekil 4.19'da verilmiştir. Deneyler en az 4 kez tekrarlanmış her deney sonucu için belirlenen K_m ve V_m değerlerinin ortalamaları alınmış ve ortalamaların standart sapması hesaplanarak sonuçlar tablo 4.8'de verilmiştir.

Belirtilen konsantrasyon değerleri aralığında ölçülen başlangıç hızı değerleri ile hazırlanan Lineweaver-Burk diyagramından serbest alkalin proteaz enziminin 30°C ve pH: 10.5'deki kazein hidrolizinin K_m ve V_m değerleri sırasıyla 3.12 mg ml⁻¹ kazein, 1.60 μ mol tirozin ml⁻¹ dak⁻¹ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.19: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 30°C’de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9991 ’dir)

Tablo 4.8: Serbest alkalen proteaz enziminin 30°C’de K_m ve V_m değerleri

Deney no	V_m , ($\mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$)	K_m , (mg ml^{-1})
1	1.53	3.00
2	1.57	3.03
3	1.57	3.05
4	1.72	3.40

$K_{m,ort}$: 3.12, $K_{m,sem}$: 0.071, $K_m = 3.12 \pm 0.07 \text{ mg ml}^{-1}$
 $V_{m,ort}$: 1.60, $V_{m,sem}$: 0.16, $V_m = 1.60 \pm 0.16 \mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$

4.3.6. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin substrat spesifitesi

4.3.6.1. Alkalem proteaz enziminin p-nitroanilid (p-NA) konjuge sentetik substratlara karşı spesifitesi

Alkalem proteaz enziminin substrat spesifitesini belirlemek amacı ile p-nitroanilid ile konjuge edilmiş sentetik peptid substratları reaksiyon ortamındaki son konsantrasyonları 5 mM olacak şekilde hazırlanmış ve N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA, L-Leu-pNA, N α -benzoyl-L-Arg-pNA (L-BAPNA), N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA ile N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA sentetik substratları

kullanılmıştır. Alkalen proteaz enziminin p-NA konjuge sentetik substratlara karşı spesifitesi tablo 4.9’da verilmiştir.

Tablo 4.9: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin oligopeptidil-p-nitroanilid (p-NA) konjuge sentetik substratlarına karşı spesifitesi

Substrat	Spesifik Aktivite, (U mg ⁻¹)
N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	49.31
N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA	35.48
N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA	16.44
N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA	9.44
L-Leu-pNA	-
N α -benzoil-L-Arg-pNA (L-BAPNA)	-

Substratlar arasında en yüksek spesifite N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ardından N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA substratına karşı gözlenmiştir (Tablo 4.9). Karakterizasyonu yapılan serbest alkalen proteaz enziminin N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ve N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA substratlarını sırasıyla Phe- ve Leu-kalıntılarından sonra yüksek spesifite ile hidrolizlemesi üzerine enzimin kimotripsin benzeri alkalen proteaz enzimi olduğu sonucuna varılmıştır.

4.3.6.2. Alkalen proteaz enziminin protein substratlara karşı spesifitesi

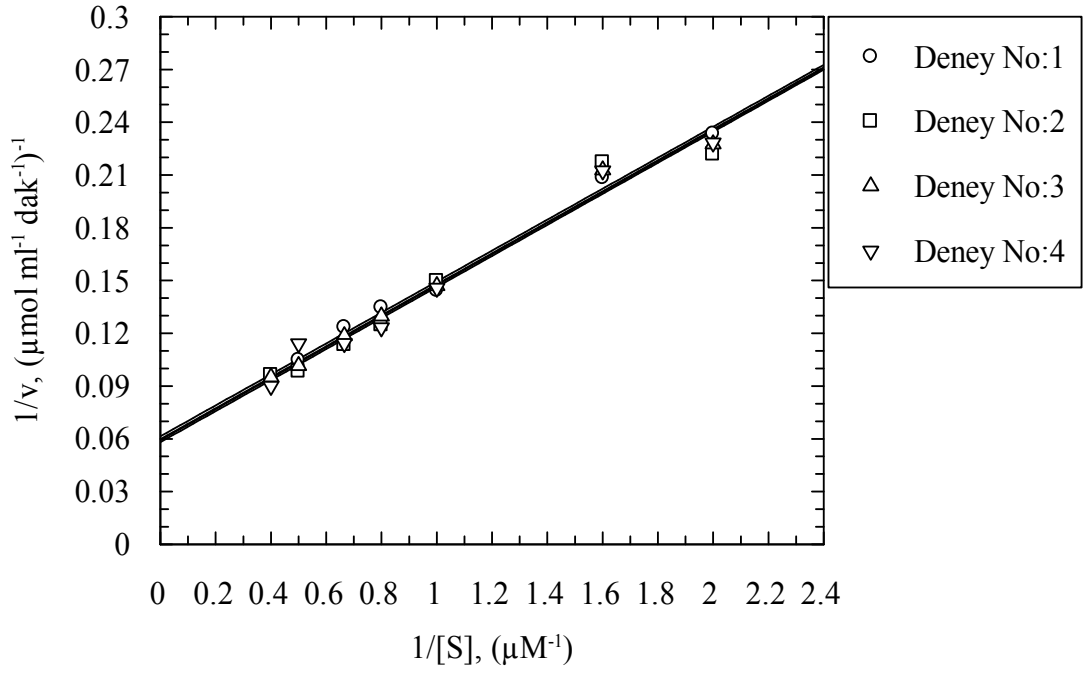
Alkalen proteaz enziminin protein substratlara karşı substrat spesifitesini belirlemek amacı ile hemoglobin (Hb), sığır serum albumini (BSA), süttozu, keratin ve jelatin protein substratlarının % 0.6’lık çözeltileri 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisinde çözümlenerek hazırlanmıştır. Alkalen proteaz enziminin protein substratlara karşı spesifitesi kazein proteinini bulunduran reaksiyon çözeltisinin aktivitesi % 100 kabul edilerek % bağıl aktivite olarak tablo 4.10’da verilmiştir. Enzim en yüksek bağıl aktiviteyi kazein ile aynı protein ailesinden olması nedeniyle süttozuna karşı göstermiştir.

Tablo 4.10: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin protein substratlarına karşı spesifitesi

Substrat	Bağıl Aktivite, (%)
Kazein	100
Süt Tozu	143.10
Hemoglobin	42.60
Sığır Serum Albumini	16.84
Jelatin	1.18
Keratin	-

4.3.7. Alkale proteaz enziminin N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA, N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA hidrolizinin kinetik parametreleri

Alkale proteaz enziminin N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA, N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA hidrolizinin kinetik parametreleri (K_m , V_m) her bir sentetik substrat için Lineweaver-Burk diyagramı oluşturularak belirlenmiş bu parametreler yardımı ile de k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri hesaplanmıştır. Her bir substratın 0.125, 0.250, 0.5, 0.625, 1.25 ve 2.5 mM substrat konsantrasyonu değerlerinde ölçülen başlangıç hızlarının resiprokal değerlerine ($1/v$) karşı başlangıç substrat konsantrasyonlarının resiprokal değerlerinin ($1/[S]$) işaretlenmesiyle oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramları N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA için şekil 4.20’de, N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA için şekil 4.21’de, N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA için şekil 4.22’de ve N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA için şekil 4.23’de ayrıca her bir sentetik substrat için detaylı deney sonuçları da sırasıyla tablo 4.11, tablo 4.12, tablo 4.13 ve tablo 4.14’de verilmiştir.



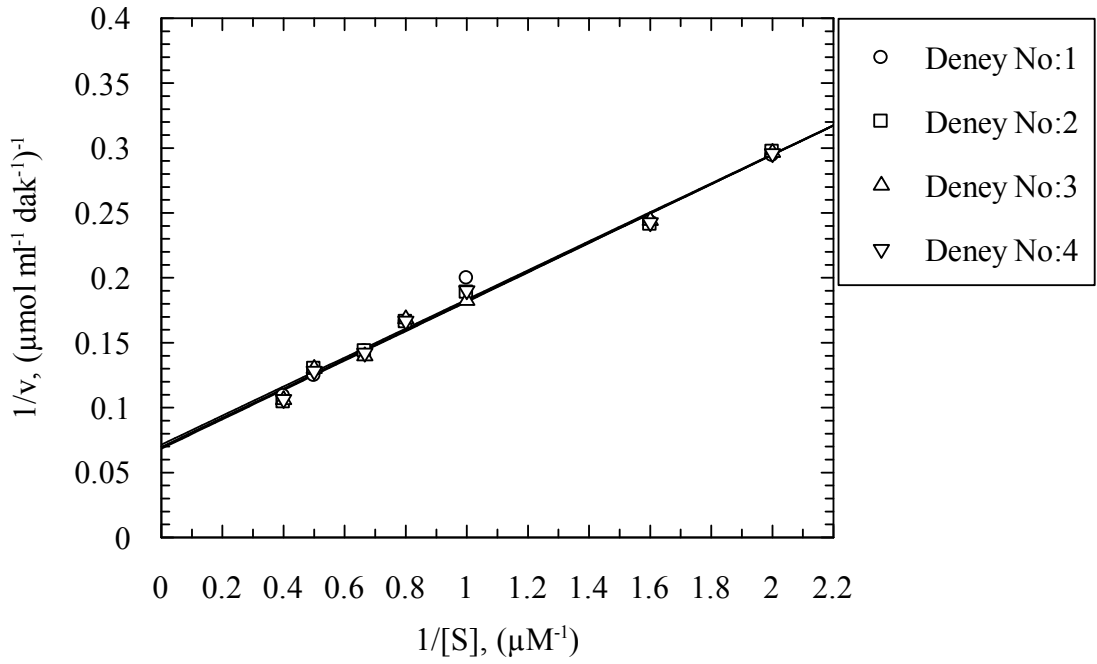
Şekil 4.20: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için $r \geq 9967$ 'dir)

Tablo 4.11: 30°C'da alkalen proteaz enzimi tarafından gerçekleştirilen N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA hidrolizinin K_m ve V_m değerleri

Deney no	V_m , ($\mu\text{mol pNA ml}^{-1} \text{dak}^{-1}$)	K_m , (μM)
1	16.28	1.43
2	17.21	1.51
3	16.72	1.47
4	16.89	1.48

$K_{m,ort}$: 1.47, $K_{m,sem}$: 0.016, $K_m = 1.47 \pm 0.016 \mu\text{M}$

$V_{m,ort}$: 16.77, $V_{m,sem}$: 0.194, $V_m = 16.77 \pm 0.194 \mu\text{mol pNA ml}^{-1} \text{dak}^{-1}$



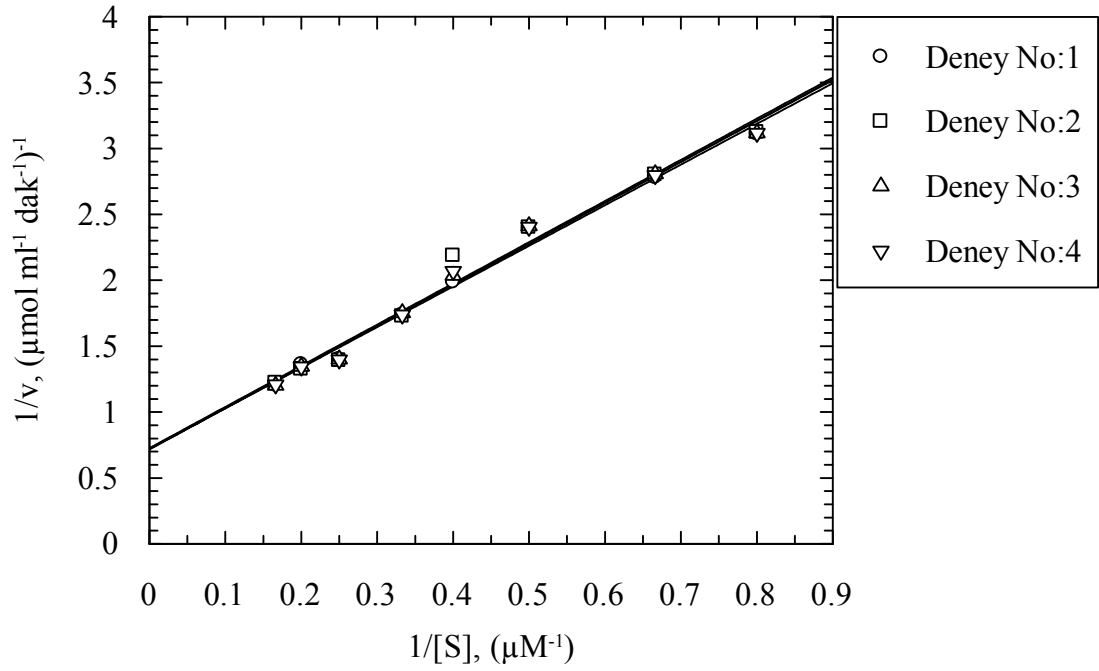
Şekil 4.21: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için $r \geq 9923$ 'dür)

Tablo 4.12: 30°C'da alkalen proteaz enzimi tarafından gerçekleştirilen N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA hidrolizinin K_m ve V_m değerleri

Deneý no	V_m , ($\mu\text{mol pNA ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$)	K_m , (μM)
1	14.08	1.57
2	14.45	1.62
3	14.61	1.65
4	14.34	1.61

$$K_{m,ort} : 1.61, K_{m,sem} : 0.016, K_m = 1.61 \pm 0.016 \mu\text{M}$$

$$V_{m,ort} : 14.37, V_{m,sem} : 0.111, V_m = 14.37 \pm 0.111 \mu\text{mol pNA ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$$



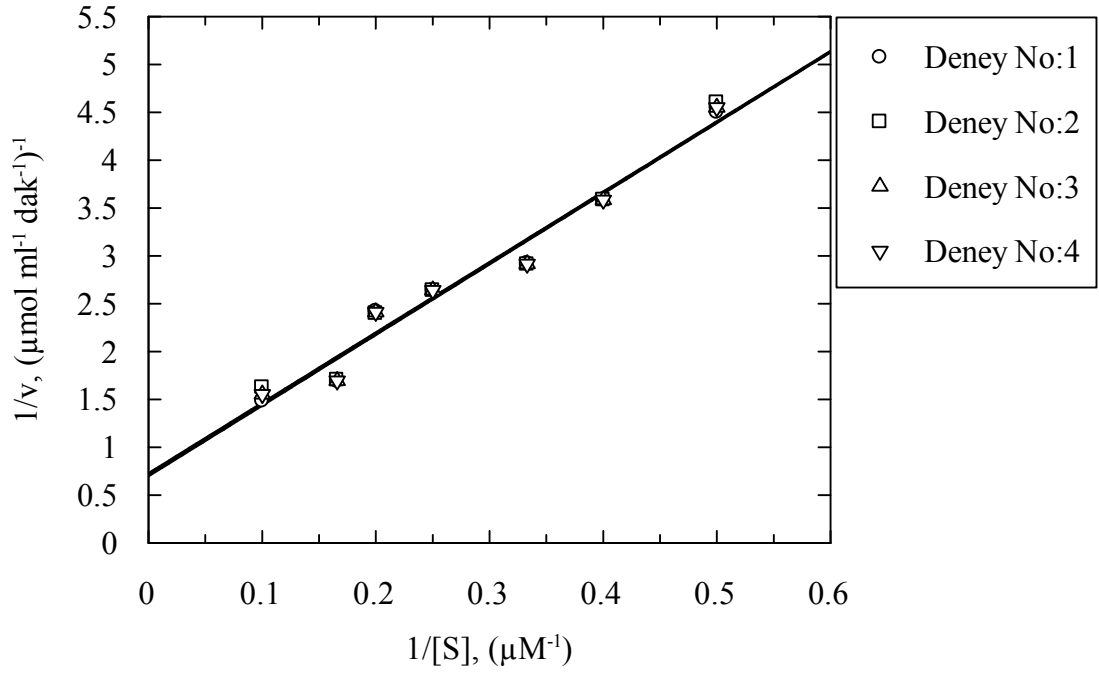
Şekil 4.22: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalin proteaz enziminin N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için $r \geq 9933$ 'dür)

Tablo 4.13: 30°C'da alkalin proteaz enzimi tarafından gerçekleştirilen N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA hidrolizinin K_m ve V_m değerleri

Deneý no	V_m , ($\mu\text{mol pNA ml}^{-1} \text{dak}^{-1}$)	K_m , (μM)
1	1.39	4.27
2	1.38	4.29
3	1.39	4.35
4	1.39	4.31

$K_{m,ort}$: 4.30, $K_{m,sem}$: 0.017, $K_m = 4.30 \pm 0.017 \mu\text{M}$

$V_{m,ort}$: 1.39, $V_{m,sem}$: 0.0028, $V_m = 1.39 \pm 0.0028 \mu\text{mol pNA ml}^{-1} \text{dak}^{-1}$



Şekil 4.23: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için $r \geq 9876$ 'dır)

Tablo 4.14: 30°C'da alkale proteaz enzimi tarafından gerçekleştirilen N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA hidrolizinin K_m ve V_m değerleri

Deneý no	$V_m, (\mu\text{mol pNA ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}) \times 10^{-3}$	$K_m, (\mu\text{M})$
1	7.5	10.04
2	7.9	10.62
3	7.7	10.32
4	7.7	10.32

$$K_{m,ort} : 10.32 \quad K_{m,sem} : 0.011, \quad K_m = 10.32 \pm 0.011 \mu\text{M}$$

$$V_{m,ort} : 7.7 \times 10^{-3}, \quad V_{m,sem} : 0.16 \times 10^{-3} \quad V_m = (7.7 \pm 0.16) \times 10^{-3} \mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$$

Her bir substrat ve kazein (bölüm 4.3.5) için hazırlanan Lineweaver-Burk diyagramından tayin edilen K_m ve V_m değerleri ile bu kinetik parametreler vasıtasıyla hesaplanmış k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri toplu olarak tablo 4.15'de verilmiştir.

Tablo 4.15: Alkale proteaz enziminin sentetik peptid substratlarını hidrolizinin kinetik parametreleri

Substrat	K_m		V_m ($\mu\text{mol pNA ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$)	k_{cat} (dak^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{dak}^{-1}/\text{mg ml}^{-1}$)
	(μM)	(mg ml^{-1})			
N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	1.47	1.19×10^{-2}	16.77	4.66×10^3	389.96×10^3
N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA	1.61	1.31×10^{-2}	14.37	3.99×10^3	304.71×10^3
N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA	4.30	3.49×10^{-2}	1.39	6.49×10^2	18.60×10^3
N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA	10.32	12.04×10^{-2}	0.0077	3.614	3.29×10^3

N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA ve N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA hidrolizinin kinetik parametrelerinin hesaplanmasında kullanılan $[E]_t$ değerleri; N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ve N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA için $3.60 \times 10^{-3} \mu\text{M}$, N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA ve N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA için $2.14 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır.

4.3.8. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi üzerine aktif bölge yönelimli inhibitörlerin geri dönüşümsüz inhibisyon etkisi

Tez çalışmasında reaksiyon ortamındaki son konsantrasyonları 1, 2, 4 ve 10 mM olacak şekilde taze olarak hazırlanıp kullanılan fenilmetansülfonilflorür (PMSF, Serin), N-bromosüksinimid (Triptofan), N-p-tosil-L-fenil alanin kloro-metil keton (TPCK, Histidin), N-etilasetimidat (Lizin), iyodoasetat (Histidin), dietil-pirokarbonat (DEPC, Histidin), N- α -p-tosil-L-lizin kloro-metil keton (TLCK, Histidin), fenilglioksal (Arginin), N-etil-5-fenil-izo-okzasolium-3'-sülfonat (Woodward K reaktifi, Aspartat), iyodoasetik asit, iyodoasetimidat ve N-etilmaleimidat (Sistein) aktif bölge yönelimli geri dönüşümsüz inhibitörlerinin alkalen proteaz enzimi üzerindeki geri dönüşümsüz inhibisyon etkisi tablo 4.16'da kalan (%) enzim aktivitesi olarak verilmiştir.

Tablo 4.16: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin aktivitesi üzerine aktif bölge yönelimli inhibitörlerin geri dönüşümsüz inhibisyon etkisi

İnhibitör	Konsantrasyon, (mM)	Farklı İnhibisyon Sürelerinde Kalan Aktivite, (%)		
		0 saat	½ saat	1 saat
İyodoasetat (Histidin)	1	100.00	99.33	89.48
	2	91.19	80.97	76.26
	4	80.46	69.97	68.66
DEPC (Histidin)	1	100.00	90.74	80.98
	2	93.04	81.25	73.12
	4	81.77	77.84	71.28
TLCK (Histidin)	1	100.00	100.00	96.27
	2	97.73	100.00	98.02
	4	99.59	97.75	94.87
TPCK (Histidin)	1	100.00	77.57	71.29
	2	92.25	72.33	57.39
	4	87.53	67.35	52.41
İyodoasetik asit (Sistein)	1	98.94	96.96	96.18
	2	93.82	91.20	81.77
	4	86.75	76.26	66.83

Tablo 4.16 (Devam): *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin aktivitesi üzerine aktif bölge yönelimli inhibitörlerin geri dönüşümsüz inhibisyon etkisi

İnhibitör	Konsantrasyon, (mM)	Farklı İnhibisyon Sürelerinde Kalan Aktivite, (%)		
		0 saat	½ saat	1 saat
N-etilmaleimidat (Sistein)	1	97.01	96.18	95.66
	2	99.06	89.10	86.48
	4	98.80	80.46	78.36
N-etilasetimidat (Lizin)	1	100.00	100.00	95.04
	2	94.61	84.65	82.82
	4	80.46	73.12	68.05
Fenilglioksal (Arjinin)	1	100.00	100.00	92.25
	2	97.49	83.08	75.48
	4	84.39	66.30	61.33
Woodward K (Aspartat)	1	100.00	98.02	91.98
	2	98.80	95.92	93.04
	4	89.37	87.53	87.53
PMSF (Serin)	1	40.08	28.46	26.26
	2	37.91	28.24	14.89
	4	30.87	13.54	-
N-Bromosüksinimid (Triptofan)	1	100.00	99.33	92.77
	2	89.10	82.82	72.07
	4	80.98	70.76	64.21

Aktif bölge yönelimli geri dönüşümsüz inhibitörler arasında en yüksek inhibisyon etkisine sahip olan inhibitör PMSF olarak belirlenmiştir. Bir saat inkübasyon sonunda reaksiyon ortamındaki PMSF konsantrasyonunun 4 mM olması halinde enzim inhibitör tarafından tamamen inhibe edilmiştir. Bu sonuç enzimin serin alkalen proteaz olduğunu göstermektedir.

4.3.9. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi

Reaksiyon ortamındaki EDTA konsantrasyonunun 5 ve 10 mM olması durumunda her iki EDTA konsantrasyonunun da enzim üzerinde inhibisyon etkisi yaratmaması nedeniyle *Bacillus marmariensis* GMBE 72'den saflaştırılan alkalen proteaz enziminin metaloproteaz olmadığı sonucuna varılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar tablo 4.17'de verilmiştir.

Tablo 4.17: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi

Örnek	Kalan Aktivite, (%)
Serbest enzim (SE)	100.00
SE + 5 mM EDTA	100.00
SE + 10 mM EDTA	97.44

4.3.10. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi üzerine iki değerlikli metal iyonlarının etkisi

Alkale proteaz aktivitesi üzerine CaCl_2 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ iki değerlikli metal iyonlarının etkisi bu metal iyonlarının enzim ve substrat çözeltisi içerisinde 5 mM konsantrasyonlarında ilavesi ile 30 ve 60°C sıcaklıklarda belirlenmiştir. Cu^{2+} iyonlarının enzimi her iki sıcaklık değerinde aktive ettiği görülmüştür. Cu^{2+} iyonlarının 30 ve 60°C sıcaklıklarda enzimi sırasıyla % 152.19 ve % 210.86 oranında aktive ettiği belirlenirken Fe^{2+} iyonlarının her iki sıcaklık değerinde de enzim üzerinde kuvvetli inhibisyon etkisi yarattığı gözlenmiştir. Çalışmada diğer metal iyonlarıyla da elde edilen sonuçlar tablo 4.18’de verilmiştir.

Tablo 4.18: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzim aktivitesi üzerine iki değerlikli metal iyonlarının etkisi

Metal İyonu	Kalan Aktivite, (%)	
	30°C	60°C
Metal serbest enzim çözeltisi (MSE)	100.00	100.00
MSE + 5 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	152.19	210.86
MSE + 5 mM CaCl_2	79.26	130.12
MSE + 5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	66.30	130.15
MSE + 5 mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	78.56	126.34
MSE + 5 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	43.40	95.92
MSE + 5 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	43.16	49.40

4.3.11. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi üzerine yüzey aktif ajanların etkisi

Alkale proteaz aktivitesi üzerine reaksiyon ortamındaki % 0.2 (a/h) sodyum dodesilsülfat (SDS), % 2 (a/h) Tween-20, Tween-40, Tween-60 ve Tween-80 yüzey aktif ajanlarının etkisi bu ajanlar varlığında enzimin 1 saat süre ile 30 ve 60°C’da inkübasyonunu takiben % kalan aktivite olarak belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar tablo 4.19’da verilmiştir.

Tablo 4.19: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzim aktivitesi üzerine yüzey aktif ajanların etkisi, (SDS: Sodyumdodesil sülfat)

Yüzey Aktif Ajan	Kalan Aktivite, (%)	
	30°C	60°C
Serbest Enzim (SE)	100.00	100.00
SE + % 0.2 SDS	84.25	87.28
SE + % 2 Tween-20	190.89	207.48
SE + % 2 Tween-40	163.99	241.07
SE + % 2 Tween-60	170.38	184.35
SE + % 2 Tween-80	134.06	259.68

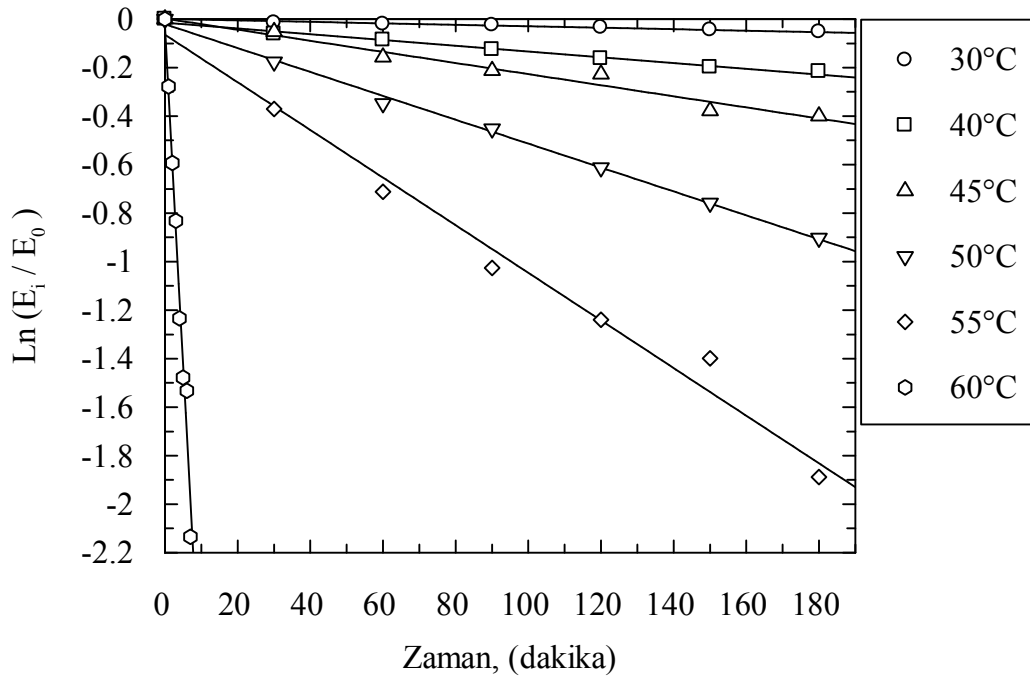
Enzimin 30°C'daki 1 saatlik inkübasyonu sonucunda anyonik yüzey aktif ajan SDS haricindeki tüm non-iyonik yüzey aktif ajanlar tarafından değişik oranlarda aktive edildiği gözlenirken SDS varlığında % 15'lik bir aktivite kaybına uğradığı gözlenmiştir. 60°C'daki 1 saatlik inkübasyonu takiben yine aynı sonuçlar gözlenmiş enzimin SDS tarafından % 20'lik bir aktivite kaybına uğratıldığı gözlenirken non-iyonik yüzey aktif ajanlar tarafından ise değişik oranlarda aktive edildiği tespit edilmiştir.

4.3.11.1. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin Tween-20 varlığında termal inaktivasyon kinetiği

Tween-20 varlığında alkalen proteaz enziminin inaktivasyon kinetiğinin incelenmesinde bölüm 3.4.9'da verilen yöntem uygulanmıştır. Enzim, %2 Tween-20 varlığında 30-55°C arasındaki sıcaklık değerlerinde 0-180 dakika zaman aralığında 30 dakika 60°C'da 0-10 dakika zaman aralığında birer dakika artan süreler ile 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi içerisinde inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda kalan aktivite değerleri kazein substratı varlığında ölçülmüştür. Daha sonra yöntem bölümünde açıklandığı üzere $\ln(E_i/E_0)$ 'a karşı t, (zaman) grafikleri oluşturularak elde edilen doğruların eğiminden her bir sıcaklığa ait termal inaktivasyon hız sabiti değerleri belirlenmiştir. % 2 Tween-20 varlığında enzim için artan sıcaklık değerlerinde zamana karşı çizilen inaktivasyon grafiği şekil 4.24'de verilmiştir.

Buna göre % 2 Tween-20 varlığında enzimin termal inaktivasyonunun birinci mertebe inaktivasyon kinetiğine uyduğu görülmüştür.

% 2 Tween-20 varlığında alkalen proteaz enziminin çalışılan sıcaklık değerlerine karşılık gelen inaktivasyon hız sabiti değerleri (k_i) ve bu değerler vasıtasıyla da $t_{1/2} = 0.693 \cdot k_i^{-1}$ bağıntısından yine her bir sıcaklık değerine karşılık gelen yarılanma ömrü değerleri belirlenmiştir. Artan sıcaklık değerlerine karşılık gelen inaktivasyon hız sabiti ve yarılanma ömrü değerleri tablo 4.20’de, stabilizasyon faktörü değerleri tablo 4.21’de verilmiştir.



Şekil 4.24: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin % 2 Tween-20 varlığında termal inaktivasyon kinetiği (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9927 ’dir)

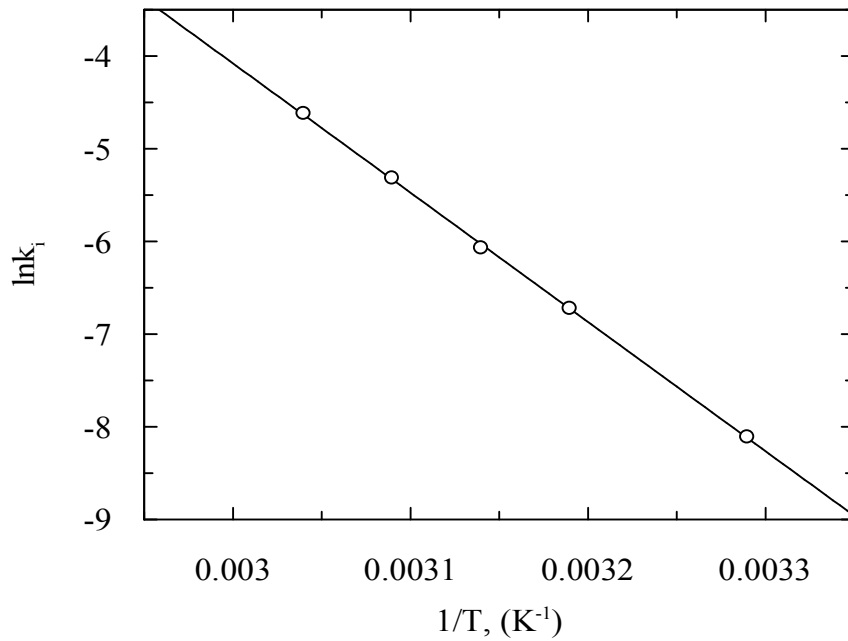
Tablo 4.20: % 2 Tween-20 varlığında ve yokluğunda alkalen proteaz enziminin farklı sıcaklık değerlerine karşılık gelen tersinmez termal inaktivasyon hız sabiti, (k_i), yarı ömür, ($t_{1/2}$), ve stabilizasyon faktörü değerleri

Sıcaklık, (°C)	İnaktivasyon hız sabiti (k_i), (dak ⁻¹)		$t_{1/2}$, (dak)		Stabilizasyon Faktörü (SF)*
	Serbest Enzim (SE)	SE + % 2 Tween-20	Serbest Enzim (SE)	SE + % 2 Tween-20	
30	0.0003	0.0003	2310.00	2475.00	1.07
40	0.0018	0.0012	385.00	577.50	1.50
45	0.0045	0.0023	154.00	301.30	1.96
50	0.0071	0.0049	97.60	143.43	1.47
55	0.0109	0.0098	63.57	70.71	1.11
60	0.0159	0.2800	43.58	2.47	0.06
65	0.0258	-	26.86	-	-
70	0.3116	-	2.22	-	-

*SF = $[t_{1/2} (SE + \% 2 \text{ Tween } 20)] / [t_{1/2} (SE)]$

4.3.11.2. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin % 2 Tween-20 varlığında termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi

% 2 Tween-20 ve kazein substratı varlığında 30-60°C arasındaki sıcaklık değerlerinde belirlenmiş enzime ait inaktivasyon hız sabitlerinin logaritmasının ($\ln k_i$) mutlak sıcaklığın resiprokal değerlerine ($1/T, K^{-1}$) karşı işaretlenmesiyle Arrhenius grafiği oluşturulmuştur. Grafikteki doğrunun eğiminden % 2 Tween-20 varlığında alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi değeri hesaplanmıştır. Alkalin proteaz enziminin termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi değerinin hesaplandığı grafik şekil 4.25’de verilmiştir.



Şekil 4.25: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalin proteaz enziminin % 2 Tween-20 varlığında termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesinde kullanılan Arrhenius grafiği ($r = 0.9998$ 'dir)

% 2 Tween-20 ve kazein substratı varlığında enzimin termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi ($E_{a,i}$) 115.94 kJ/mol (27.70 kcal mol⁻¹) olarak belirlenmiştir.

4.3.11.3. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin % 2 Tween-20 varlığında termal inaktivasyonunun termodinamik parametreleri

% 2 Tween-20 varlığında alkalen proteazın 30-60°C arasındaki sıcaklık değerlerinde geri dönüşümsüz termal inaktivasyonuna ilişkin entalpi (ΔH_i), serbest enerji (ΔG_i) ve entropi (ΔS_i) değerleri sırasıyla (2.13), (2.14) ve (2.15) denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır. % 2 Tween-20 ve kazein substratı varlığında alkalen proteaz enziminin artan sıcaklık değerlerindeki termal inaktivasyonuna ilişkin termodinamik parametreleri tablo 4.21’de verilmiştir.

Tablo 4.21: % 2 Tween-20 varlığında alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonun termodinamik parametreleri

Sıcaklık, (°C)	ΔG_i , (kJ mol ⁻¹)	ΔH_i , (kJ mol ⁻¹)	ΔS_i , (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)
30	105.04	113.429	0.0276
40	104.99	113.346	0.0266
45	104.98	113.304	0.0261
50	104.64	113.262	0.0266
55	104.41	113.221	0.0268
60	96.76	113.179	0.0492

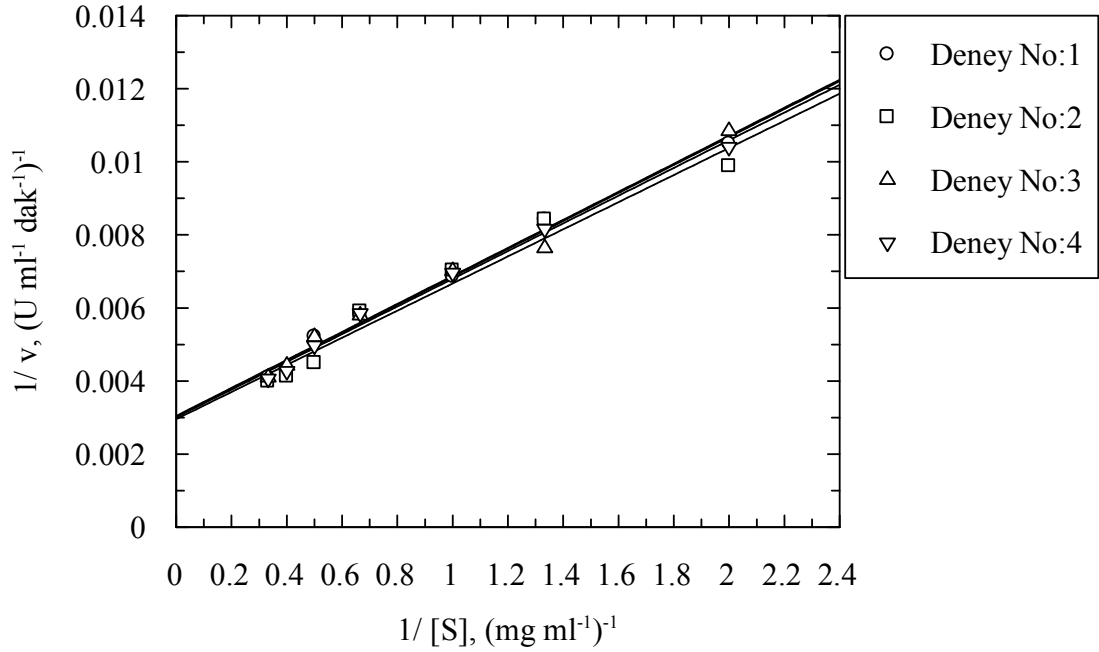
4.3.11.4. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin % 2 Tween-20 varlığında kazein hidrolizinin kinetik parametreleri

Alkalin proteaz enziminin % 2 Tween-20 varlığında; 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ve 3.0 mM substrat konsantrasyonlarında ölçülen başlangıç hızlarının resiprokal değerlerine (1/v) karşı başlangıç substrat konsantrasyonlarının resiprokal değerlerinin (1/[S]) işaretlenmesiyle oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramı şekil 4.26’da verilmiştir.

Deneyle en az 4 kez tekrarlanmış her deney sonucu için belirlenen K_m ve V_m değerlerinin ortalamaları alınmış ve ortalamaların standart sapması hesaplanarak sonuçlar tablo 4.22’de verilmiştir.

Belirtilen konsantrasyon değerleri aralığında ve % 2 Tween-20 varlığında ölçülen başlangıç hızı değerleri ile hazırlanan Lineweaver-Burk diyagramından alkalin

proteaz enziminin 30°C ve pH: 10.5'da % 2 Tween-20 varlığında kazein hidrolizinin K_m ve V_m değerleri sırasıyla 1.25 mg ml⁻¹ kazein, 1.83 µmol tirozin ml⁻¹ dak⁻¹ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.26: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin % 2 Tween-20 varlığında Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için $r \geq 9927$ 'dir)

Tablo 4.22. 30°C ve pH: 10.5'da ve % 2 Tween-20 varlığında alkale proteaz enzimi tarafından gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K_m ve V_m değerleri

Deneş no	V_m , (µmol tirozin ml ⁻¹ dak ⁻¹)	K_m , (mg ml ⁻¹)
1	1.83	1.27
2	1.83	1.23
3	1.83	1.26
4	1.83	1.26

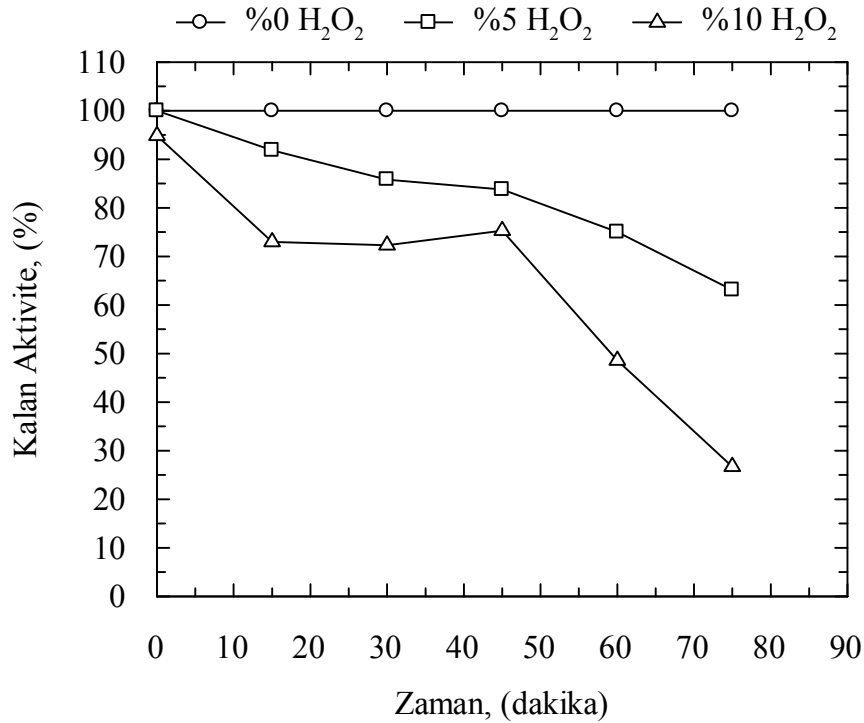
$K_{m,ort}$: 1.25, $K_{m,sem}$: 0.03, $K_m = 1.25 \pm 0.03$ mg ml⁻¹
 $V_{m,ort}$: 1.83, $V_{m,sem}$: 0.00, $V_m = 1.83 \pm 0.00$ µmol tirozin ml⁻¹ dak⁻¹

4.3.12. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enzimi üzerine hidrojen peroksit etkisi

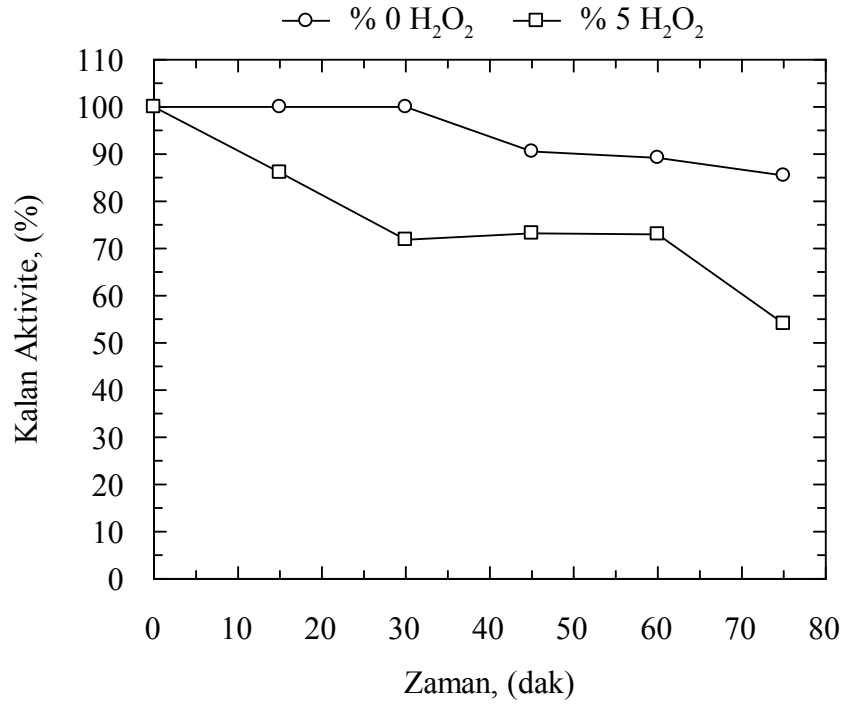
Alkale proteaz aktivitesi üzerine %0, %5 ve %10 konsantrasyonlarındaki hidrojen peroksitin etkisi reaksiyon ortamında belirtilen konsantrasyonlarda hidrojen peroksit bulduran reaksiyon karışımının 30 ve 40°C sıcaklıklarda ve 0-75 dakika arasında değişen sürelerde inkübasyonu vasıtası ile incelenmiştir. Serbest enzim 30°C'da 75

dakikalık inkübasyonu sonucunda stabilitesini % 100 oranında korurken 40°C’da ilk 30 dakika boyunca stabilitesini korumuş 75 dakika sonunda ise % 14’lük bir aktivite kaybına uğramıştır. Hidrojen peroksit varlığında inkübasyon 30°C’da % 5 ve % 10, 40°C’da ise sadece % 5 hidrojen peroksit konsantrasyonu ile yapılabilmektedir. Hidrojen peroksitin artan konsantrasyon ve sıcaklık değerlerinde kendi kendine parçalanması ve spektrofotometrik okumaları mümkün kılmaması nedeni ile daha yüksek konsantrasyon değerlerine çıkılamamıştır. Hidrojen peroksitin enzim üzerindeki inaktivasyon etkisinin gösterildiği grafikler 30 ve 40°C için sırasıyla şekil 4.27 ve şekil 4.28’de verilmiştir.

Enzimin % 5 ve % 10 hidrojen peroksit varlığında 30 °C’da 75 dakika inkübasyonu sonucunda sırasıyla % 37 ve % 73 oranında aktivite kaybına uğradığı gözlenirken % 5 hidrojen peroksit varlığında 40 °C’da aynı inkübasyon süresinde % 46 oranında aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir.



Şekil 4.27: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 30°C’da H₂O₂ varlığında inkübasyonu sonucunda gerçekleşen inaktivasyonu



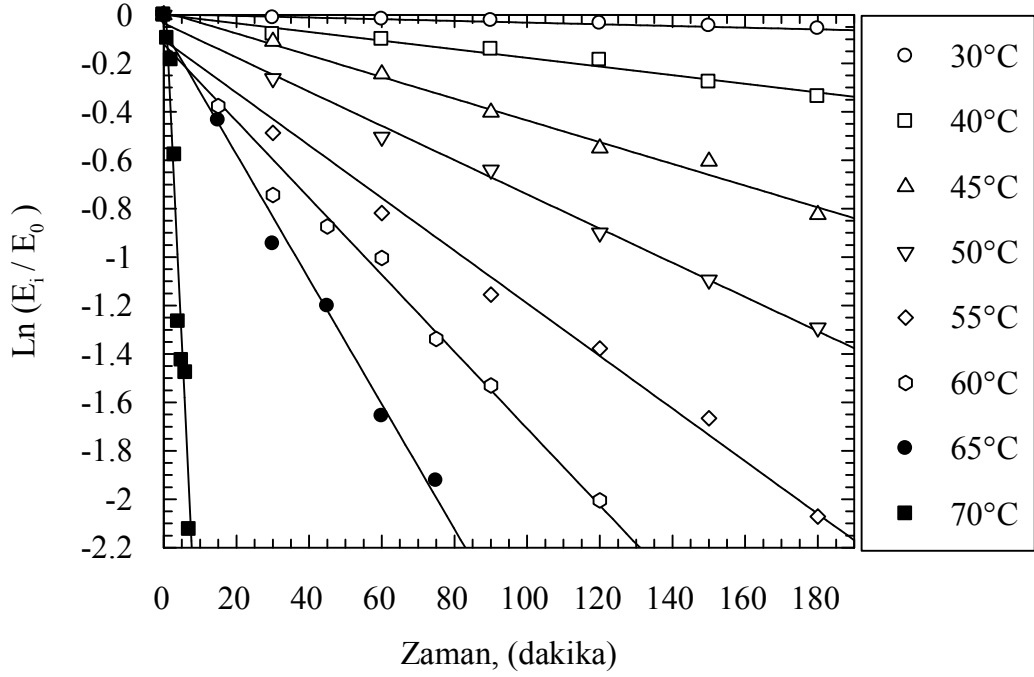
Şekil 4.28: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 40°C’da H₂O₂ varlığında inkübasyonu sonucunda gerçekleşen inaktivasyonu

4.4. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 Soyundan Saflaştırılan Alkale Proteaz Enziminin Cu²⁺ İyonları Yokluğunda ve Varlığında Termal İnaktivasyon Kinetiği

4.4.1. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enziminin termal inaktivasyon kinetiği

Alkale proteaz enziminin termal inaktivasyon kinetiğinin incelenmesinde bölüm 3.4.1’de açıklanan yöntem uygulanmış enzim çözeltisi 30, 40, 45, 50 ve 55°C’deki sıcaklık değerlerinde 0-180 dakika zaman aralığında 30 dakika, 60°C’da 0-120 dakika zaman aralığında 15 dakika, 65°C’da 0-75 dakika zaman aralığında 15 dakika, 70°C’da 0-7 dakika zaman aralığında birer dakika artan süreler ile 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi içerisinde inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda kalan aktivite değerleri kazein substratı varlığında ölçülmüştür. Daha sonra yöntem bölümünde açıklandığı üzere $\ln(E_i/E_0)$ değerlerine karşı t, (zaman) grafikleri oluşturularak elde edilen doğruların eğiminden serbest enzim için her bir sıcaklığa ait termal inaktivasyon hız sabiti değerleri belirlenmiştir. Serbest enzim için artan

sıcaklık değerlerinde zamana karşı çizilen inaktivasyon grafiği şekil 4.29'da verilmiştir. Buna göre enzimin termal inaktivasyonunun birinci mertebeden inaktivasyon kinetiğine uyduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.29: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyon kinetiği (kazein substrat, her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9866 'dır)

Cu^{2+} iyonları yokluğunda serbest alkalen proteaz enzimi için çalışılan sıcaklık değerlerine karşılık gelen enzimin inaktivasyon hız sabiti değerleri (k_i) vasıtasıyla $t_{1/2} = 0.693 \cdot k_i^{-1}$ bağıntısından yine her bir sıcaklık değerine karşılık gelen enzimin yarılanma ömrü değerleri belirlenmiştir. Artan sıcaklık değerlerine karşılık gelen inaktivasyon hız sabiti ve yarılanma ömrü değerleri tablo 4.23'de verilmiştir.

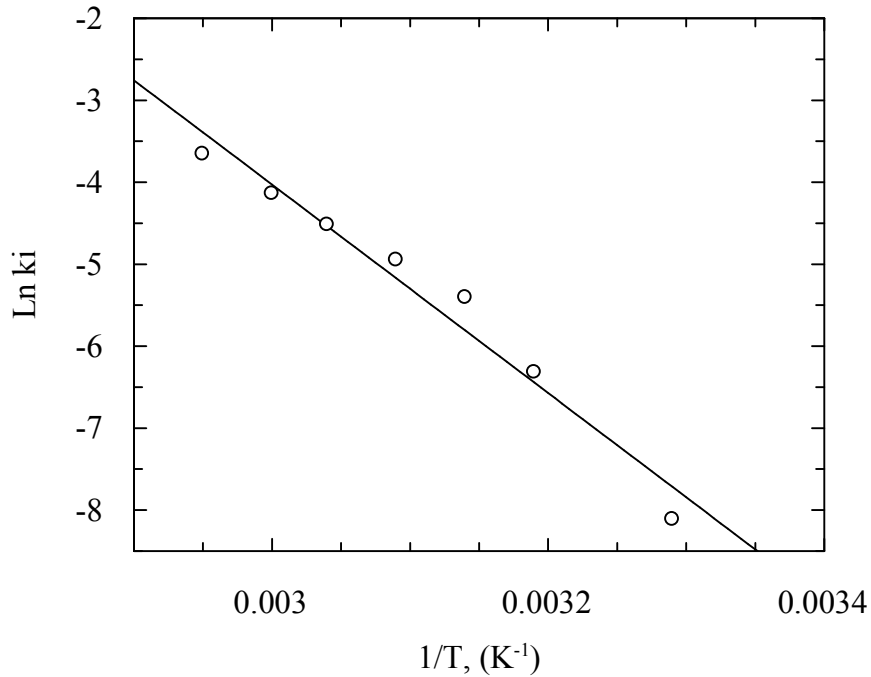
Tablo 4.23: Alkalen proteaz enziminin artan sıcaklık değerlerine karşılık gelen tersinmez termal inaktivasyon hız sabiti (k_i) ve yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) değerleri

Sıcaklık, (°C)	İnaktivasyon hız sabiti (k_i), (dak ⁻¹)	Yarılanma ömrü ($t_{1/2}$), (dak)
30	0.0003	2310.00
40	0.0018	385.00
45	0.0045	154.00
50	0.0071	97.60
55	0.0109	63.57
60	0.0159	43.58
65	0.0258	26.86
70	0.3116	2.22

4.4.2. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi

Kazein substratı varlığında 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70°C sıcaklık değerlerinde belirlenmiş enzime ait inaktivasyon hız sabitlerinin logaritmasının ($\ln k_i$) mutlak sıcaklığın resiprokal değerlerine ($1/T$) karşı işaretlenmesiyle Arrhenius grafiği oluşturulmuştur. Grafikteki doğrunun eğiminden serbest alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi değeri hesaplanmıştır (Şekil 4.30).

Kazein substratı varlığında serbest enzimin termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi ($E_{a,i}$) $105.73 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($25.26 \text{ kcal mol}^{-1}$) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.30: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonunun aktivasyon enerjisinin belirlenmesinde kullanılan Arrhenius grafiği ($r = 0.9827$ 'dir)

4.4.3. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonuna ilişkin termodinamik parametreler

Serbest alkalen proteazın 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70°C sıcaklık değerlerinde gözlenen geri dönüşümsüz termal inaktivasyonuna ilişkin entalpi (ΔH_i), serbest enerji (ΔG_i) ve entropi (ΔS_i) değerleri sırasıyla (2.13), (2.14) ve (2.15) denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır. Alkalin proteaz enziminin kazein substratı varlığında termal inaktivasyonuna ilişkin elde edilen termodinamik parametreleri tablo 4.24’de verilmiştir.

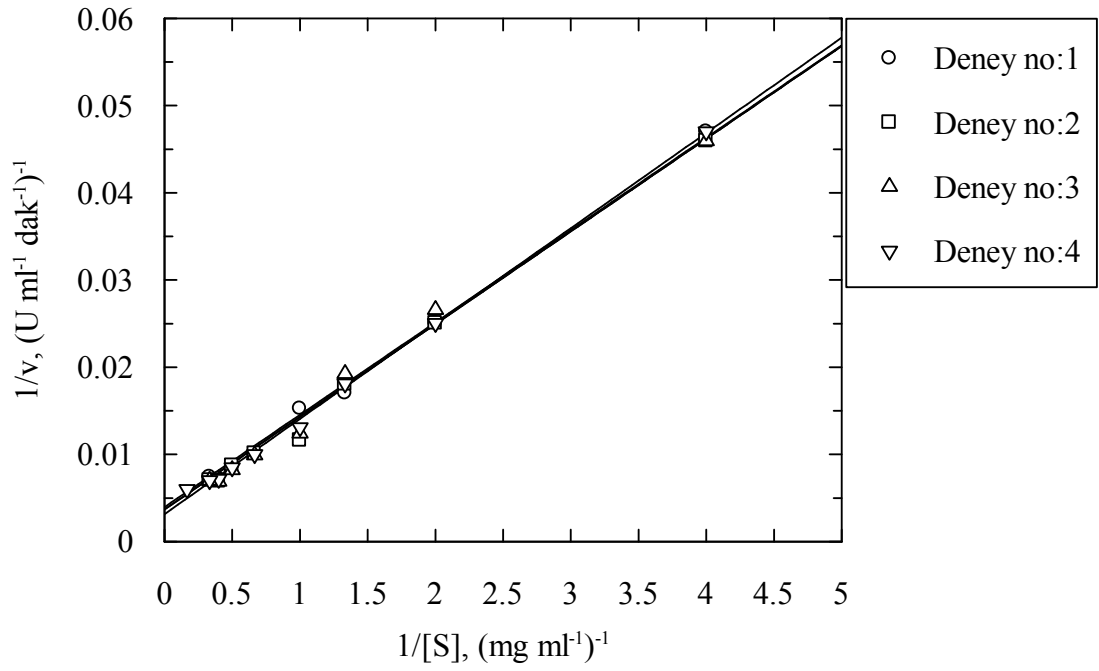
Tablo 4.24: Alkalin proteaz enziminin termal inaktivasyonun termodinamik parametreleri

Sıcaklık, (°C)	ΔG_i , (kJ mol ⁻¹)	ΔH_i , (kJ mol ⁻¹)	ΔS_i , (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)
30	105.05	103.21	-0.0061
40	103.93	103.13	-0.0025
45	103.21	103.08	-0.0004
50	103.65	103.04	-0.0019
55	104.12	103.00	-0.0034
60	104.71	102.96	-0.0052
65	104.96	102.92	-0.0060
70	99.45	102.87	-0.0099

4.4.4. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalin proteaz enziminin artan sıcaklıklardaki kazein hidrolizine ilişkin kinetik parametreleri

Alkalin proteaz enziminin 30, 40, 45, 50, 55, 60, 62.5, 65, 67.5 ve 70°C sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilen kazein hidrolizinin kinetik parametreleri (K_m , V_m) her bir sıcaklık değeri için Lineweaver-Burk diyagramı oluşturularak belirlenmiştir. Artan sıcaklık değerleri için artan substrat konsantrasyonlarına karşı gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramları sırasıyla şekil 4.31, şekil 4.32, şekil 4.33, şekil 4.34, şekil 4.35, şekil 4.36, şekil 4.37, şekil 4.38, şekil 4.39 ve şekil 4.40’da verilmiştir.

Her sıcaklıkta deneyler en az 3 kez tekrarlanmış, deneyler sonucu belirlenen V_m ve K_m değerlerinin ortalamaları alınmış ve ortalamaların standart sapması hesaplanarak sonuçları sırasıyla tablo 4.25, tablo 4.26, tablo 4.27, tablo 4.28, tablo 4.29, tablo 4.30, tablo 4.31, tablo 4.32, tablo 4.33 ve tablo 4.34’de verilmiştir.



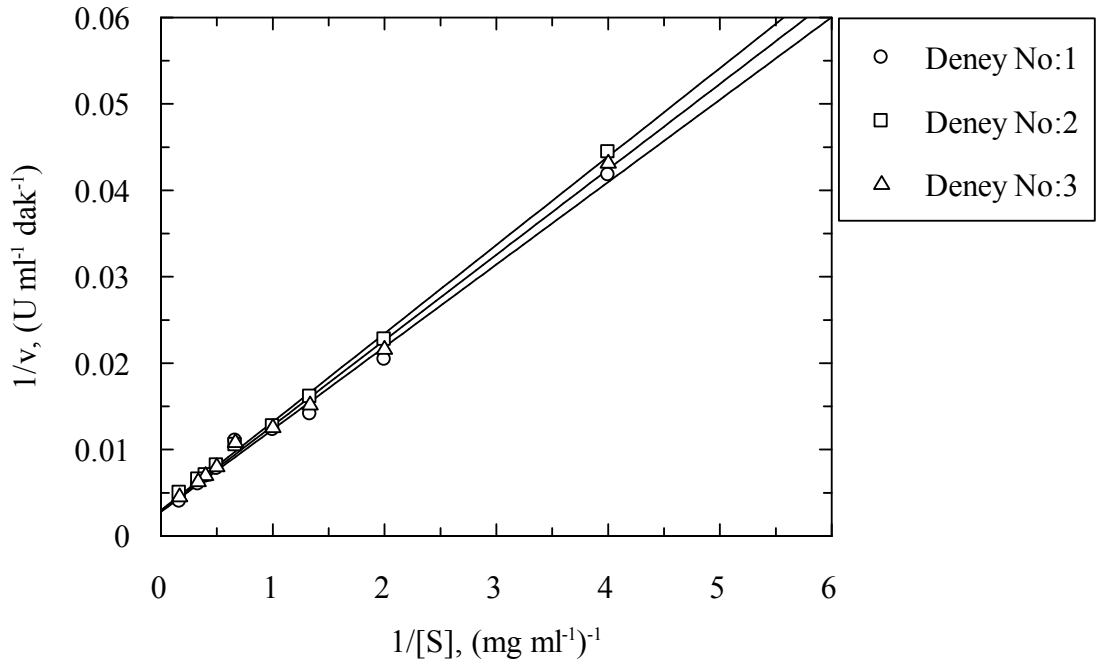
Şekil 4.31: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalin proteaz enzimi tarafından 30°C’de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9991 ’dir)

Tablo 4.25: Serbest alkalin proteaz enziminin 30°C’de K_m ve V_m değerleri

Deney no	V_m , ($\mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$)	K_m , (mg ml^{-1})
1	1.53	3.00
2	1.57	3.03
3	1.57	3.05
4	1.72	3.40

$$K_{m,ort} : 3.12, K_{m,sem} : 0.07, K_m = 3.12 \pm 0.07 \text{ mg ml}^{-1}$$

$$V_{m,ort} : 1.60, V_{m,sem} : 0.16, V_m = 1.60 \pm 0.16 \mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$$



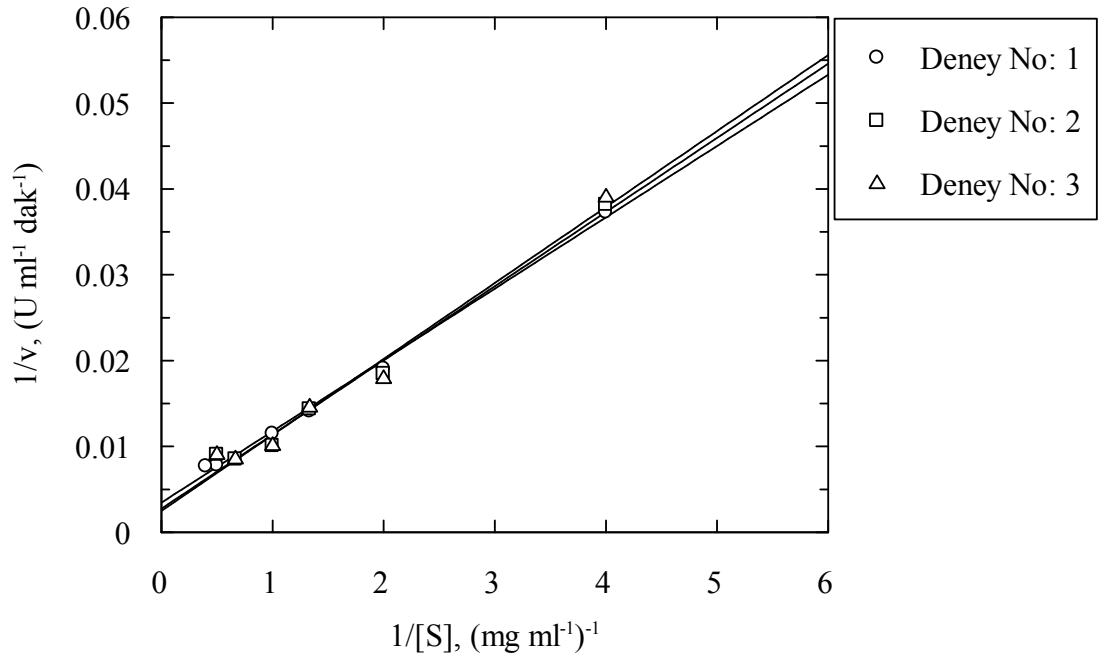
Şekil 4.32: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkale proteaz enzimi tarafından 40°C’de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9961 ’dir)

Tablo 4.26: Serbest alkale proteaz enziminin 40°C’de K_m ve V_m değerleri

Deneý No	V_m ($\mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$)	K_m (mg ml^{-1})
1	1.97	3.39
2	1.84	3.40
3	1.90	3.41

$$K_{m,ort} : 3.40, K_{m,sem} : 0.01, K_m = 3.40 \pm 0.01 \text{ mg ml}^{-1}$$

$$V_{m,ort} : 1.90, V_{m,sem} : 0.04, V_m = 1.90 \pm 0.04 \mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$$



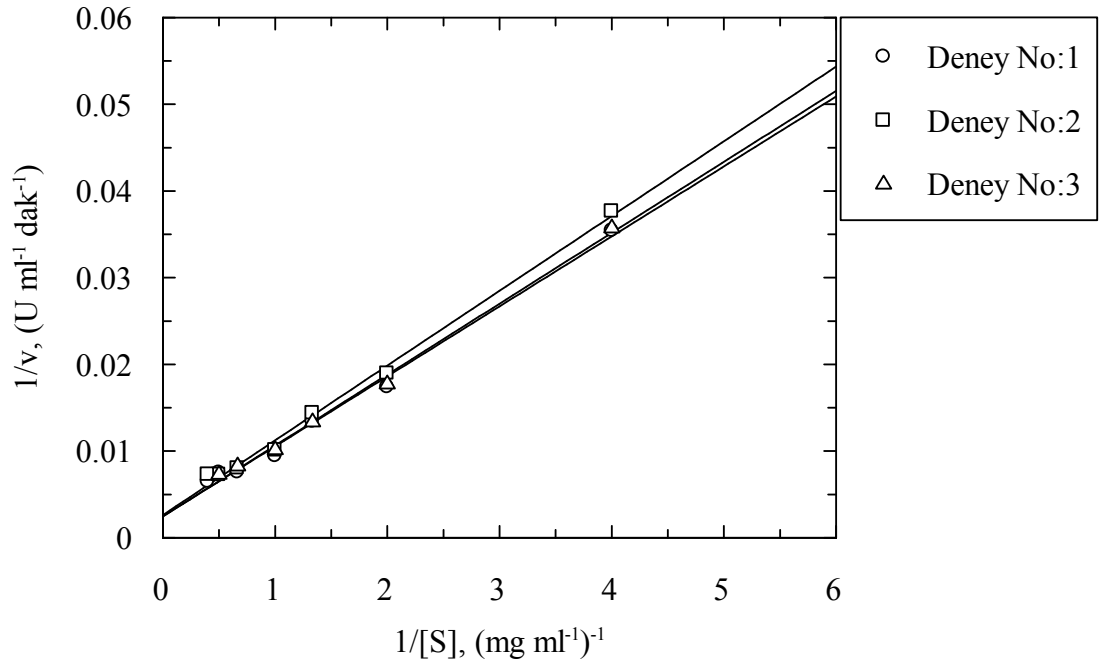
Şekil 4.33: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 45°C'de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9905 'dir)

Tablo 4.27: Serbest alkalen proteaz enziminin 45°C'de K_m ve V_m değerleri

Deney No	V_m ($\mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$)	K_m (mg ml^{-1})
1	2.12	3.85
2	2.04	3.18
3	2.21	3.56

$$K_{m,ort} : 3.53, K_{m,sem} : 0.19, K_m = 3.53 \pm 0.19 \text{ mg ml}^{-1}$$

$$V_{m,ort} : 2.12, V_{m,sem} : 0.05, V_m = 2.12 \pm 0.05 \mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$$



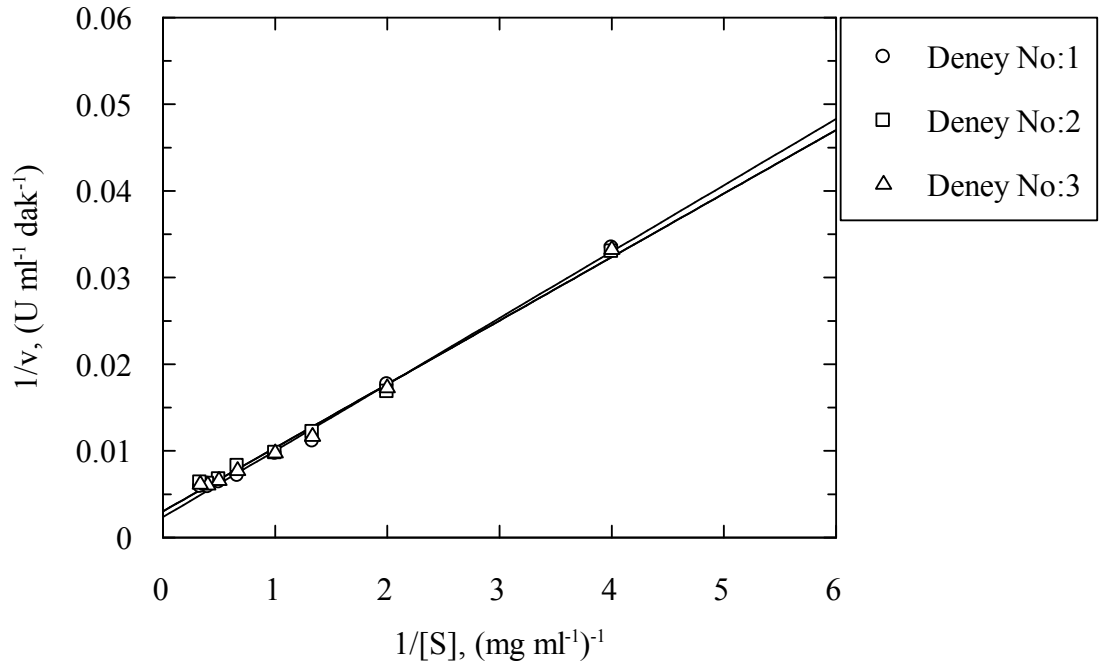
Şekil 4.34: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 50°C’de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9961 ’dir)

Tablo 4.28: Serbest alkalen proteaz enziminin 50°C’de K_m ve V_m değerleri

Deneý No	V_m ($\mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$)	K_m (mg ml^{-1})
1	2.12	3.19
2	2.19	3.24
3	2.20	3.28

$$K_{m,\text{ort}} : 3.24, K_{m,\text{sem}} : 0.08, K_m = 3.24 \pm 0.08 \text{ mg ml}^{-1}$$

$$V_{m,\text{ort}} : 2.17, V_{m,\text{sem}} : 0.03, V_m = 2.17 \pm 0.03 \mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$$



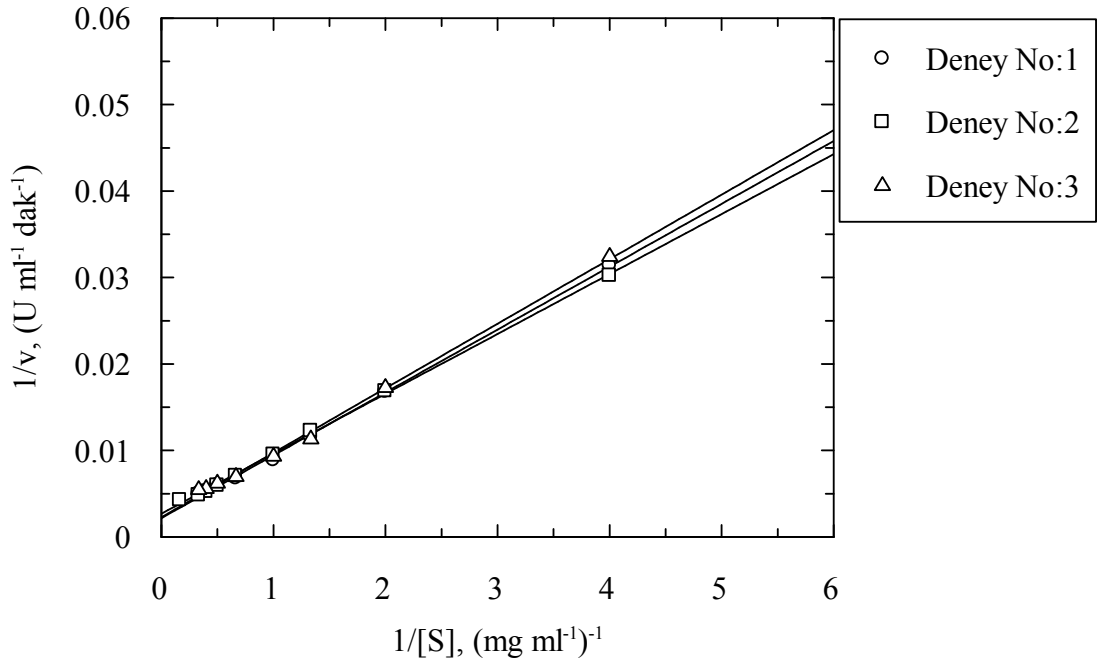
Şekil 4.35: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 55°C’de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9970 ’dir)

Tablo 4.29: Serbest alkalen proteaz enziminin 55°C’de K_m ve V_m değerleri

Deneý No	V_m ($\mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$)	K_m (mg ml^{-1})
1	2.30	3.21
2	1.84	3.43
3	1.84	3.43

$K_{m,ort} : 3.35, K_{m,sem} : 0.26, K_m = 3.35 \pm 0.26 \text{ mg ml}^{-1}$

$V_{m,ort} : 1.99, V_{m,sem} : 0.45, V_m = 1.99 \pm 0.45 \mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$



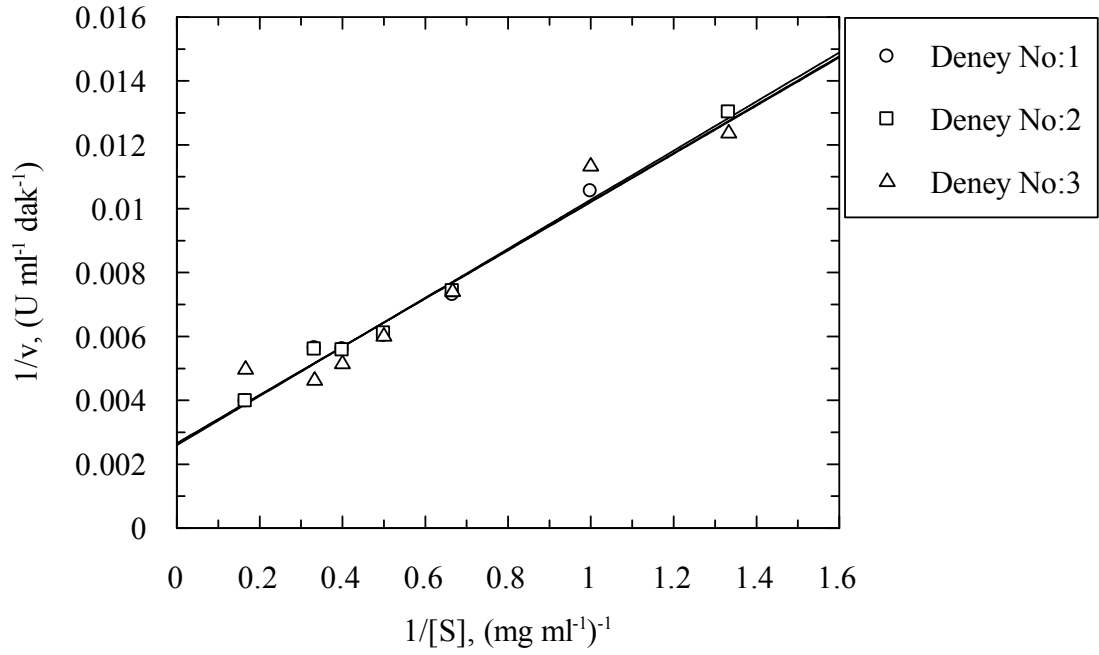
Şekil 4.36: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 60°C’de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9985 ’dir)

Tablo 4.30: Serbest alkalen proteaz enziminin 60°C’de K_m ve V_m değerleri

Deneý No	V_m ($\mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$)	K_m (mg ml^{-1})
1	2.51	3.32
2	2.04	2.55
3	2.40	3.26

$$K_{m,\text{ort}} : 3.04, K_{m,\text{sem}} : 0.25, K_m = 3.04 \pm 0.25 \text{ mg ml}^{-1}$$

$$V_{m,\text{ort}} : 2.32, V_{m,\text{sem}} : 0.14, V_m = 2.32 \pm 0.14 \mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$$



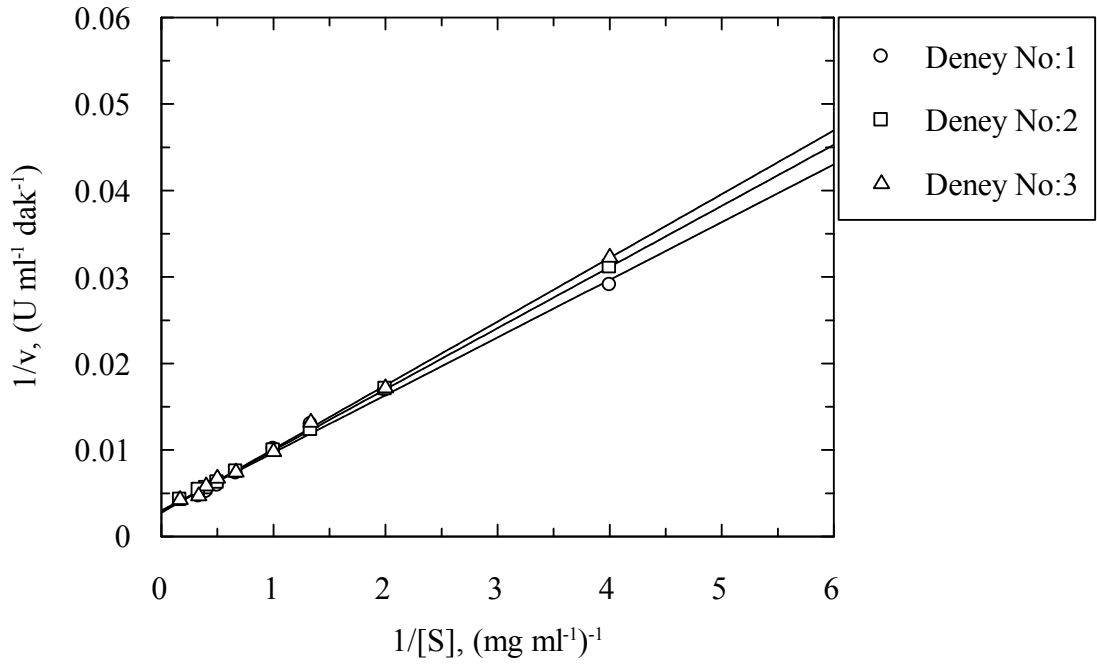
Şekil 4.37: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 62.5°C’de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9868 ’dir)

Tablo 4.31: Serbest alkalen proteaz enziminin 62.5°C’de K_m ve V_m değerleri

Deneý No	V_m ($\mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$)	K_m (mg ml^{-1})
1	2.12	2.92
2	2.12	2.95
3	2.07	2.84

$K_{m,ort}$:2.90, $K_{m,sem}$: 0.03, $K_m = 2.90 \pm 0.03 \text{ mg ml}^{-1}$

$V_{m,ort}$:2.10, $V_{m,sem}$: 0.02, $V_m = 2.10 \pm 0.02 \mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$



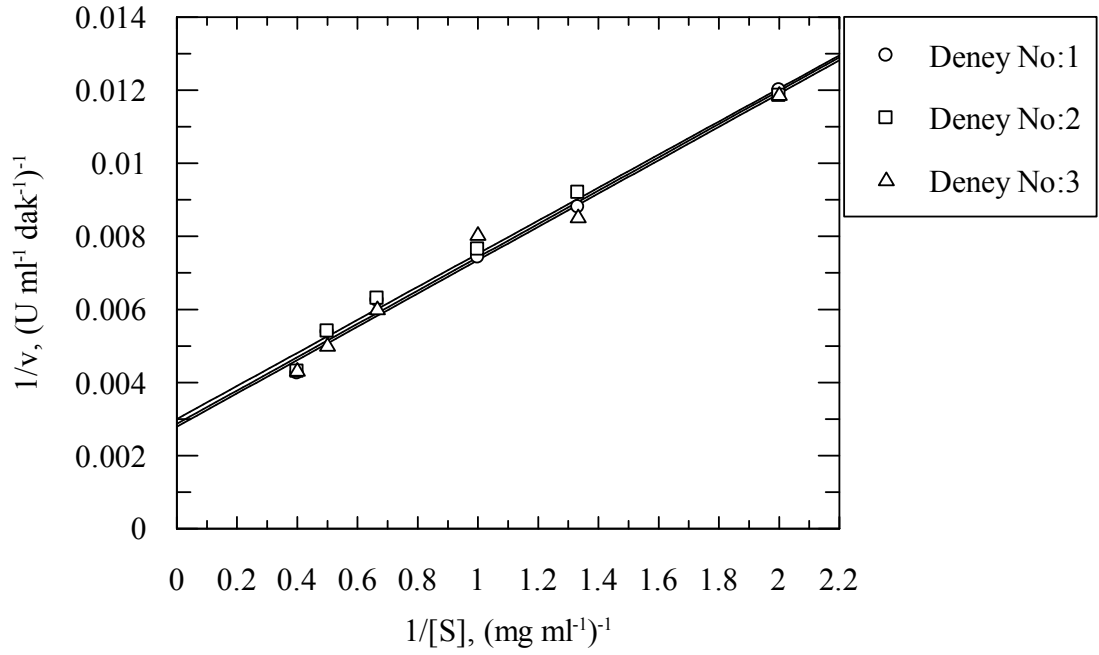
Şekil 4.38: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 65°C’de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9973 ’dür)

Tablo 4.32: Serbest alkalen proteaz enziminin 65°C’de K_m ve V_m değerleri

Deneý No	V_m ($\mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$)	K_m (mg ml^{-1})
1	1.84	2.23
2	1.85	2.44
3	1.97	2.64

$$K_{m,ort} : 2.44, K_{m,sem} : 0.12, K_m = 2.44 \pm 0.12 \text{ mg ml}^{-1}$$

$$V_{m,ort} : 1.87, V_{m,sem} : 0.04, V_m = 1.87 \pm 0.04 \mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$$



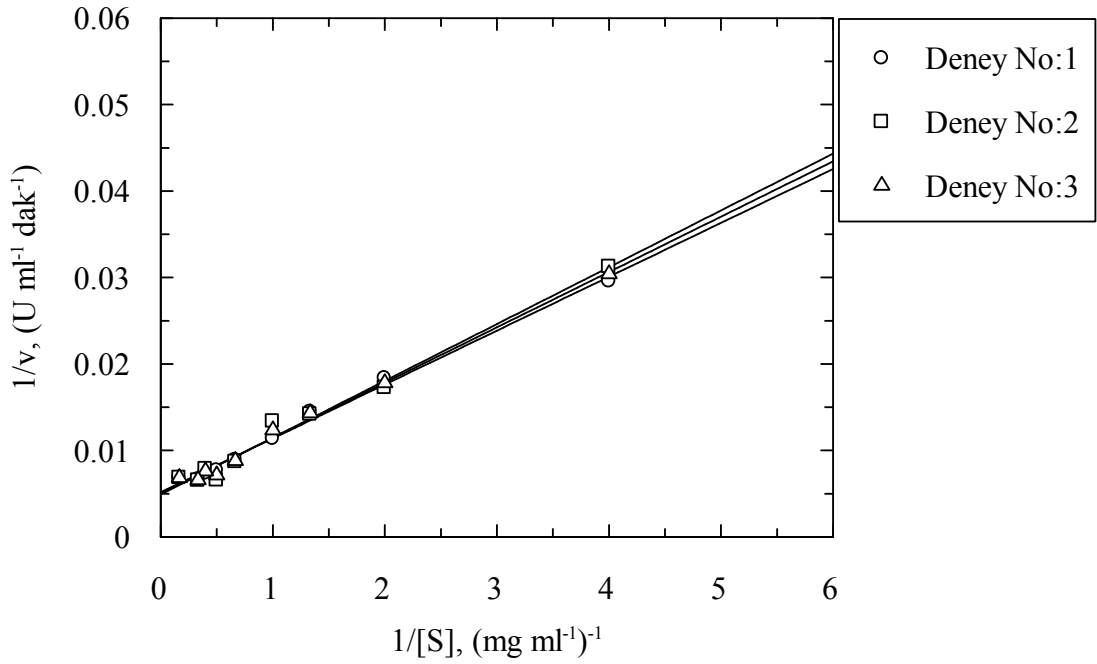
Şekil 4.39: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 67.5°C’de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9973 ’dür)

Tablo 4.33: Serbest alkalen proteaz enziminin 67.5°C’de K_m ve V_m değerleri

Deneý No	V_m ($\mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$)	K_m (mg ml^{-1})
1	1.90	1.58
2	1.84	1.50
3	1.97	1.64

$$K_{m,ort} : 1,57 \quad K_{m,sem} : 0.04, \quad K_m = 1.57 \pm 0.04 \text{ mg ml}^{-1}$$

$$V_{m,ort} : 1.90, \quad V_{m,sem} : 0.04, \quad V_m = 1.90 \pm 0.04 \mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$$



Şekil 4.40: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 70°C’de gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9961 ’dir)

Tablo 4.34: Serbest alkalen proteaz enziminin 70°C’de K_m ve V_m değerleri

Deneý No	V_m ($\mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$)	K_m (mg ml^{-1})
1	1.06	1.19
2	1.12	1.35
3	1.10	1.28

$$K_{m,ort} : 1.27, K_{m,sem} : 0.05, K_m = 1.27 \pm 0.05 \text{ mg ml}^{-1}$$

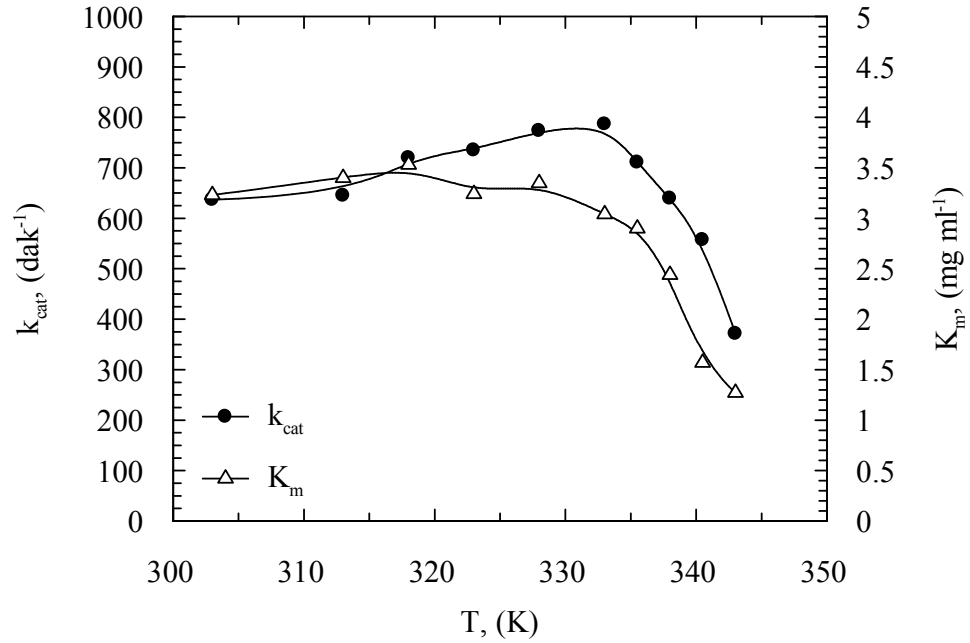
$$V_{m,ort} : 1.09, V_{m,sem} : 0.02, V_m = 1.09 \pm 0.02 \mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$$

Enzimin her bir sıcaklık değerine ait katalitik hız sabiti (k_{cat}) 30°C için $[E]_t = 0.0027 \mu\text{mol ml}^{-1}$ 40, 45, 50, 55, 60, 62.5, 65, 67.5 ve 70°C için $[E]_t = 0.0029 \mu\text{mol ml}^{-1}$ alınarak $V_m = k_{cat} \cdot [E]_t$ bağıntısından hesaplanmıştır. Aynı yaklaşımlar katalitik performans değerlerinin (k_{cat} / K_m oranı) belirlenmesinde de uygulanmıştır. Serbest alkalen proteaz enziminin 30, 40, 45, 50, 55, 60, 62.5, 65, 67.5 ve 70°C sıcaklıklara ilişkin belirlenen K_m , V_m , k_{cat} ve k_{cat} / K_m değerlerinin toplu sonuçları tablo 4.35’de verilmiştir.

Tablo 4.35: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin artan sıcaklıklardaki kazein hidrolizi için belirlenmiş kinetik parametreleri

Sıcaklık (°C)	V_m ($\mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$)	K_m (mg ml^{-1})	k_{cat} (dak^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{dak}^{-1}/\text{mg ml}^{-1}$)
30	1.52	3.23	637.03	187.22
40	1.90	3.40	645.19	189.77
45	2.12	3.53	719.51	204.77
50	2.17	3.24	735.23	226.92
55	2.29	3.35	773.72	230.96
60	2.32	3.04	786.44	258.69
62.5	2.10	2.90	710.81	245.10
65	1.87	2.44	639.40	262.05
67.5	1.84	1.57	557.37	355.01
70	1.09	1.27	371.20	292.28

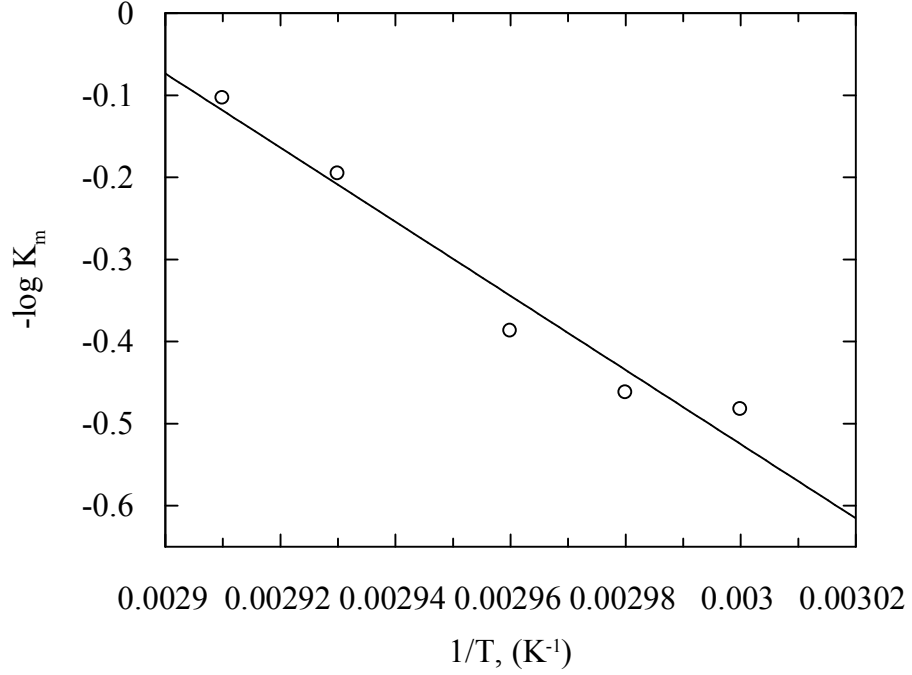
Alkalin proteaz enziminin 30-70°C arasındaki sıcaklık değerlerinde k_{cat} ve K_m kinetik parametrelerinin değişimini gösteren grafik Şekil 4.41’de verilmiştir.



Şekil 4.41: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalin proteaz enziminin artan sıcaklıklardaki kazein hidrolizi için belirlenmiş kinetik parametrelerinin değişimi

Alkalin proteaz enziminin 60°C’den sonraki K_m , V_m ve diğer katalitik parametrelerindeki düşüşün değerlendirilebilmesi için bölüm 2.8.7’de açıklandığı üzere 60°C’nin üzerindeki sıcaklık değerlerinde enzimin yatışkın hal kinetiğinden hızlı denge kinetiğine (Hızlı denge sistemlerinde $K_m = K_s$ ’dir) dönüş yaptığı düşünülmektedir. 60°C’nin üzerindeki her bir sıcaklık değerine karşılık gelen K_m değerlerinin logaritması alınarak $\log K_m$ ’e karşı $1/T$ (K^{-1}), grafiği çizilmiş elde

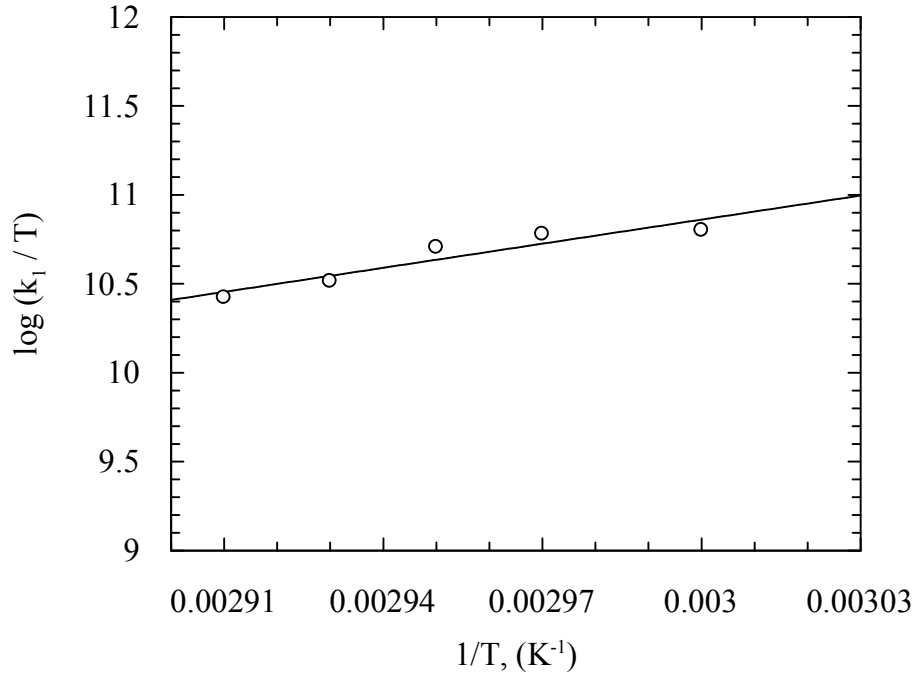
edilen linear doğrunun eğiminden de dissosiasyon tepkimesinin entalpi, (ΔH^0), değeri belirlenmiştir. ΔH^0 , değerinin belirlendiği grafik şekil 4.42’de verilmiştir.



Şekil 4.42: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hızlı denge reaksiyonunun standart entalpi, (ΔH^0), değişimi değerinin belirlendiği grafik

Alkalin proteaz enziminin dissosiasyon tepkimesinin entalpi, (ΔH^0), değeri -86.46 kJ mol⁻¹ olarak belirlenmiştir.

Enzim ile farklı sıcaklıklarda (2.25) bağıntısı ile hesaplanan $E+S \xrightarrow{k_1} ES$ reaksiyonuna ilişkin k_1 değerleri, $\log(k_1 / T)$ 'ye karşı $1 / T$ grafiğine geçirilmiş ve elde edilen linear doğrunun eğiminden de aktive geçiş hali entalpisi, (ΔH^\ddagger), değeri belirlenmiştir (Şekil 4.43).



Şekil 4.43: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin ΔH^\ddagger değerinin belirlenmesinde kullanılan $\log(k_1/T)$ 'ye karşı $1/T$ diyagramı ($r = 0.9386$ 'dır)

Alkalin proteaz enziminin enzim-substrat kompleksi aktive geçiş hali entalpisi, (ΔH^\ddagger), değeri $-86.46 \text{ kJ mol}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Enzim-substrat kompleksi aktive geçiş hali termodinamik parametreleri tablo 4.36'da verilmiştir.

Tablo 4.36: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalin proteaz enziminin artan sıcaklıklardaki aktive geçiş hali termodinamik parametreleri

Sıcaklık, (°C)	k_1	ΔH^0 , (kJ mol ⁻¹)	ΔH^\ddagger , (kJ mol ⁻¹)	ΔG^0 , (kJ mol ⁻¹)	ΔG^\ddagger , (kJ mol ⁻¹)	ΔS^0 , (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔS^\ddagger , (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)
60	2.11×10^{13}	-86.46	-86.46	-3.080	-3.080	0.268	0.268
62.5	2.03×10^{13}	-86.46	-86.46	-2.971	-2.971	0.266	0.266
65	1.72×10^{13}	-86.46	-86.46	-2.508	-2.507	0.263	0.263
67.5	1.11×10^{13}	-86.46	-86.46	-1.278	-1.277	0.257	0.257
70	9.07×10^{12}	-86.46	-86.46	-0.682	-0.681	0.253	0.253

4.4.5. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalin proteaz enziminin artan sıcaklık değerlerindeki kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametreleri

Serbest alkalin proteazın 30, 40, 45, 50, 55, 60, 62.5, 65, 67.5 ve 70°C arasındaki sıcaklık değerlerindeki kazein hidrolizine ilişkin artan sıcaklıklardaki aktivasyon serbest enerjisi (ΔG^\ddagger), aktivasyon entalpisi (ΔH^\ddagger), aktivasyon entropisi (ΔS^\ddagger), kazein

bağlanması için tranzisyon hali serbest enerjisi ($\Delta G_{E-T}^{\#}$) ve kazein bağlanma serbest enerjisi (ΔG_{E-S}) sırasıyla (2.16), (2.17), (2.18), (2.19), (2.20) nolu denklemler kullanılarak hesaplanmıştır. Alkalen proteaz enzimi tarafından artan sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilen kazein hidrolizine ilişkin elde edilen termodinamik parametreler tablo 4.37’de verilmiştir.

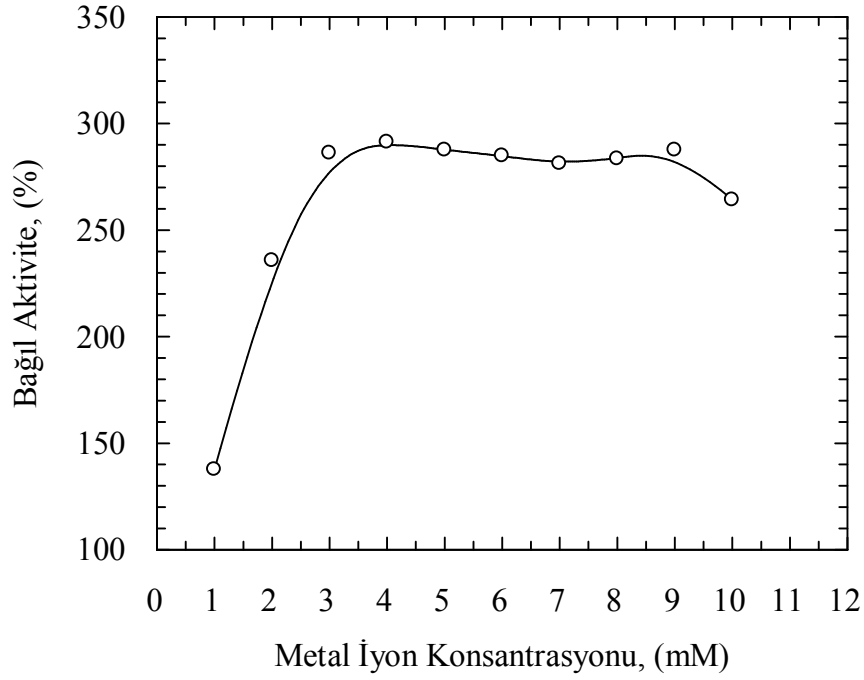
Tablo 4.37: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından artan sıcaklıklarda gerçekleştirilen kazein hidrolizinin termodinamik parametreleri

Sıcaklık (°C)	$\Delta G^{\#}$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta H^{\#}$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta S^{\#}$ (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	$\Delta G_{E-T}^{\#}$ (kJ mol ⁻¹)	ΔG_{E-S} (kJ mol ⁻¹)
30	68.36	45.57	-0.0751	13.16	3.08
40	70.56	45.48	-0.0800	13.74	3.18
45	71.63	45.44	-0.0823	14.23	3.06
50	72.59	45.40	-0.0841	14.60	3.16
55	73.65	45.36	-0.0862	14.96	3.18
60	74.56	45.32	-0.0877	15.35	3.15
62.5	75.67	45.30	-0.0904	15.35	2.97
65	76.60	45.27	-0.0926	15.82	2.25
67.5	77.49	45.25	-0.0946	15.98	1.28
70	79.34	45.23	-0.0994	16.28	0.49

4.4.6. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi üzerinde en yüksek stabilizasyon etkisi gösteren Cu²⁺ metal iyonu konsantrasyonu

Divalent metal iyonları ile yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde enzim aktivitesi üzerinde en yüksek stabilizasyon etkisi yaratan metal iyonunun Cu²⁺ olduğu tespit edilmiştir (bölüm 4.3.10). Bu iyonun en yüksek stabilizasyon etkisi gösterdiği optimum metal iyonu konsantrasyonunun belirlenmesi amacı ile 1 ile 10 mM aralığında artan konsantrasyonlardaki metal iyonu bulunduran enzim çözeltilerinin aktiviteleri bölüm 3.1.5’de verilen alkalen proteaz aktivitesi tayin yöntemi ile belirlenmiştir.

En yüksek stabilizasyon etkisi gösteren Cu²⁺ iyonu konsantrasyonunun 4 mM olduğu belirlenmiş ve takip eden Cu²⁺ iyonları stabilizasyon çalışmalarında tespit edilen bu konsantrasyon değeri kullanılmıştır (Şekil 4.44).

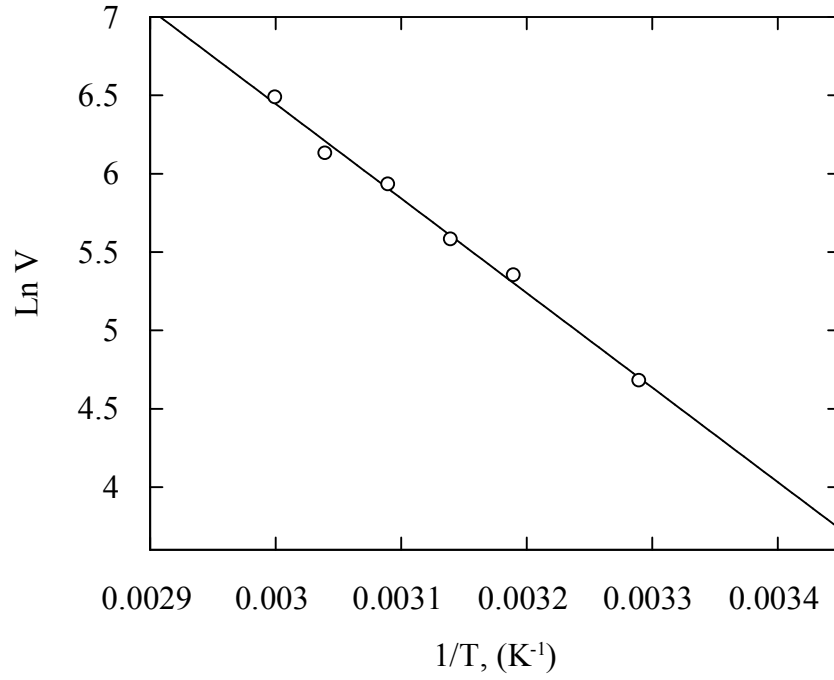


Şekil 4.44: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalin proteaz enzimi üzerinde optimum aktivasyon etkisi yaratan metal iyon konsantrasyonunun belirlenmesi

4.4.7. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalin proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Arrhenius aktivasyon enerjisi

Bacillus marmariensis GMBE 72'den izole edilen alkalin proteaz enziminin Cu²⁺ iyonları varlığında sıcaklık profili 30 ile 80°C'lar arasında belirlenmiş ve şekil 4.14'de verilmiştir. Enzimin optimum sıcaklığı 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında 60°C olarak belirlenmiştir.

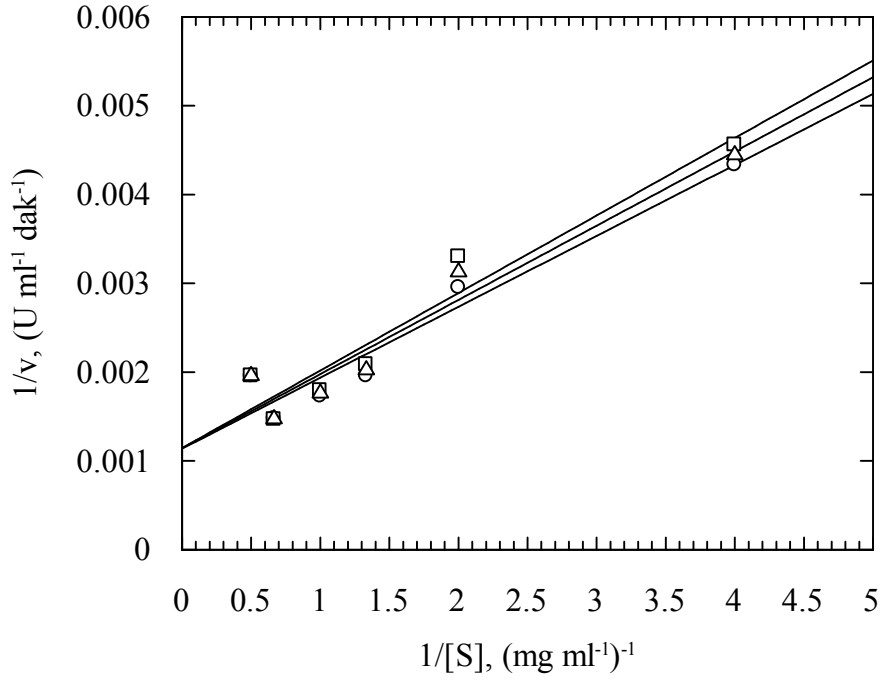
Alkalin proteazın 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında kazein hidrolizinin aktivasyon enerjisi 30-75°C'lar arasında 5°C'lık artan sıcaklık değerlerinde ölçülen başlangıç hızlarının logaritmik değerlerinin (ln v) mutlak sıcaklığın resiprokaline [1/T, (K⁻¹)] karşı işaretlenmesiyle elde edilen Arrhenius diyagramındaki doğrunun eğiminden hesaplanmıştır. Buna göre alkalin proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında kazein hidrolizinin Arrhenius aktivasyon enerjisi (E_a) Arrhenius lineer grafiğinin eğiminden 50.15 kJ mol⁻¹ (11.98 kcal mol⁻¹) olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.45).



Şekil 4.45: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında kazein hidrolizinin Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesinde kullanılan Arrhenius grafiği (r = 0.9971'dir)

4.4.8. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin kinetik parametreleri

Bacillus marmariensis GMBE 72'den saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında kazein hidrolizinin kinetik parametrelerini belirlemek amacı ile 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 ve 6.0 mM substrat konsantrasyonu varlığında ölçülen başlangıç hızlarının resiprokal değerlerine (1/v) karşı başlangıç substrat konsantrasyonlarının resiprokal değerlerinin (1/[S]) işaretlenmesiyle oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramı şekil 4.46'da çalışmadan elde edilen deney sonuçları ise toplu olarak tablo 4.38'de verilmiştir.



Şekil 4.46: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r ≥ 9660'dır)

Tablo 4.38: Alkalin proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında 30°C ve pH 10.5'da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K_m ve V_m değerleri

Deney no	V _m , (µmol tirozin ml ⁻¹ dak ⁻¹)	K _m , (mg ml ⁻¹)
1	5.02	0.73
2	5.02	0.82
3	5.02	0.73

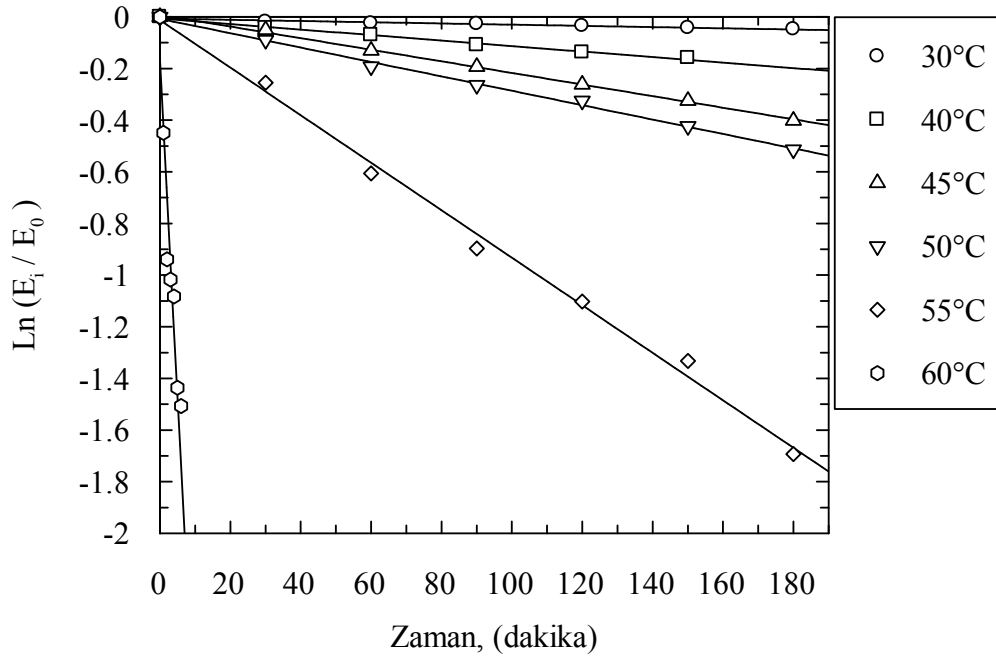
K_{m,ort} : 0.76, K_{m,sem} : 0.03, K_m = 0.76 ± 0.03 mg ml⁻¹
V_{m,ort} : 5.02, V_{m,sem} : 0.00, V_m = 5.02 ± 0.00 µmol tirozin ml⁻¹ dak⁻¹

Belirtilen konsantrasyon aralığında ölçülen başlangıç hızı değerleri ile hazırlanan Lineweaver-Burk diyagramlarından alkalin proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında 30°C ve pH: 10.5'de kazein hidrolizinin K_m ve V_m değerleri sırasıyla 0.76 mg ml⁻¹ kazein ve 5.02 µmol tirozin ml⁻¹ dak⁻¹ olarak bulunmuştur.

4.4.9. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalin proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında termal inaktivasyon kinetiği

4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında alkalin proteaz enziminin inaktivasyon kinetiğinin incelenmesinde bölüm 3.4.9'da verilen yöntem uygulanmıştır. Enzim 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında 30-55°C arasındaki sıcaklık değerlerinde 0-180 dakika zaman

aralığında 30 dakika 60°C’da 0-6 dakika zaman aralığında birer dakika artan süreler ile 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi içerisinde inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda kalan aktivite değerleri kazein substratı varlığında ölçülmüştür. Daha sonra yöntem bölümünde açıklandığı üzere $\ln(E_t/E_0)$ ’a karşı t, (zaman) grafikleri oluşturularak elde edilen doğruların eğiminden her bir sıcaklığa ait termal inaktivasyon hız sabiti değerleri belirlenmiştir. 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında enzim için artan sıcaklık değerlerinde zamana karşı çizilen inaktivasyon grafiği şekil 4.47’de verilmiştir. Buna göre 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında da enzimin termal inaktivasyonunun birinci mertbe inaktivasyon kinetiğine uyduğu görülmüştür.



Şekil 4.47: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalin proteaz enziminin 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında termal inaktivasyon kinetiği (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9852 ’dir)

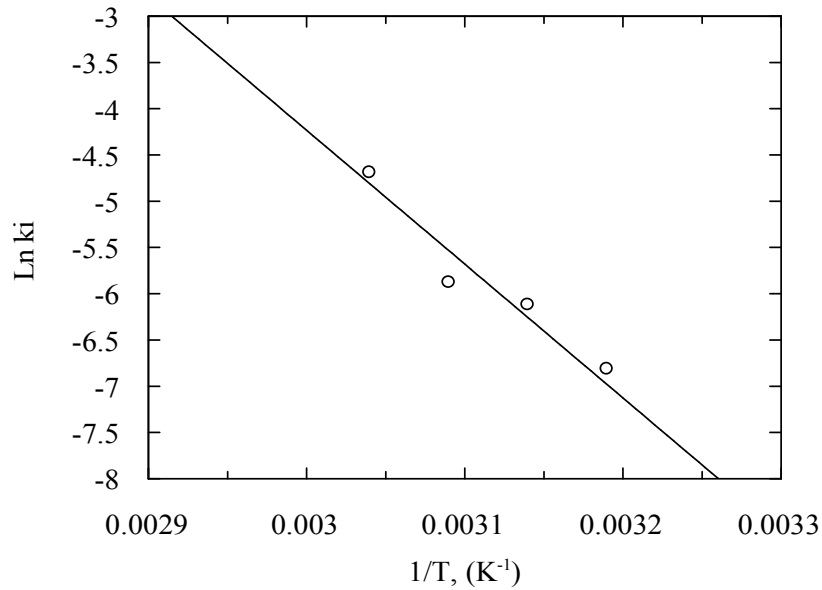
4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında alkalin proteaz enziminin çalışılan sıcaklık değerlerine karşılık gelen inaktivasyon hız sabiti değerleri (k_i) ve bu değerler vasıtasıyla da $t_{1/2} = 0.693 \cdot k_i^{-1}$ bağıntısından yine her bir sıcaklık değerine karşılık gelen yarılanma ömrü değerleri belirlenmiştir. Artan sıcaklık değerlerine karşılık gelen inaktivasyon hız sabiti ve yarılanma ömrü değerleri tablo 4.39’da verilmiştir.

Tablo 4.39: 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında alkalen proteaz enziminin artan sıcaklık değerlerine karşılık gelen tersinmez termal inaktivasyon hız sabiti, (k_i) ve yarılanma ömrü, (t_{1/2}) değerleri

Sıcaklık, (°C)	İnaktivasyon hız sabiti (k _i), (dak ⁻¹)	Yarılanma ömrü (t _{1/2}), (dak)
30	0.0002	3465.00
40	0.0011	630.00
45	0.0022	315.00
50	0.0028	247.5
55	0.0092	75.32
60	0.2629	2.63

4.4.10. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi

4 mM Cu²⁺ iyonları ve kazein substratı varlığında 30-60°C arasındaki sıcaklık değerlerinde belirlenmiş enzime ait inaktivasyon hız sabitlerinin logaritmasının (ln k_i) mutlak sıcaklığın resiprokal değerlerine (1/T, K⁻¹) karşı işaretlenmesiyle Arrhenius grafiği oluşturulmuştur. Grafikteki doğrunun eğiminden 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi değeri hesaplanmıştır. Alkalin proteaz enziminin termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi değerinin hesaplandığı grafik şekil 4.48'de verilmiştir.



Şekil 4.48: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesinde kullanılan Arrhenius grafiği (r = 0.9880'dir)

4 mM Cu²⁺ iyonları ve kazein substratı varlığında enzimin termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi (E_{a,i}) 120.28 kJ/mol (28.74 kcal mol⁻¹) olarak belirlenmiştir.

4.4.11. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında termal inaktivasyonunun termodinamik parametreleri

4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında alkalen proteazın 30-60°C arasındaki sıcaklık değerlerinde geri dönüşümsüz termal inaktivasyonuna ilişkin entalpi (ΔH_i), serbest enerji (ΔG_i) ve entropi (ΔS_i) değerleri sırasıyla (2.13), (2.14) ve (2.15) denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır. 4 mM Cu²⁺ iyonları ve kazein substratı varlığında alkalen proteaz enziminin artan sıcaklık değerlerindeki termal inaktivasyonuna ilişkin termodinamik parametreleri tablo 4.40'da verilmiştir.

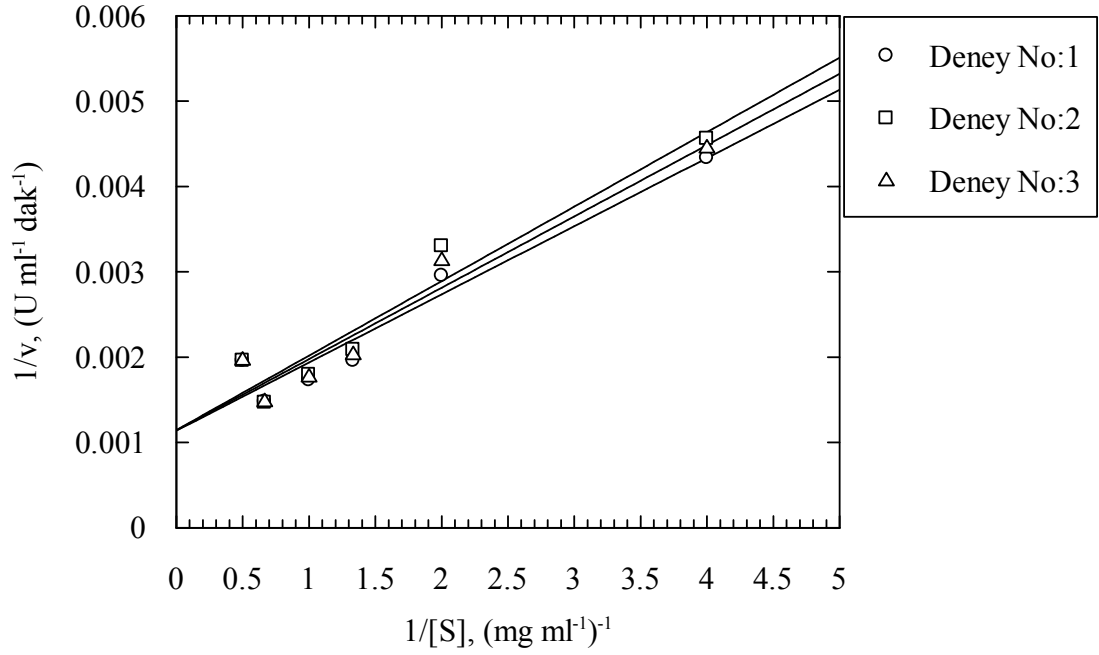
Tablo 4.40: 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonun termodinamik parametreleri

Sıcaklık, (°C)	ΔG_i , (kJ mol ⁻¹)	ΔH_i , (kJ mol ⁻¹)	ΔS_i , (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)
30	106.07	117.76	0.038
40	105.21	117.67	0.039
45	105.10	117.63	0.039
50	105.98	117.59	0.036
55	104.59	117.55	0.039
60	96.94	117.51	0.062

4.4.12. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında artan sıcaklıklardaki kazein hidrolizine ilişkin kinetik parametreleri

4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında alkalen proteaz enziminin 30, 40, 45, 50, 52.5, 55, 57.5, 60, 62.5 ve 65°C sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilen kazein hidrolizinin kinetik parametreleri (K_m, V_m) her bir sıcaklık değeri için Lineweaver-Burk diyagramı oluşturularak belirlenmiş ve sonuçlar sırasıyla şekil 4.49, şekil 4.50, şekil 4.51, şekil 4.52, şekil 4.53, şekil 4.54, şekil 4.55, şekil 4.56, şekil 4.57 ve şekil 4.58'de verilmiştir.

Her sıcaklıkta deneyler en az 3 kez tekrarlanmıştır. Her sıcaklık için yapılan deneyler sonucu belirlenen V_m ve K_m değerlerinin ortalamaları alınmış ve ortalamaların standart sapması hesaplanarak sonuçları sırasıyla tablo 4.41, tablo 4.42, tablo 4.43, tablo 4.44, tablo 4.45, tablo 4.46, tablo 4.47, tablo 4.48, tablo 4.49, ve tablo 4.50’de verilmiştir.



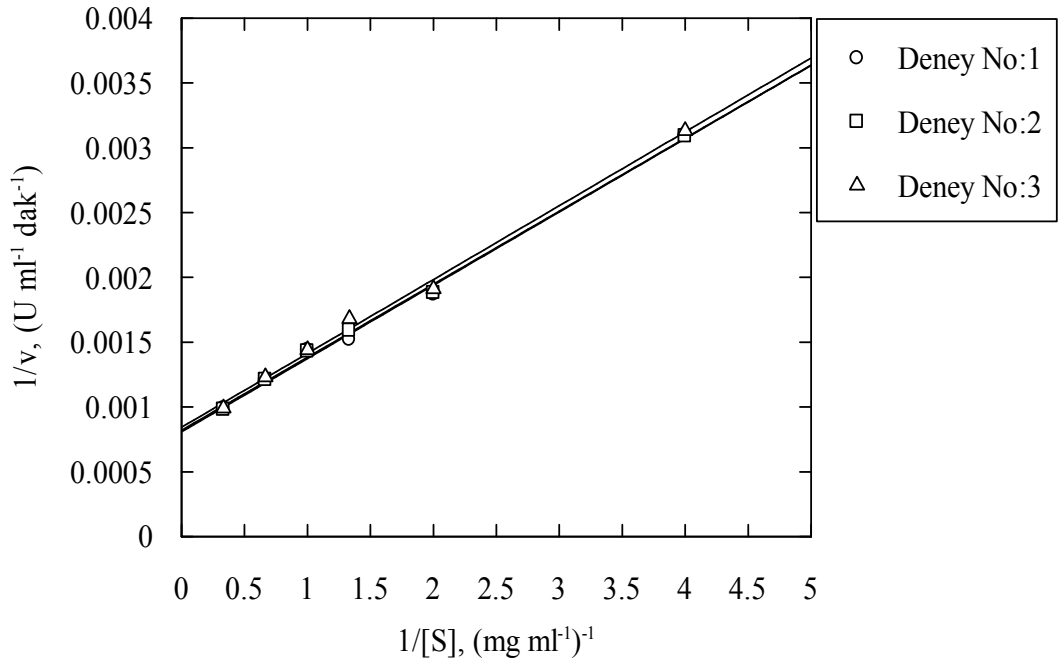
Şekil 4.49: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 30°C’de ve 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9967 ’dir)

Tablo 4.41: Alkalen proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında 30°C ve pH 10.5’da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K_m ve V_m değerleri

Deneý no	V_m , ($\mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$)	K_m , (mg ml^{-1})
1	5.02	0.73
2	5.02	0.82
3	5.02	0.73

$$K_{m,\text{ort}} : 0.76, K_{m,\text{sem}} : 0.03, K_m = 0.76 \pm 0.03 \text{ mg ml}^{-1}$$

$$V_{m,\text{ort}} : 5.02, V_{m,\text{sem}} : 0.00, V_m = 5.02 \pm 0.00 \mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$$



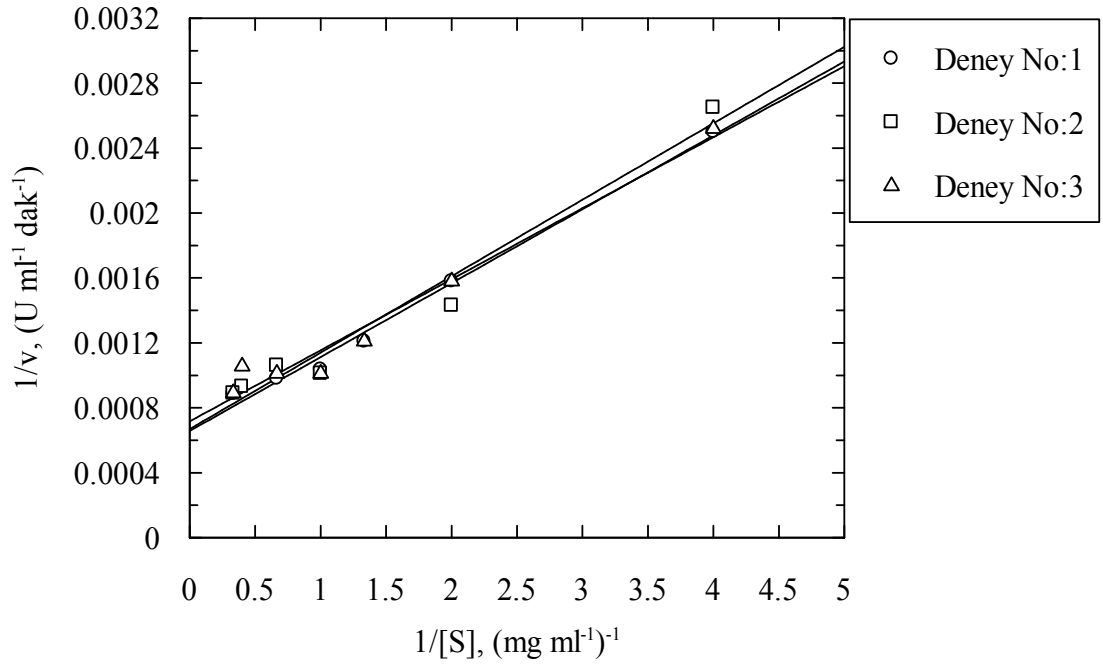
Şekil 4.50: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalin proteaz enzimi tarafından 40°C'de ve 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9976'dır)

Tablo 4.42: Alkalin proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında 40°C ve pH 10.5'da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K_m ve V_m değerleri

Deneý no	V _m , (µmol tirozin ml ⁻¹ dak ⁻¹)	K _m , (mg ml ⁻¹)
1	6.81	0.70
2	6.73	0.69
3	6.57	0.70

K_{m,ort} : 0.70, K_{m,sem} : 0.01 , K_m = 0.69 ± 0.01 mg ml⁻¹

V_{m,ort} : 6.70, V_{m,sem} : 0.12, V_m = 6.70 ± 0.12 µmol tirozin ml⁻¹ dak⁻¹



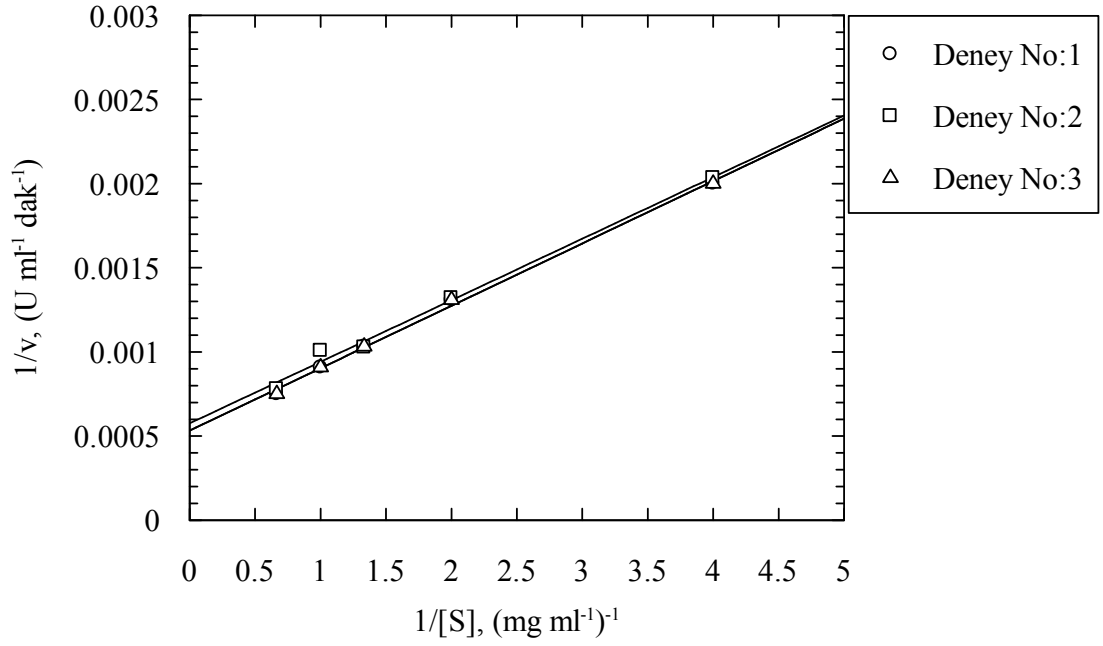
Şekil 4.51: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 45°C'de ve 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9836'dır)

Tablo 4.43: Alkalen proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında 45°C ve pH 10.5'da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K_m ve V_m değerleri

Deneý no	V _m , (µmol tirozin ml ⁻¹ dak ⁻¹)	K _m , (mg ml ⁻¹)
1	8.36	0.69
2	8.23	0.70
3	8.66	0.71

$$K_{m,ort} : 0.70, K_{m,sem} : 0.01, K_m = 0.70 \pm 0.01 \text{ mg ml}^{-1}$$

$$V_{m,ort} : 8.42, V_{m,sem} : 0.22, V_m = 8.42 \pm 0.22 \text{ µmol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$$



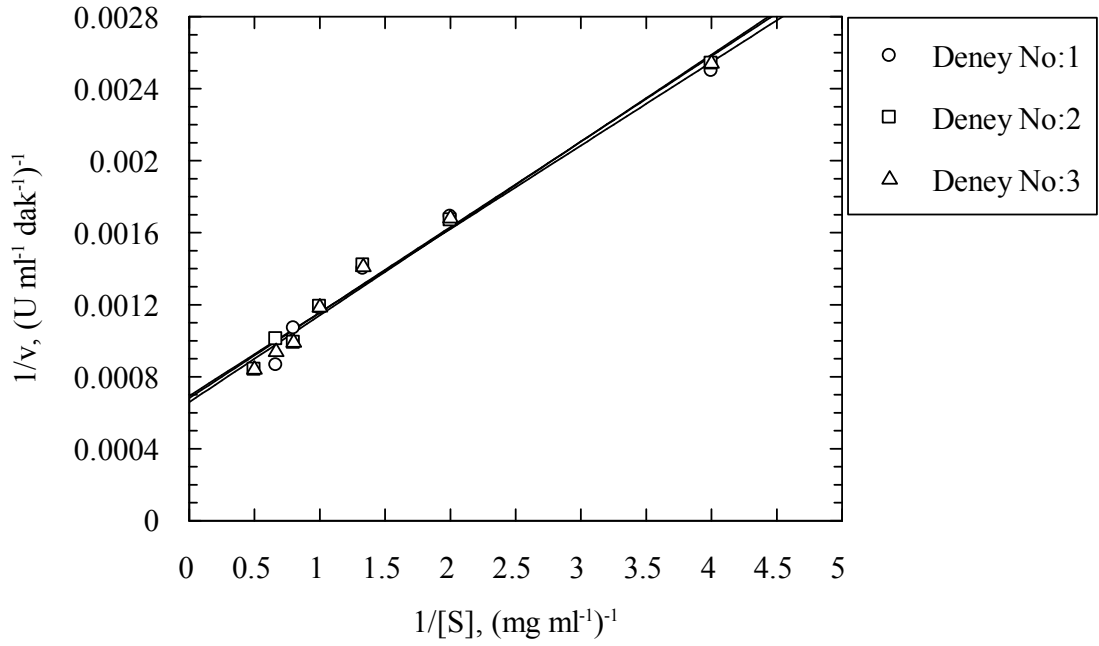
Şekil 4.52: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 50°C'de ve 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9961'dir)

Tablo 4.44: Alkalin proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında 50°C ve pH 10.5'da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K_m ve V_m değerleri

Deneý no	V _m , (µmol tirozin ml ⁻¹ dak ⁻¹)	K _m , (mg ml ⁻¹)
1	11.04	0.80
2	9.20	0.66
3	11.04	0.80

$$K_{m,ort} : 0.75, K_{m,sem} : 0.06, K_m = 0.75 \pm 0.06 \text{ mg ml}^{-1}$$

$$V_{m,ort} : 10.43, V_{m,sem} : 0.61, V_m = 10.43 \pm 0.61 \text{ µmol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$$



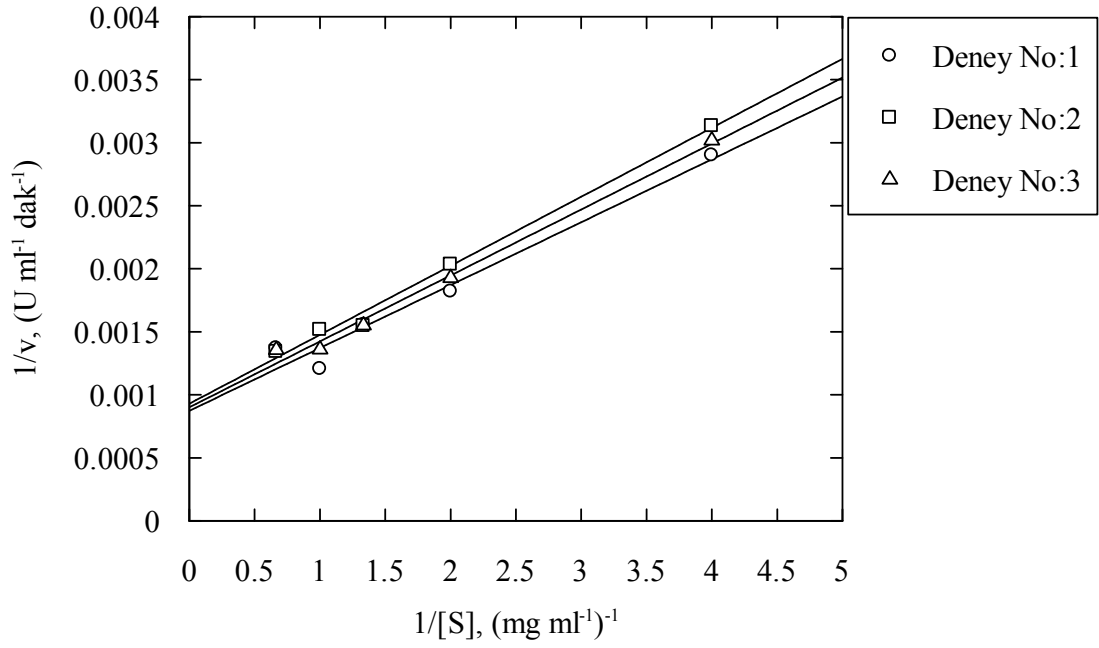
Şekil 4.53: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalin proteaz enzimi tarafından 52.5°C’de ve 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9961’dir)

Tablo 4.45: Alkalin proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında 52.5°C ve pH 10.5’da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K_m ve V_m değerleri

Deneý no	V _m , (µmol tirozin ml ⁻¹ dak ⁻¹)	K _m , (mg ml ⁻¹)
1	7.99	0.66
2	8.11	0.70
3	8.36	0.73

$$K_{m,ort} : 0.70, K_{m,sem} : 0.02, K_m = 0.70 \pm 0.02 \text{ mg ml}^{-1}$$

$$V_{m,ort} : 8.15, V_{m,sem} : 0.11, V_m = 8.15 \pm 0.11 \text{ µmol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$$



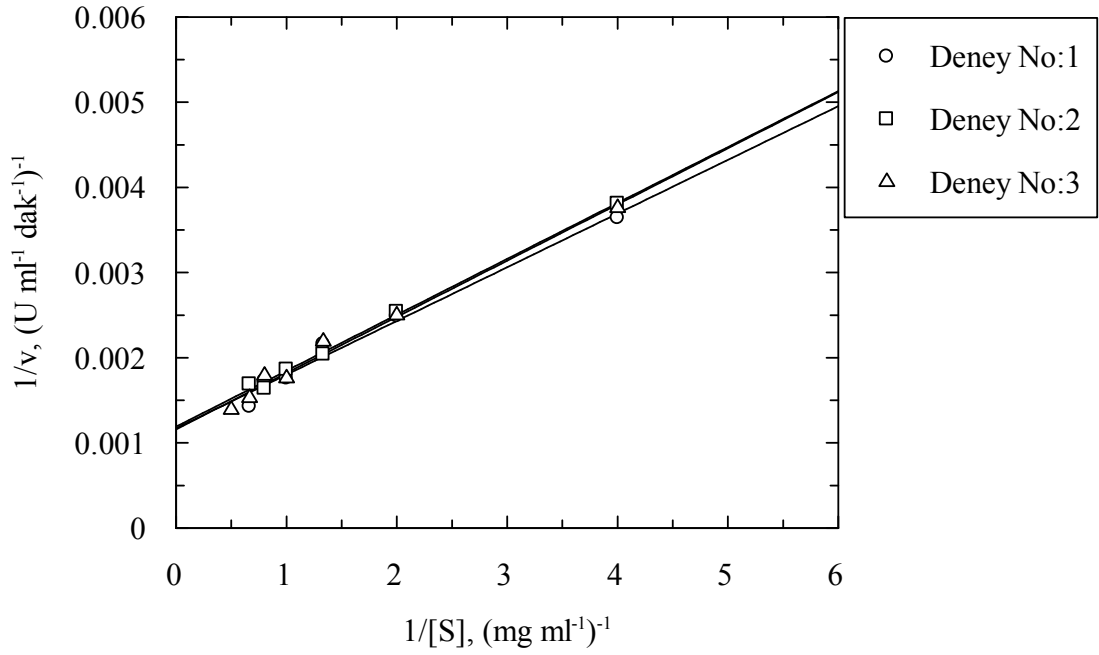
Şekil 4.54: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalin proteaz enzimi tarafından 55°C'de ve 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9952'dir)

Tablo 4.46: Alkalin proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında 55°C ve pH 10.5'da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K_m ve V_m değerleri

Deneý no	V _m , (µmol tirozin ml ⁻¹ dak ⁻¹)	K _m , (mg ml ⁻¹)
1	6.13	0.56
2	6.13	0.56
3	6.13	0.56

K_{m,ort} : 0.56, K_{m,sem} : 0.00, K_m = 0.56 ± 0.00 mg ml⁻¹

V_{m,ort} : 6.13, V_{m,sem} : 0.00, V_m = 26.81 ± 0.00 µmol tirozin ml⁻¹ dak⁻¹



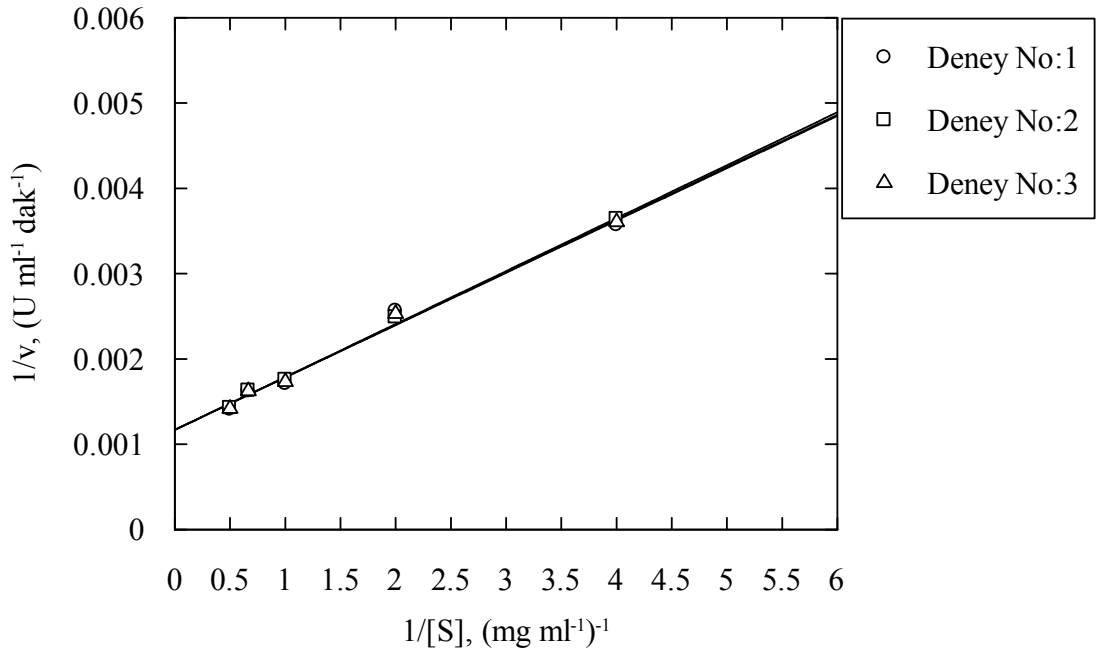
Şekil 4.55: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 57.5°C’de ve 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9952’dir)

Tablo 4.47: Alkalin proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında 57.5°C ve pH 10.5’da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K_m ve V_m değerleri

Deneý no	V _m , (µmol tirozin ml ⁻¹ dak ⁻¹)	K _m , (mg ml ⁻¹)
1	4.71	0.53
2	4.64	0.55
3	4.75	0.56

$$K_{m,ort} : 0.54, K_{m,sem} : 0.01, K_m = 0.54 \pm 0.01 \text{ mg ml}^{-1}$$

$$V_{m,ort} : 4.61, V_{m,sem} : 0.03, V_m = 4.61 \pm 0.03 \text{ µmol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$$



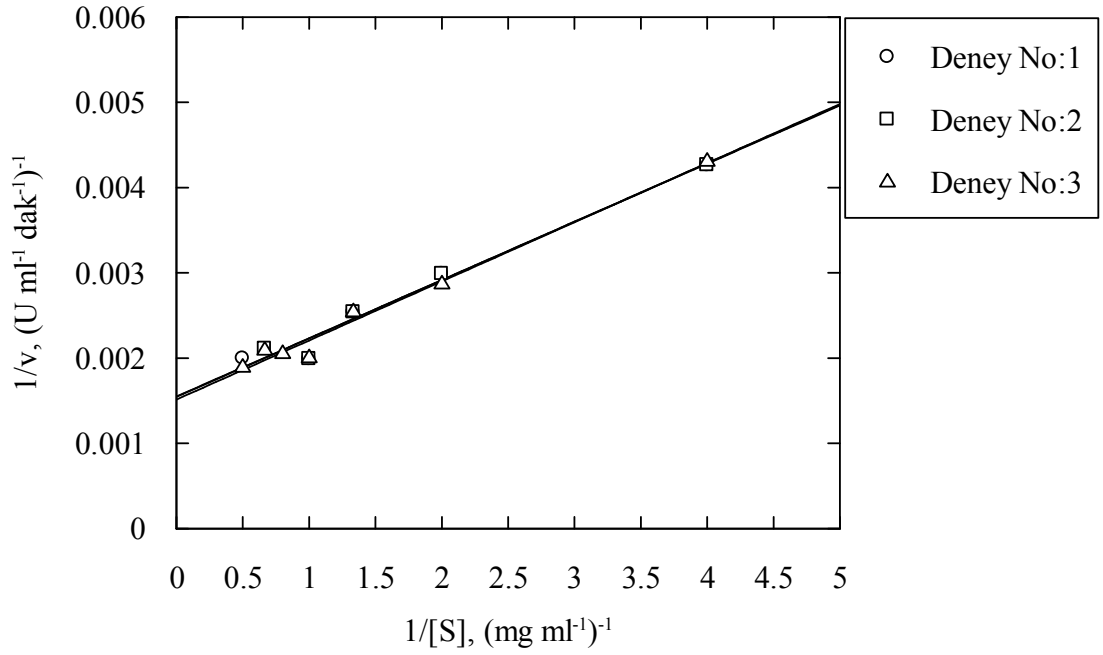
Şekil 4.56: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 60°C’de ve 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9929’dur)

Tablo 4.48: Alkalen proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında 60°C ve pH 10.5’da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K_m ve V_m değerleri

Deneý no	V _m , (µmol tirozin ml ⁻¹ dak ⁻¹)	K _m , (mg ml ⁻¹)
1	4.60	0.50
2	4.60	0.50
3	4.60	0.50

$$K_{m,ort} : 0.50, K_{m,sem} : 0.00, K_m = 0.50 \pm 0.00 \text{ mg ml}^{-1}$$

$$V_{m,ort} : 4.60, V_{m,sem} : 0.00, V_m = 4.60 \pm 0.00 \text{ µmol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$$



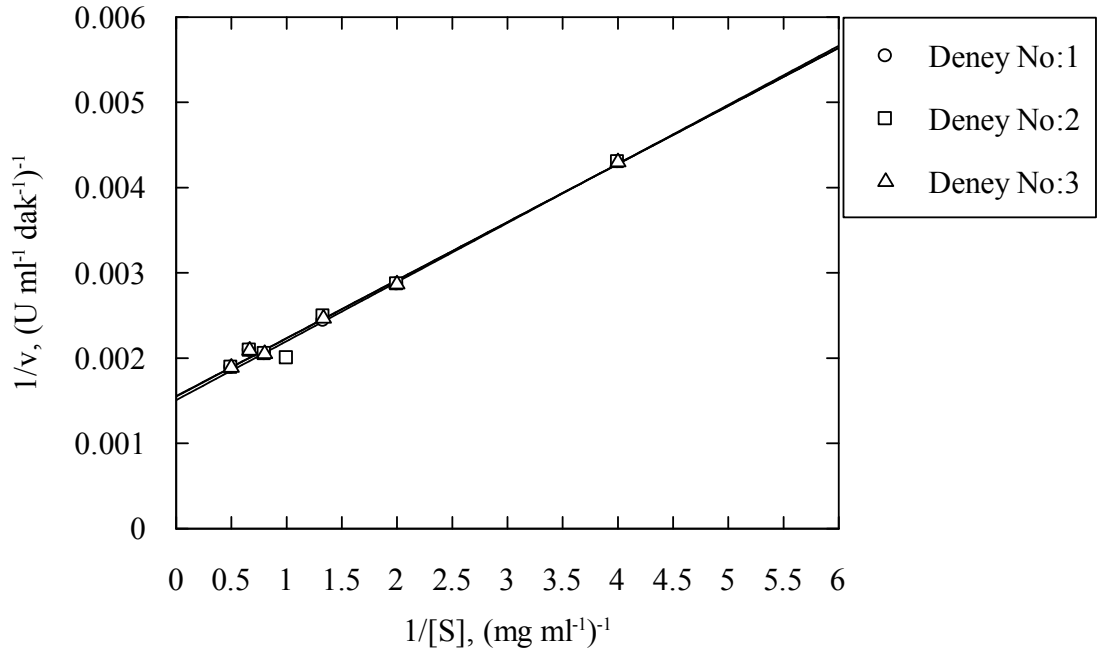
Şekil 4.57: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 62.5°C’de ve 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9883’dür)

Tablo 4.49: Alkalen proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında 62.5°C ve pH 10.5’da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K_m ve V_m değerleri

Deneý no	V _m , (µmol tirozin ml ⁻¹ dak ⁻¹)	K _m , (mg ml ⁻¹)
1	3.56	0.45
2	3.56	0.46
3	3.65	0.47

$$K_{m,ort} : 0.46, K_{m,sem} : 0.006, K_m = 0.46 \pm 0.006 \text{ mg ml}^{-1}$$

$$V_{m,ort} : 3.59, V_{m,sem} : 0.03, V_m = 3.59 \pm 0.03 \text{ µmol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$$



Şekil 4.58: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalin proteaz enzimi tarafından 65°C’de ve 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9883’dür)

Tablo 4.50: Alkalin proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında 65°C ve pH 10.5’da gerçekleştirilen kazein hidrolizinin K_m ve V_m değerleri

Deney no	V _m , (µmol tirozin ml ⁻¹ dak ⁻¹)	K _m , (mg ml ⁻¹)
1	3.56	0.44
2	3.65	0.45
3	3.56	0.46

$$K_{m,ort} : 0.44, K_{m,sem} : 0.006, K_m = 0.44 \pm 0.006 \text{ mg ml}^{-1}$$

$$V_{m,ort} : 3.59, V_{m,sem} : 0.030, V_m = 3.59 \pm 0.030 \text{ µmol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$$

Enzimin her bir sıcaklık değerine ait katalitik hız sabitleri (k_{cat}) 30, 40, 45, 50, 52.5, 55, 57.5, 60, 62.5 ve 65°C için $[E]_t = 0.0039 \text{ µmol/ml}$ alınarak $V_m = k_{cat} \cdot [E]_t$ bağıntısından hesaplanmıştır. Aynı yaklaşımlar katalitik performans değerlerinin (k_{cat}/K_m oranı) belirlenmesinde de uygulanmıştır. Alkalin proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında 30, 40, 45, 50, 52.5, 55, 57.5, 60, 62.5 ve 65°C sıcaklıklara ilişkin belirlenen K_m, V_m, k_{cat} ve k_{cat} / K_m değerlerinin toplu sonuçları tablo 4.51’de verilmiştir.

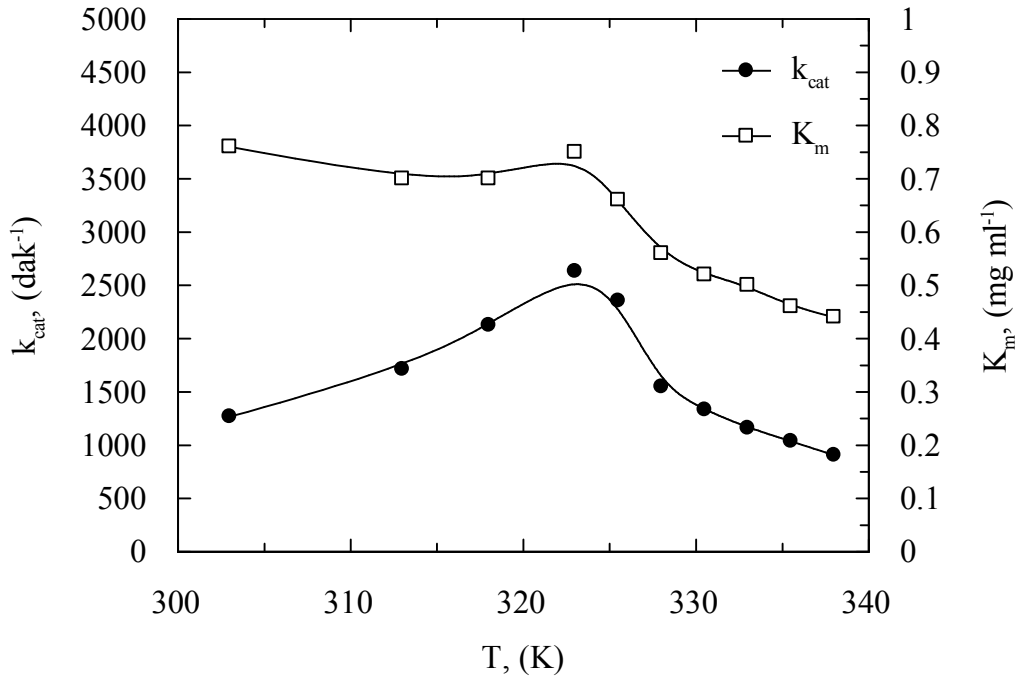
Tablo 4.51: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında farklı sıcaklıklardaki kazein hidrolizi için belirlenmiş kinetik parametreleri

Sıcaklık (°C)	V _m (μmol tirozin ml ⁻¹ dak ⁻¹)	K _m (mg ml ⁻¹)	k _{cat} (dak ⁻¹)	k _{cat} /K _m (dak ⁻¹ /mg ml ⁻¹)
30	5.02	0.76	1267.67	1667.98
40	6.70	0.70	1712.95	2447.07
45	8.42	0.70	2125.42	3036.31
50	10.43	0.75	2632.86	3510.48
52.5	7.99	0.66	2355.49	3364.98
55	6.13	0.56	1547.98	2764.25
57.5	4.74	0.52	1332.36	2467.35
60	4.60	0.50	1161.41	2322.83
62.5	3.59	0.46	1037.57	2255.59
65	3.53	0.44	906.56	2060.37

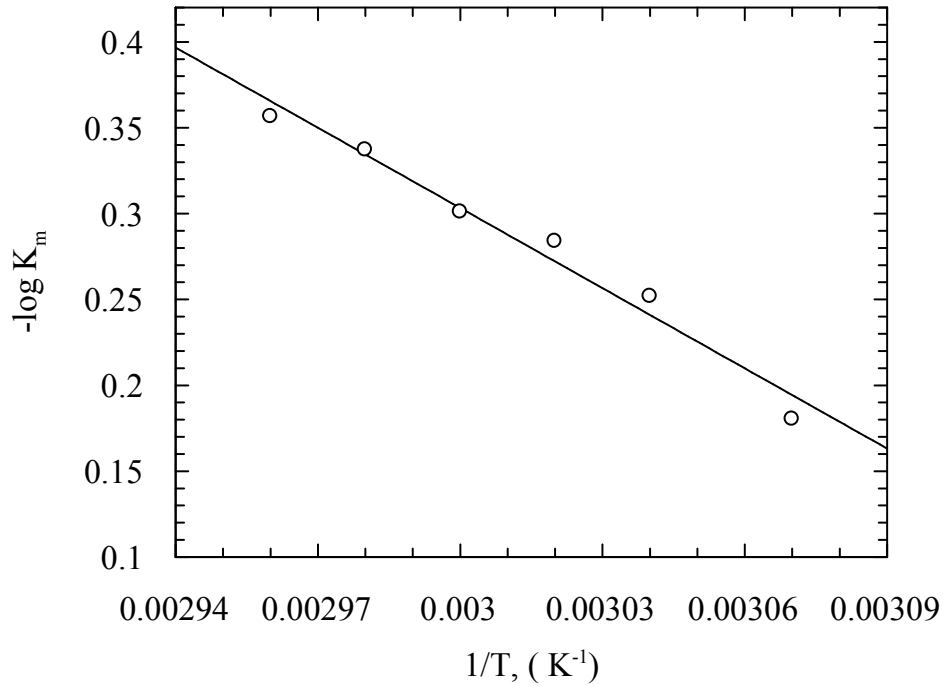
Alkalin proteaz enziminin 30-65°C arasındaki sıcaklık değerlerine karşılık k_{cat} ve K_m kinetik parametrelerinin değişimini gösteren grafik Şekil 4.59'da verilmiştir.

Alkalin proteaz enziminin 50°C'dan sonraki K_m, V_m ve diğer katalitik parametrelerindeki düşüşün değerlendirilebilmesi için bölüm 2.8.7'de açıklandığı üzere 50°C'nin üzerindeki sıcaklık değerlerinde enzimin yatışkın hal kinetiğinden hızlı denge kinetiğine (Hızlı denge sistemlerinde K_m = K_s dir) dönüş yaptığı düşünülmektedir. 50°C'nin üzerindeki her bir sıcaklık değerine karşılık gelen K_m değerlerinin logaritması alınarak log K_m'e karşı 1 / T, (K⁻¹), grafiği çizilmiş elde edilen lineer doğrunun eğiminden de dissosiasyon tepkimesinin entalpi, (ΔH⁰), değeri belirlenmiştir. ΔH⁰, değerinin belirlendiği grafik şekil 4.60'da verilmiştir.

Alkalin proteaz enziminin dissosiasyon tepkimesinin entalpi, (ΔH⁰), değeri -29.81 kJ mol⁻¹ olarak belirlenmiştir.

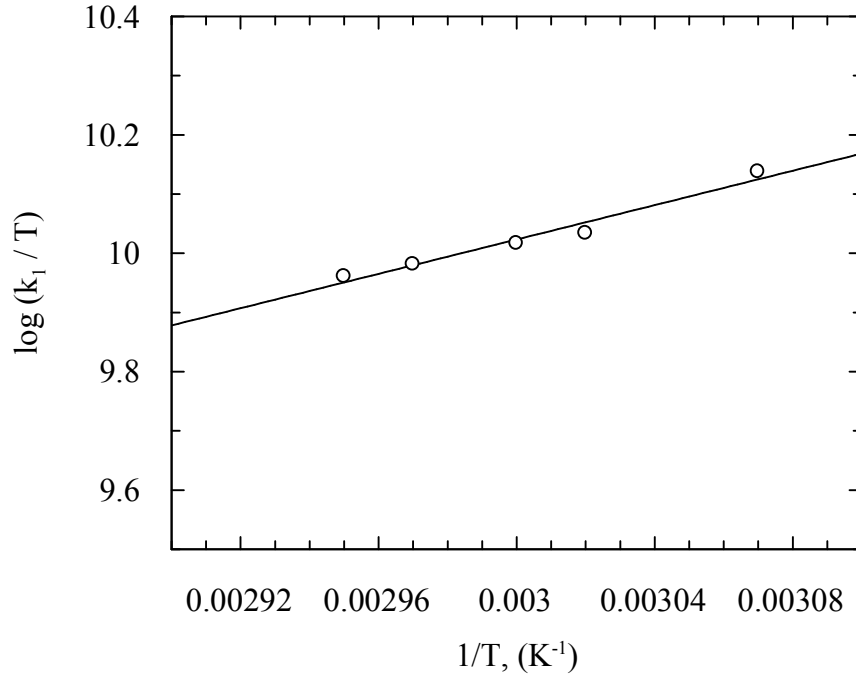


Şekil 4.59: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında farklı sıcaklıklardaki kazein hidrolizi için belirlenmiş kinetik parametrelerinin değişimi



Şekil 4.60: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında 50°C'nin üzerindeki sıcaklıklardaki hızlı denge standart entalpi, (ΔH^0), değişimi değerinin belirlendiği grafik

Enzim ile farklı sıcaklıklarda 2.25 bağıntısı ile hesaplanan $E+S \xrightarrow{k_1} ES$ reaksiyonuna ilişkin k_1 değerleri, $\log(k_1 / T)$ 'ye karşı $1 / T$ grafiğine geçirilmiş ve elde edilen linear doğrunun eğiminden de aktive geçiş hali entalpisi, (ΔH^\ddagger), değeri belirlenmiştir (Şekil 4.61).



Şekil 4.61: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında ΔH^\ddagger değerinin belirlenmesinde kullanılan $\log(k_1 / T)$ 'ye karşı $1 / T$ diyagramı ($r = 0.9826$ 'dır)

Alkalin proteaz enziminin enzim-substrat kompleksi aktive geçiş hali entalpisi, (ΔH^\ddagger), değeri $-22.78 \text{ kJ mol}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Aktive geçiş hali termodinamik parametreleri tablo 4.52'de verilmiştir.

Tablo 4.52: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalin proteaz enziminin 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında farklı sıcaklıklardaki aktive geçiş hali termodinamik parametreleri

Sıcaklık, (°C)	k_1	ΔH^0 , (kJ mol ⁻¹)	ΔH^\ddagger , (kJ mol ⁻¹)	ΔG^0 , (kJ mol ⁻¹)	ΔG^\ddagger , (kJ mol ⁻¹)	ΔS^0 , (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔS^\ddagger , (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)
52.5	4.47×10^{12}	-29.81	-22.78	1.12	1.12	-0.095	-3.53
55	3.28×10^{12}	-29.81	-22.78	1.58	1.99	-0.096	-6.16
57.5	3.58×10^{12}	-29.81	-22.78	1.80	1.79	-0.096	-5.51
60	3.47×10^{12}	-29.81	-22.78	1.92	1.92	-0.095	-5.83
62.5	3.21×10^{12}	-29.81	-22.78	2.18	2.17	-0.095	-6.53
65	3.10×10^{12}	-29.81	-22.78	2.31	2.31	-0.095	-6.90

4.4.13. *Bacillus marmariensis* GMBE 72'den saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında artan sıcaklık değerlerindeki kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametreleri

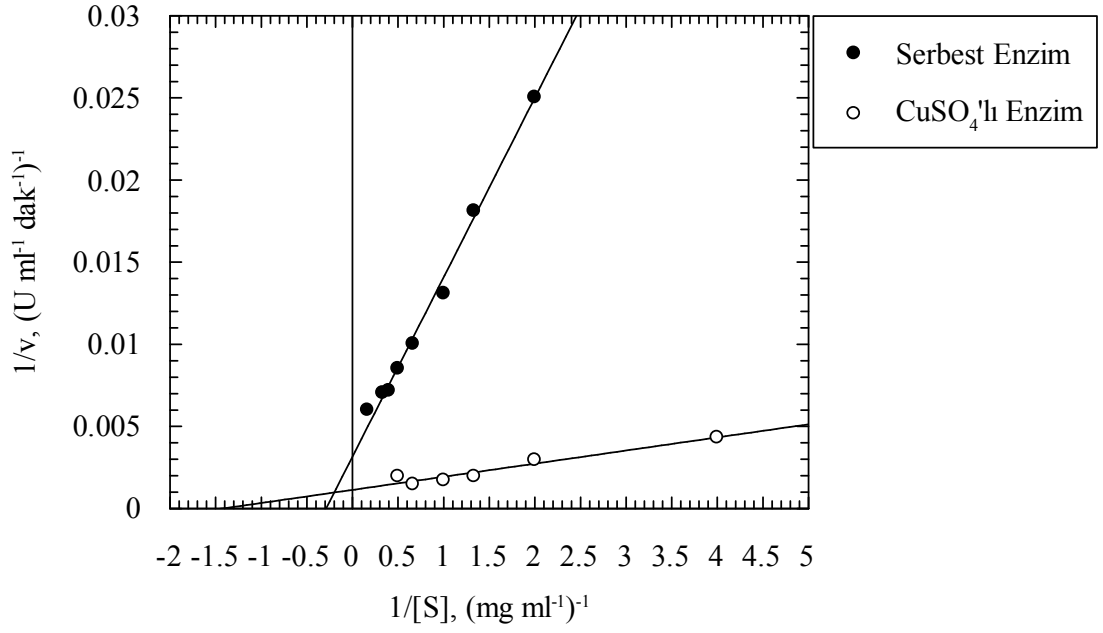
4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında alkalen proteazın 30-65°C arasındaki sıcaklık değerlerindeki kazein hidrolizine ilişkin artan sıcaklıklardaki aktivasyon serbest enerjisi (ΔG^\ddagger), aktivasyon entalpisi (ΔH^\ddagger), aktivasyon entropisi (ΔS^\ddagger), kazein bağlanması için geçiş hali serbest enerjisi (ΔG_{E-T}^\ddagger) ve kazein bağlanma serbest enerjisi (ΔG_{E-S}) sırasıyla (2.16), (2.17), (2.18), (2.19), (2.20) nolu denklemler kullanılarak hesaplanmıştır. 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında alkalen proteaz enzimi tarafından artan sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilen kazein hidrolizine ilişkin elde edilen termodinamik parametreler tablo 4.53'de verilmiştir.

Tablo 4.53: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi tarafından 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen kazein hidrolizinin termodinamik parametreleri

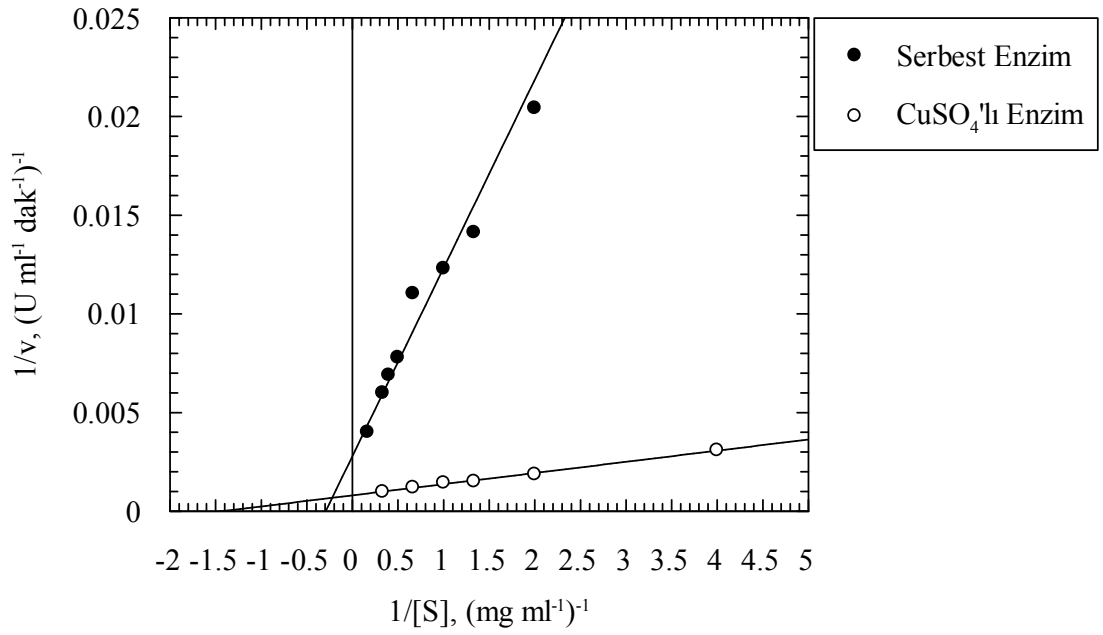
Sıcaklık (°C)	ΔG^\ddagger (kJ mol ⁻¹)	ΔH^\ddagger (kJ mol ⁻¹)	ΔS^\ddagger (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG_{E-T}^\ddagger (kJ mol ⁻¹)	ΔG_{E-S} (kJ mol ⁻¹)
30	66.60	47.63	-0.062	18.80	-0.79
40	68.05	47.55	-0.065	20.17	-0.75
45	68.82	47.51	-0.067	20.96	-0.87
50	69.20	47.46	-0.067	22.11	-0.96
52.5	70.05	47.44	-0.069	21.98	-1.12
55	71.76	47.42	-0.074	21.67	-1.63
57.5	72.73	47.40	-0.076	21.47	-1.80
60	73.69	47.38	-0.079	21.46	-1.92
62.5	74.57	47.36	-0.081	21.54	-2.16
65	75.53	47.34	-0.083	21.45	-2.30

4.5. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 Soyundan Saflaştırılan Alkalin Proteaz Enziminin 4 mM Cu²⁺ İyonları Tarafından Aktivasyonuna İlişkin Kinetik Parametreler

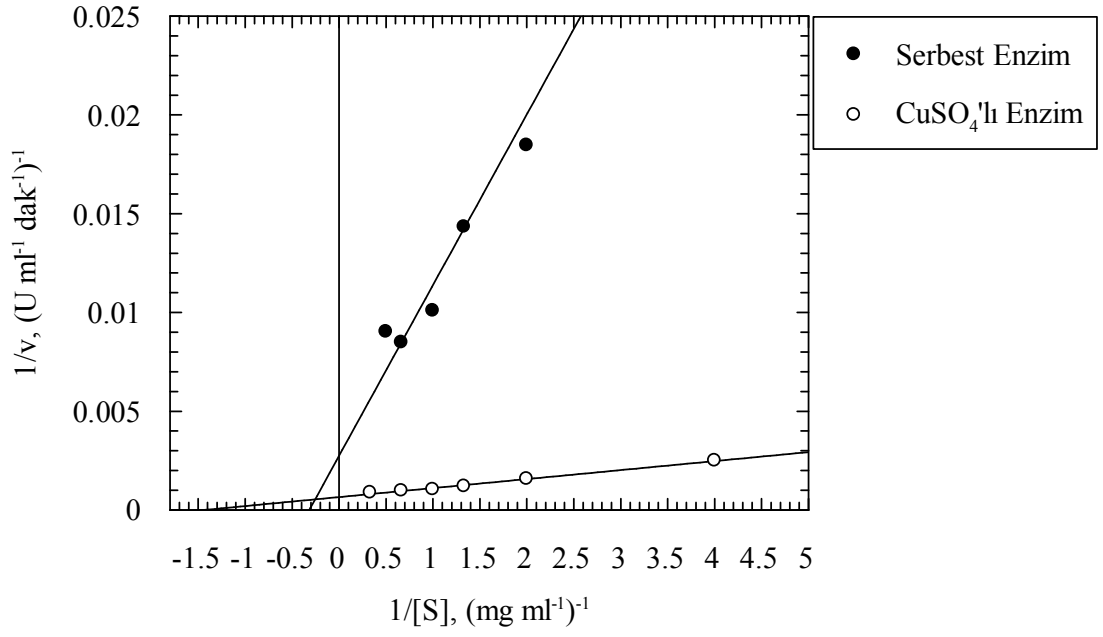
Alkalin proteazın 4 mM Cu²⁺ iyonlarının varlığında ve yokluğunda 30, 40, 45, 50, 55, 60, 62.5 ve 65°C'lik sıcaklıklarda oluşturulan ve görünen K_m ve V_m değerlerinin belirlendiği Lineweaver-Burk diyagramları sırasıyla şekil 4.62, şekil 4.63, şekil 4.64, şekil 4.65, şekil 4.66, şekil 4.67, şekil 4.68 ve 4.69'da verilmiştir.



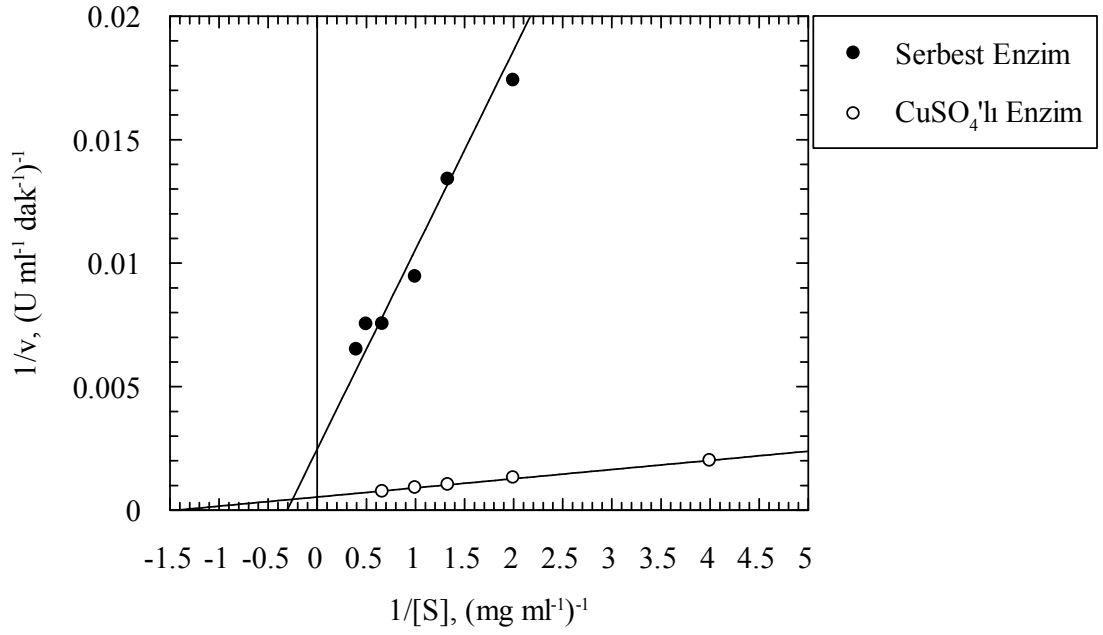
Şekil 4.62: 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteaz enziminin 30°C'deki Lineweaver-Burk diyagramı



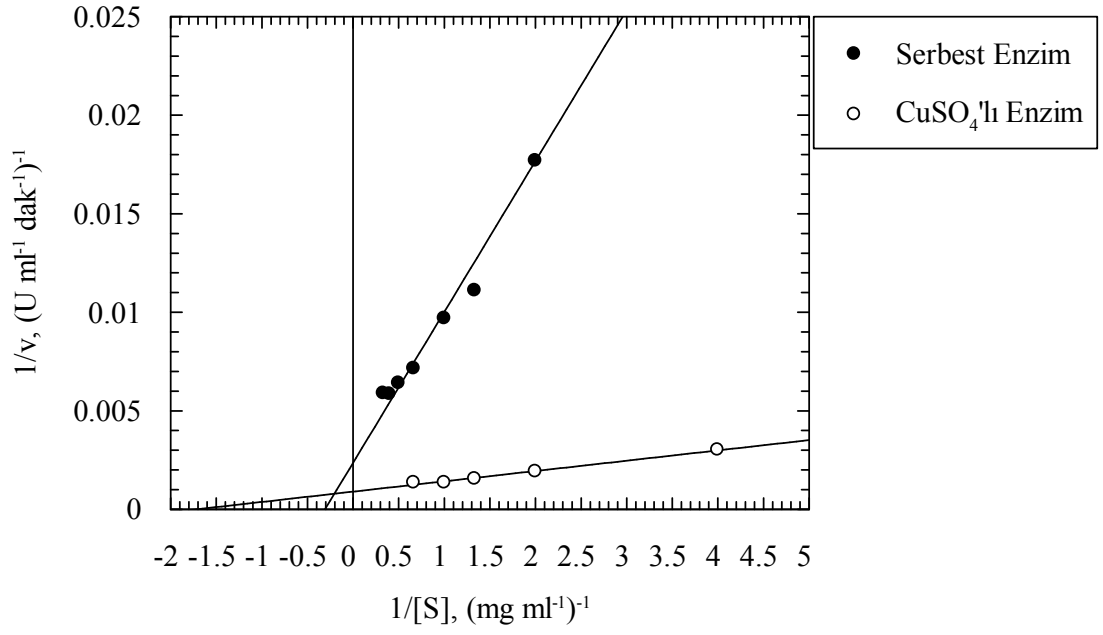
Şekil 4.63: 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteaz enziminin 40°C'deki Lineweaver-Burk diyagramı



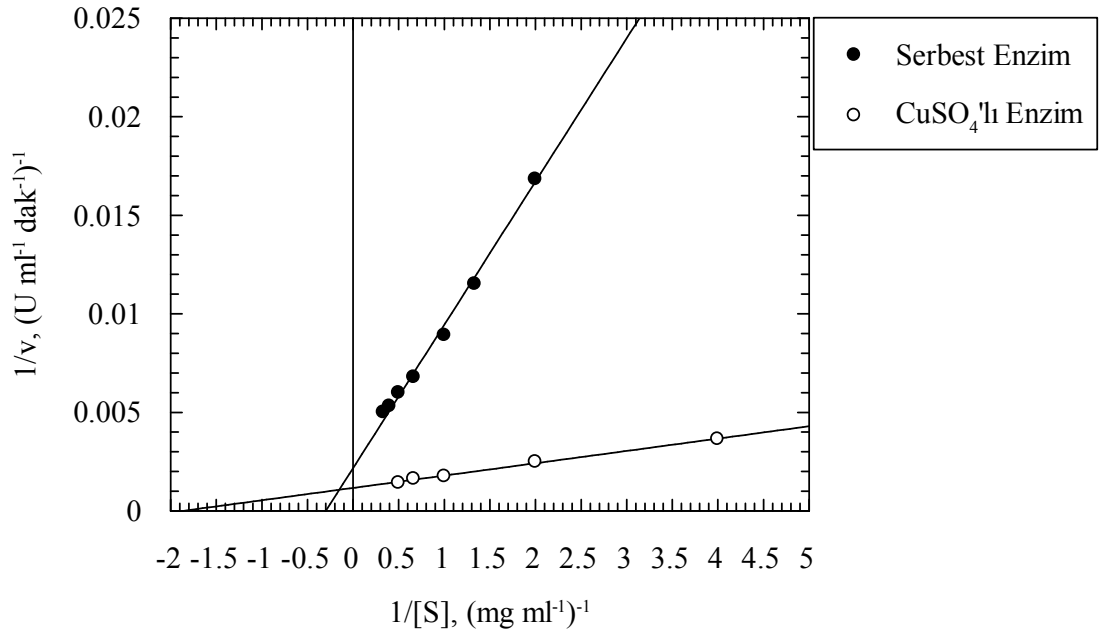
Şekil 4.64: 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteaz enziminin 45°C'deki Lineweaver-Burk diyagramı



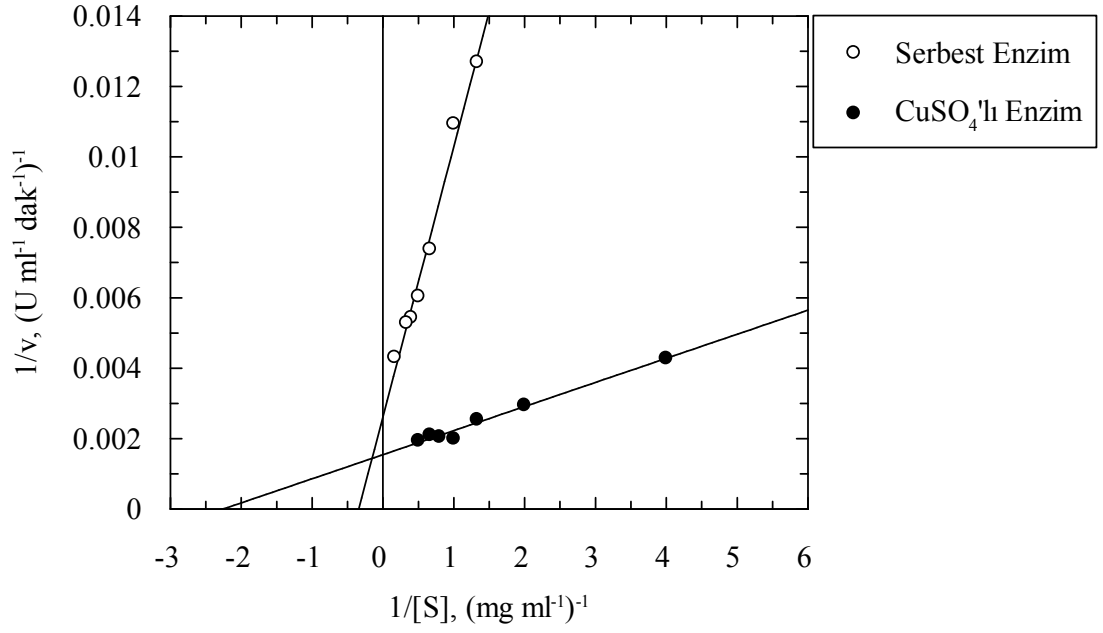
Şekil 4.65: 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteaz enziminin 50°C'deki Lineweaver-Burk diyagramı



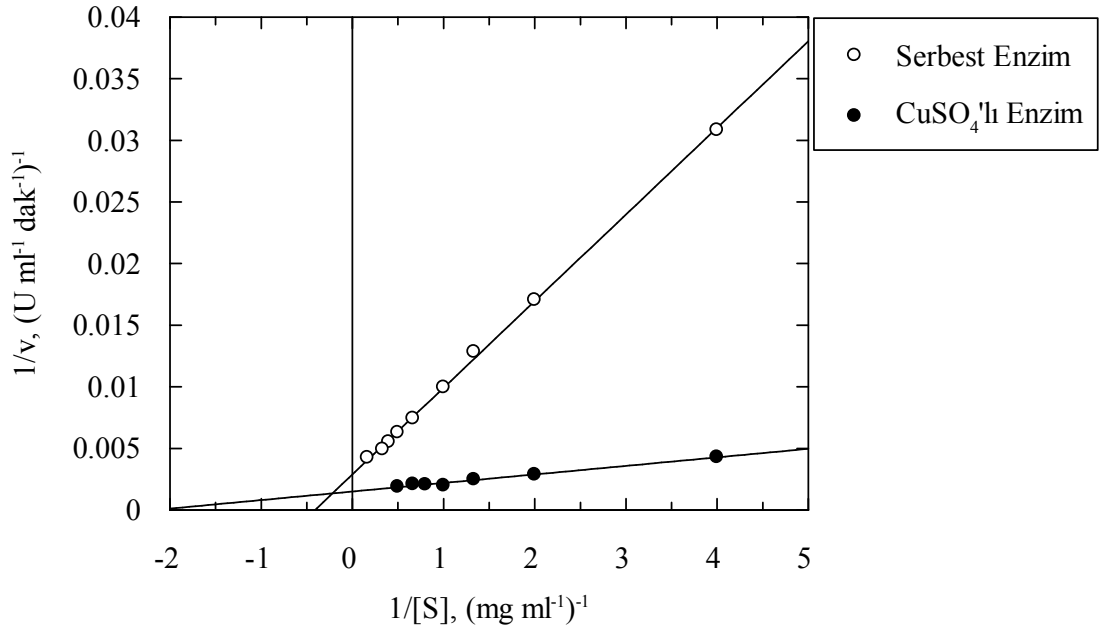
Şekil 4.66: 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkalin proteaz enziminin 55°C'deki Lineweaver-Burk diyagramı



Şekil 4.67: 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkalin proteaz enziminin 60°C'deki Lineweaver-Burk diyagramı



Şekil 4.68: 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteaz enziminin 62.5°C'deki Lineweaver-Burk diyagramı

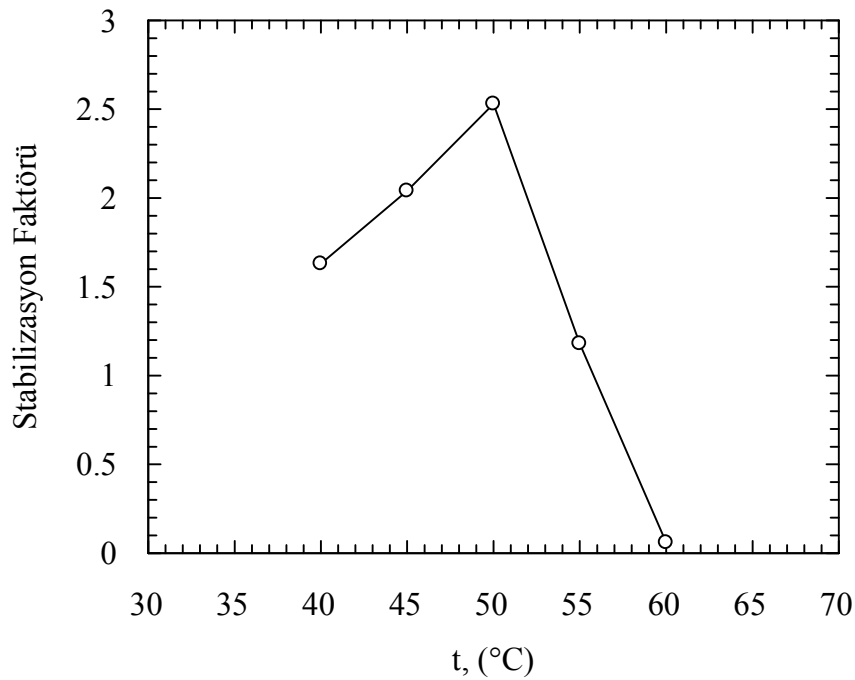


Şekil 4.69: 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteaz enziminin 65°C'deki Lineweaver-Burk diyagramı

Aktivasyon kinetiği söz konusu olduğunda 30, 40, 45, 50, 55, 60, 62.5 ve 65°C sıcaklık değerlerine ait aktivasyon doğrusundan görünen V_m değerleri ve $[E]_t = 0.0039 \mu\text{mol/ml}$ toplam enzim konsantrasyonu dikkate alınarak da görünen k_{cat} değerleri hesaplanmıştır.

4.6. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 Soyundan Saflaştırılan Alkalen Proteaz Enzimi Üzerine 4 mM Cu²⁺ İyonlarının Stabilizasyon Etkisi

Artan sıcaklık değerlerine karşılık 4 mM Cu²⁺ iyonları tarafından alkalen proteaz enzimi üzerinde gerçekleştirilen stabilizasyon etkisinin gösterildiği grafik şekil 4.70'de her bir sıcaklık değerine karşılık gelen yarı ömür ve $SF = [t_{1/2}]_{Cu^{2+}-AP} : [t_{1/2}]_{AP}$ bağıntısından hesaplanan stabilizasyon faktörü (SF) değerleri ise tablo 4.54'de verilmiştir.



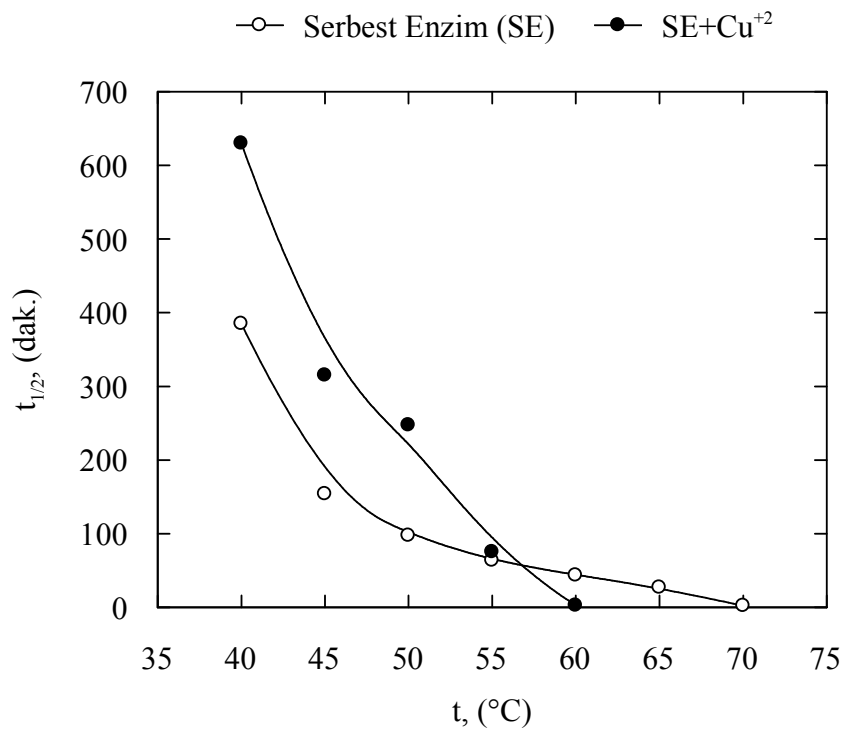
Şekil 4.70: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi üzerinde 4 mM Cu²⁺ iyonları tarafından gerçekleştirilen stabilizasyon etkisi

Tablo 4.54: 4 mM Cu²⁺ metal iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteaz enziminin farklı sıcaklık değerlerine karşılık gelen yarı ömür ($t_{1/2}$) ve stabilizasyon faktörü değerleri

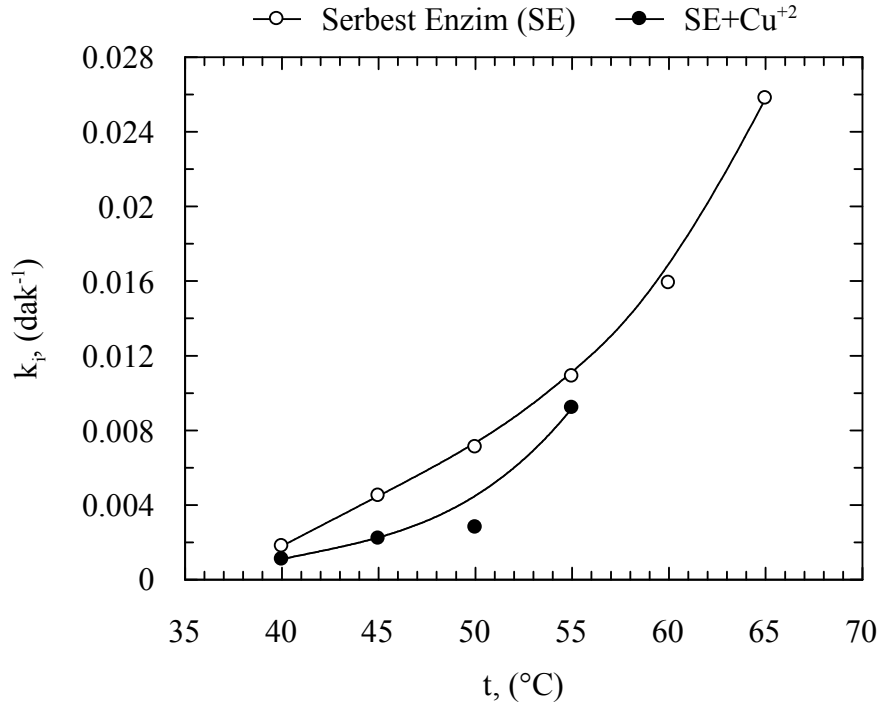
Sıcaklık, (°C)	$t_{1/2}$, (dak)		Stabilizasyon Faktörü (SF)
	Serbest Enzim (SE)	SE + 4 mM Cu ²⁺	
30	2310.00	3465.00	1.50
40	385.00	630.00	1.63
45	154.00	315.00	2.04
50	97.60	247.50	2.53
55	63.57	75.30	1.18
60	43.58	2.60	0.06

4 mM Cu^{2+} metal iyonları 50°C sıcaklık değerine kadar artan sıcaklıkla beraber enzim üzerinde artan bir stabilizasyon etkisi göstermekle birlikte bu sıcaklık değerinin üzerindeki 55 ve 60°C 'da 4 mM Cu^{2+} iyonlarının enzim üzerindeki stabilizasyon etkisi azalmaktadır (Tablo 4.54).

4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda sıcaklığa karşılık yarılanma ömrü ve inaktivasyon hız sabiti değerlerinin gösterildiği grafik sırasıyla şekil 4.71 ve şekil 4.72'de verilmiştir.



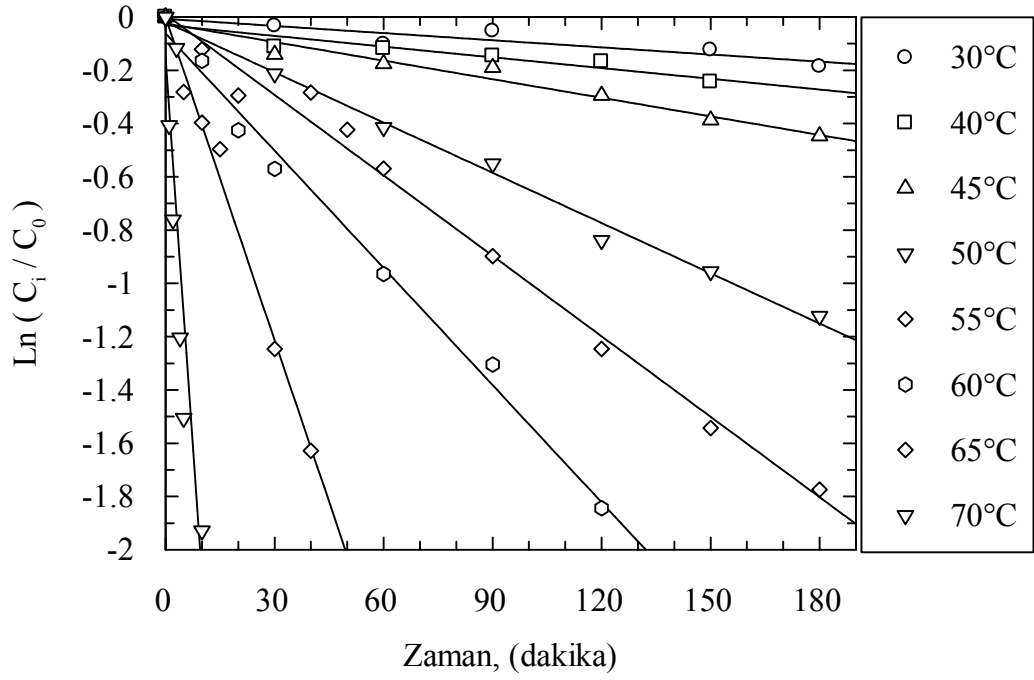
Şekil 4.71: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda artan sıcaklık değerlerine karşılık gelen yarılanma ömrü değerleri



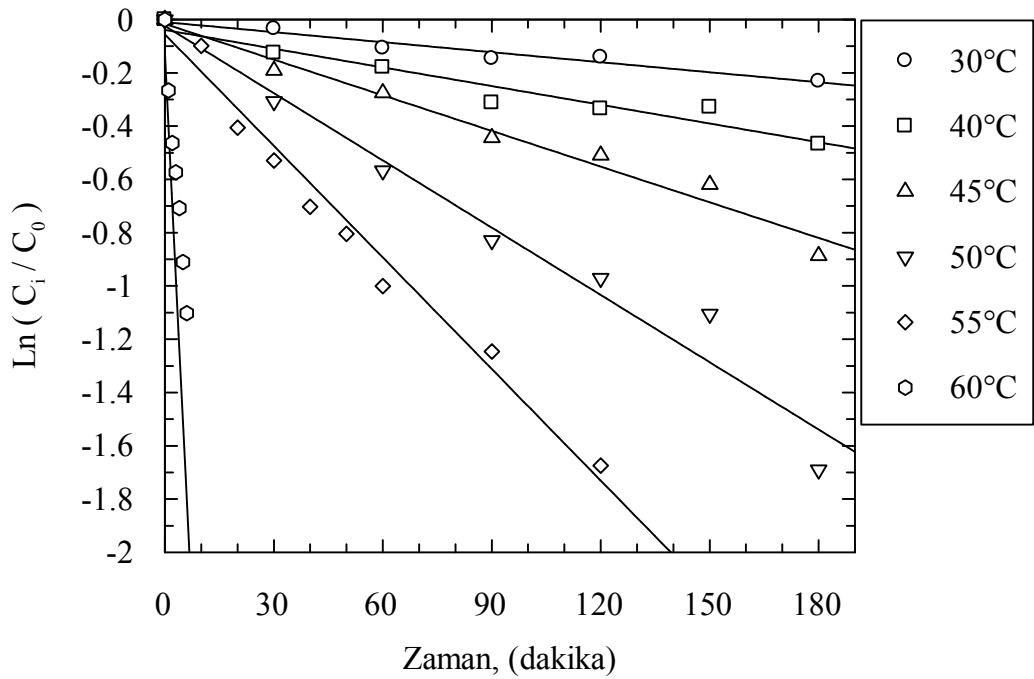
Şekil 4.72: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda artan sıcaklık değerlerine karşılık gelen inaktivasyon hız sabiti değerleri

4.7. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 Soyundan Saflaştırılan Alkalin Proteaz Enziminin Otokatalitik Hidrolizi (Otokatalitik İnaktivasyonu ya da Otoproteolizi) Üzerine 4 Mm Cu²⁺ İyonları İlavesinin Etkisi

Alkalin proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları yokluğunda 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70°C'de 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında 30, 40, 45, 50, 55 ve 60°C'de kendi kendini hidrolizmesi enzim çözeltisinin protein konsantrasyonundaki azalma ile bölüm 3.1.6'da açıklanan yöntemle izlenmiştir. Her bir sıcaklıktaki otokatalitik hidroliz kinetiğine ilişkin grafikler serbest enzim ve 4 mM Cu²⁺ metal iyonlarını bulunduran enzim için sırasıyla şekil 4.73 ve 4.74'de verilmiştir. Grafiklerdeki doğruların eğiminden 4 mM Cu²⁺ iyonları yokluğunda ve varlığında alkalin proteaz enziminin çalışılan sıcaklık değerlerine karşılık gelen otokatalitik hidrolizinin hız sabiti değerleri (k_i) ve bu değerler vasıtasıyla da $t_{1/2} = 0.693 \cdot k_i^{-1}$ bağıntısından her bir sıcaklık değerine karşılık gelen yarılanma ömrü değerleri hesaplanmıştır. Artan sıcaklık değerlerine karşılık gelen inaktivasyon hız sabiti ve yarılanma ömrü değerleri tablo 4.55'de verilmiştir.



Şekil 4.73: *Bacillus marmariensis* GMBE 72'den saflaştırılan alkalin proteaz enziminin artan sıcaklıklardaki otokatalitik hidrolizi (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9887 'dir)



Şekil 4.74: *Bacillus marmariensis* GMBE 72'den saflaştırılan alkalin proteaz enziminin 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında artan sıcaklıklardaki otokatalitik hidrolizi (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9824 'dür)

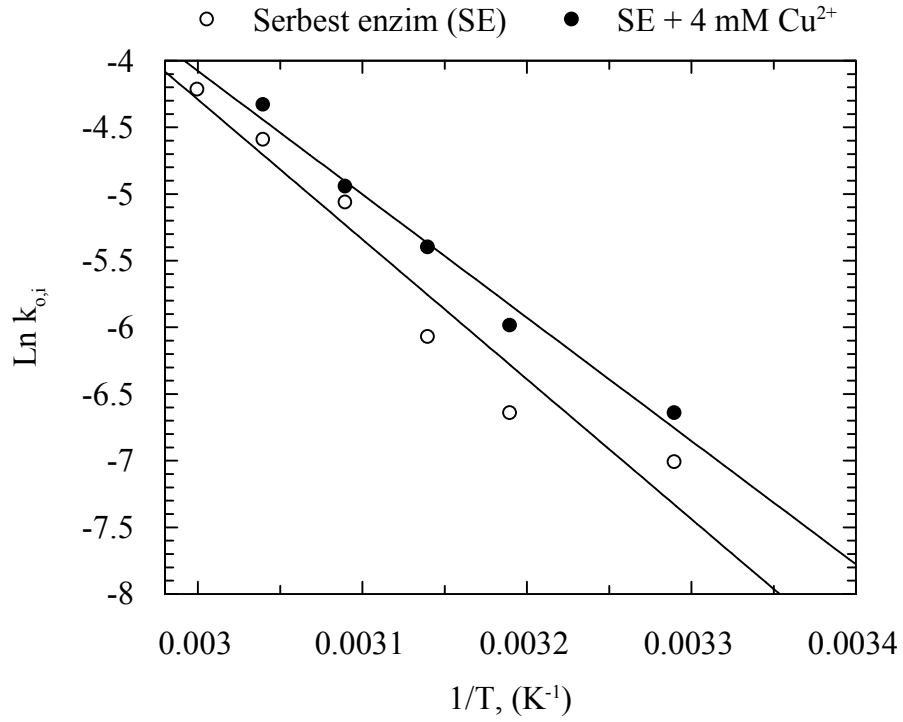
Tablo 4.55: 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteaz enziminin artan sıcaklık değerleri için otokatalitik hidrolizinin hız sabiti (k_i) ve yarılanma ömür (t_{1/2}) değerleri (SE:Serbest enzim)

Sıcaklık, (°C)	k _i , (dak ⁻¹)		t _{1/2} , (dak)	
	SE	SE + 4 mM Cu ²⁺	SE	SE + 4 mM Cu ²⁺
30	0.0009	0.0018	770.00	385.00
40	0.0013	0.0023	533.08	301.30
45	0.0023	0.0033	301.30	210.00
50	0.0062	0.0084	111.77	82.50
55	0.0101	0.0312	68.61	22.21
60	0.0147	0.2794	47.14	2.48
65	0.0404	-	17.15	-
70	0.1941	-	2.57	-

4.8. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 Soyundan Saflaştırılan Alkalin Proteaz Enziminin 4 mM Cu²⁺ İyonları Yokluğunda ve Varlığında Artan Sıcaklıklarda Otokatalitik İnaktivasyonunun (Otoproteolizinin) Arrhenius Aktivasyon Enerjisi

4 mM Cu²⁺ iyonları yokluğunda 30-70°C, 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında 30-60°C arasındaki sıcaklık değerlerinde belirlenmiş enzime ait otokatalitik hidrolizinin termal inaktivasyonunun hız sabitlerinin logaritmasının (ln k_{o,i}) mutlak sıcaklığın resiprokal değerlerine (1/T, K⁻¹) karşı işaretlenmesiyle Arrhenius grafiği oluşturulmuştur. Grafikteki doğrunun eğiminden 4 mM Cu²⁺ iyonları yokluğunda ve varlığında alkalin proteaz enziminin otokatalitik hidrolizinin termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi değeri hesaplanmıştır. Alkalin proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları yokluğunda ve varlığında otokatalitik hidrolizinin termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi değerinin hesaplandığı grafik şekil 4.75’de verilmiştir.

4 mM Cu²⁺ iyonları yokluğunda ve varlığında enzimin otokatalitik hidrolizinin termal inaktivasyonunun aktivasyon enerjisi (E_{a,i}) sırasıyla 87.21 kJ mol⁻¹ ve 76.90 kJ mol⁻¹ olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.75: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalin proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları yokluğunda ve varlığında otokatalitik hidrolizinin termal inaktivasyonunun aktivasyon enerjisinin belirlenmesinde kullanılan Arrhenius grafiği (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9805 'dir)

4.9. *Bacillus marmariensis* GMBE 72'den Saflaştırılan Serbest Alkalin Proteaz Enziminin 4 mM Cu²⁺ İyonları Yokluğunda ve Varlığında Artan Sıcaklıklarda Otokatalitik İnaktivasyonunun Termodinamik Parametreleri

4 mM Cu²⁺ iyonları yokluğunda 30-70°C, 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında 30-60°C arasındaki sıcaklık değerlerinde otokatalitik hidrolizinin termal inaktivasyonuna ilişkin entalpi (ΔH_i), serbest enerji (ΔG_i) ve entropi (ΔS_i) değerleri sırasıyla (2.13), (2.14) ve (2.15) denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır. 4 mM Cu²⁺ iyonları yokluğunda ve varlığında alkalin proteaz enziminin artan sıcaklık değerlerindeki otokatalitik hidrolizinin termal inaktivasyonuna ilişkin termodinamik parametreleri tablo 4.56 ve tablo 4.57'de verilmiştir.

Tablo 4.56: Alkalen proteaz enziminin otokatalitik hidrolizinin termal inaktivasyonunun termodinamik parametreleri

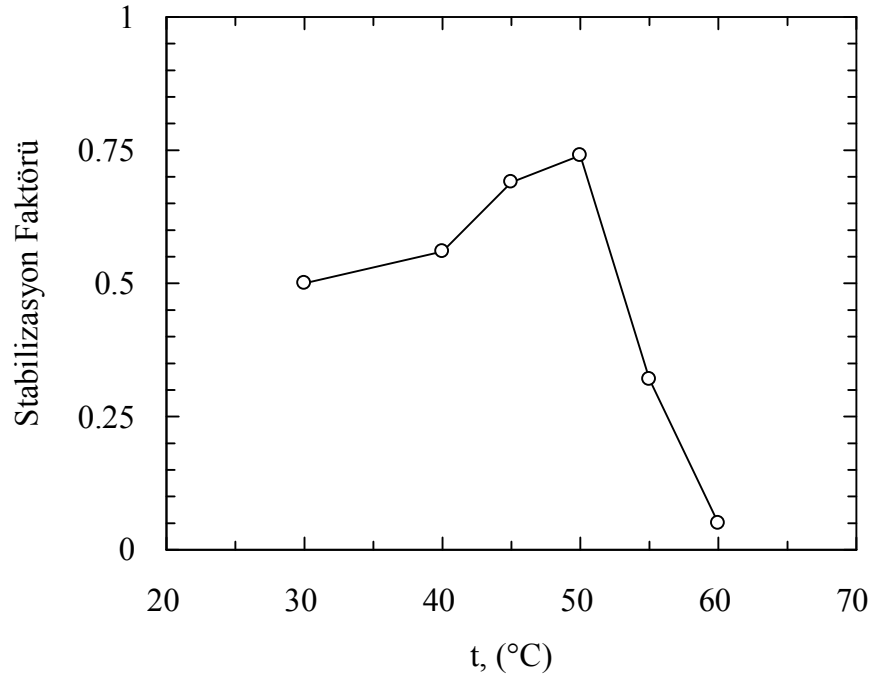
Sıcaklık, (°C)	ΔG_i , (kJ mol ⁻¹)	ΔH_i , (kJ mol ⁻¹)	ΔS_i , (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)
30	102.28	84.69	-0.058
40	104.78	84.61	-0.064
45	104.98	84.56	-0.064
50	104.01	84.52	-0.060
55	104.33	84.48	-0.060
60	104.92	84.44	-0.061
65	103.70	84.39	-0.057
70	100.79	84.35	-0.047

Tablo 4.57: 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında alkalen proteaz enziminin otokatalitik hidrolizinin termal inaktivasyonunun termodinamik parametreleri

Sıcaklık, (°C)	ΔG_i , (kJ mol ⁻¹)	ΔH_i , (kJ mol ⁻¹)	ΔS_i , (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)
30	100.531	74.379	-0.086
40	103.294	74.296	-0.092
45	104.030	74.254	-0.093
50	103.197	74.213	-0.089
55	101.256	74.171	-0.082
60	96.768	74.130	-0.067

4.10. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 Soyundan Saflaştırılan Alkalen Proteaz Enziminin Otokatalitik Hidrolizi Üzerine 4 mM Cu²⁺ İyonlarının Stabilizasyon Etkisi

Artan sıcaklık değerlerine karşılık 4 mM Cu²⁺ iyonları tarafından alkalen proteaz enziminin otokatalitik hidrolizi üzerindeki stabilizasyon etkisinin gösterildiği grafik şekil 4.76'da her bir sıcaklık değerine karşılık gelen yarı ömür ve $SF = [t_{1/2}]_{Cu^{2+}-AP} : [t_{1/2}]_{AP}$ bağıntısından hesaplanan stabilizasyon faktörü (SF) değerleri ise tablo 4.58'de verilmiştir.



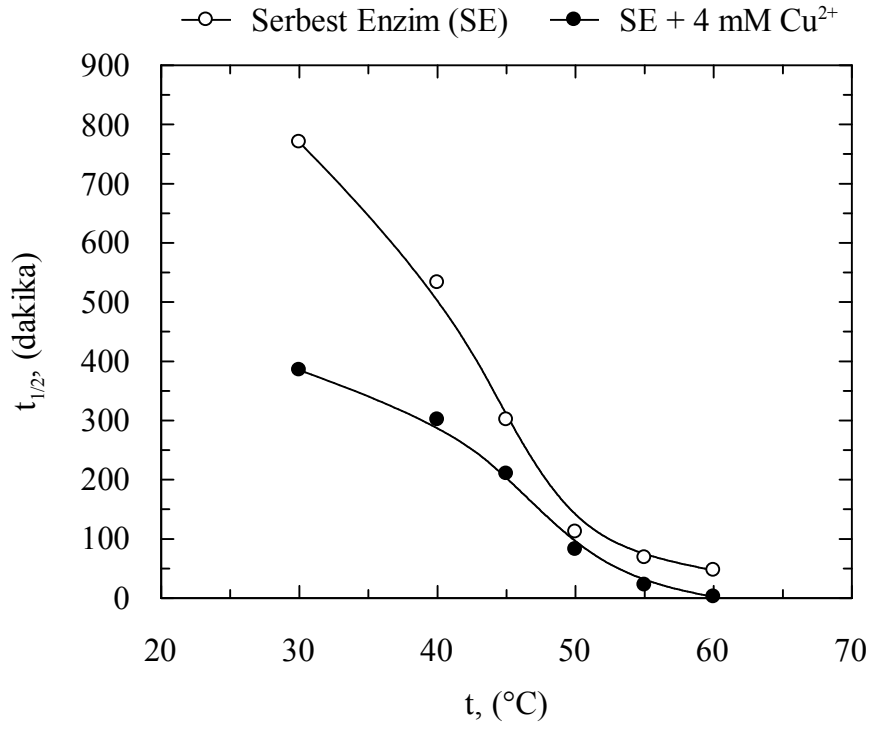
Şekil 4.76: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin otokatalitik hidrolizi üzerinde 4 mM Cu²⁺ iyonları tarafından gerçekleştirilen stabilizasyon etkisi

Tablo 4.58: 4 mM Cu²⁺ metal iyonları varlığında ve yokluğunda farklı sıcaklık değerlerinde alkalen proteaz enziminin otokatalitik hidrolizinin yarı ömür (t_{1/2}) ve stabilizasyon faktörü, (SF) değerleri

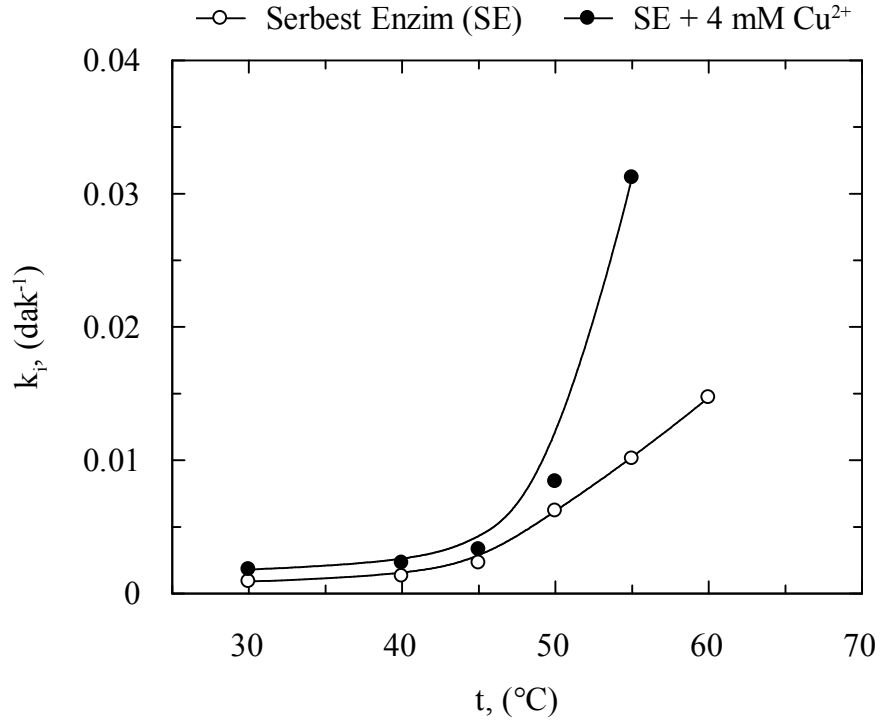
Sıcaklık, (°C)	t _{1/2} , (dak)		SF
	Serbest Enzim (SE)	SE + 4 mM Cu ²⁺	
30	770.00	385.00	0.50
40	533.08	301.30	0.56
45	301.30	210.00	0.69
50	111.77	82.50	0.74
55	68.61	22.21	0.32
60	47.14	2.48	0.05
65	17.15	-	-
70	2.57	-	-

4 mM Cu²⁺ metal iyonları 50°C sıcaklık değerine kadar artan sıcaklıkla beraber enzim üzerinde artan bir stabilizasyon etkisi göstermekle birlikte bu sıcaklık değerinin üzerindeki 55 ve 60°C'da 4 mM Cu²⁺ iyonlarının enzim üzerindeki stabilizasyon etkisi azalmaktadır (Tablo 4.58).

4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda sıcaklığa karşı yarılanma ömrü ve inaktivasyon hız sabiti değerlerinin gösterildiği grafikler sırasıyla şekil 4.77 ve şekil 4.78'de verilmiştir.



Şekil 4.77: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda gerçekleşen otokatalitik hidrolizinin artan sıcaklık değerlerine karşılık gelen yarılanma ömrü değerleri



Şekil 4.78: *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda gerçekleşen otokatalitik hidrolizinin artan sıcaklık değerlerine karşılık gelen inaktivasyon hız sabiti değerleri

5. TARTIŞMA

5.1. Alkalen Proteaz Enziminin Üretimi

Bacillus marmariensis GMBE 72 hücre dışı serin alkalen proteazının sentezi ve salınımı üstel büyüme fazında başlamış büyüme fazının sonuna doğru artmış ve büyüme stasyonier faza girdikten sonra proteaz üretimi maksimum seviyeye ulaşmıştır. Enzim üretimi için optimum sıcaklık ve pH 37°C ve 10.5'tur. Benzer üretim profili Bhaskar ve diğ. [82], tarafından *B. proteolyticus* ile alkalen proteaz ürteiminde, Denizci ve diğ. [10], tarafından *B. clausii* GMBAE 42 ile alkalen proteaz üretiminde de gözlenmiştir. Enzim üretimi için optimal sıcaklıklar *B. proteolyticus* ve *B. clausii* için 37°C olarak bildirilmiş, optimal pH değerleri *B. proteolyticus* için 9.0, *B. clausii* için 10.0 olarak rapor edilmiştir [10, 82].

5.2. Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırılması

Literatürde *Bacillus* cinsi mikroorganizmalardan alkalen proteaz saflaştırılması ve karakterizasyonuna ilişkin bir çok çalışma bulunmaktadır [8, 41, 51, 54, 55, 56, 57]. Çalışmamızda *Bacillus marmariensis* GMBE 72 hücre dışı serin alkalen proteazı 16.7 kat ve %31 saflaştırma verimi ile saflaştırılmıştır. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 serin alkalen proteazının saflaştırma prosedürü *Bacillus clausii* GMBAE 42 serin alkalen proteazının [41] saflaştırma prosedürü ile benzerdir. Kullanılan saflaştırma prosesine benzer bir yöntem de *Bacillus* sp. SSR1 serin alkalen proteazının [9] saflaştırılmasında rapor edilmiştir. *Bacillus* sp. SSR1 soyu alkalen proteazı anyon değiştirme kromatografisi çıkışı itibariyle % 50 verimle 16.5 kat saflaştırılırken, *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazı % 58 verimle 16 kat saflaştırılmıştır. *B. pumilus* [49], *Bacillus* sp. PS719 [52] ve *B. pseudofirmus* [53] soylarından saflaştırılan alkalen proteazlarda iyon değiştirme kromatografisi kolon çıkışı itibariyle sırasıyla % 58, % 65 ve % 24 verime ve 3.9, 4.9, 21.4 kat saflaştırma derecesine ulaşılmıştır. Bizim saflaştırma verimimiz *B. pumilus* ve *Bacillus* sp. PS719 alkalen proteazlarından daha düşük olmakla birlikte saflaştırma derecemiz daha yüksektir. *B. pseudofirmus* alkalen proteazında ise bizim proteazımıza kıyasla daha düşük saflaştırma verimine ve daha yüksek saflaştırma derecesine ulaşılmıştır. *B. pumilus*

ve *Bacillus* sp. PS719 soylarında saflaştırılan alkalen proteazların saflaştırma derecelerini arttırmak için ekstra kromatografik işlemler uygulanmıştır. Yükseltgenler ve SDS'e karşı kararlı bir alkalen proteazın *Bacillus clausii* I-52 soyundan % 79 verimle 9.9 kat saflaştırıldığı rapor edilmiştir [54]. Bu enzimin saflaştırmasında bizim kullandığımız saflaştırma prosedürüne ek olarak fenil sefaroz hidrofobik etkileşim kromatografisi olmakla birlikte ulaşılan saflaştırma derecesi bizimkinden düşüktür.

Alkalen proteazlar genellikle pozitif yüklü enzimler olup anyon değiştiricilere bağlanmazlar [23, 41, 58]. Çalışmamızda tersi bir durumla karşılaşılmış enzimimiz DEAE selüloz anyon değiştiricisine bağlanmıştır. Aynı durum *Bacillus* sp. PS719 alkalen proteazı saflaştırılırken de gözlenmiştir [52]. Bu enzimimizin yüksek dikarboksilik amino asit içeriğine sahip olduğunun bir göstergesidir. DEAE kolonuna yükleme ve elüsyon koşullarında pH 10.5 olup bu pH'da bütün karboksil grupları karboksilat anyonlarına iyonize olurlar. Buda enzimimizin anyon değiştiricideki pozitif elektrik yükleriyle elektrostatik etkileşimini ve dolayısıyla enzimimizin anyon değiştiriciye bağlanmasını sağlar. Enzimimizin DEAE selüloz kolonundan elüsyonu 0-250 mM arasında 50 mM'lık NaCl artışlarıyla yapılan ardışık elüsyon sonucu 200 mM NaCl ile elüsyon varlığında gerçekleştirilmiştir. Towatana ve diğ. [52] ise 0-1 M NaCl aralığında lineer gradient elüsyonu uygulamışlar ve 0.5 M NaCl varlığında alkalen proteaz elüsyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Bacillus marmariensis GMBE 72 alkalen proteazının DEAE-selüloz kolonundan yıkanmasını takiben kolondan toplanan yüksek spesifik aktiviteli fraksiyonlar bir araya getirilerek SDS-PAGE'de analiz edildiğinde jelde Coomassie brilliant blue G 250 ile boyama sonrası protein bandı gözlenememiştir. Bunun nedeninin enzimin jelle yüklenmeden önceki denatürasyon koşullarında kendi kendini hidrolizlemesi olduğu düşünülmektedir. Olası otoproteolizi önlemek amacı ile enzim denatürasyon koşullarından önce PMSF ile muamele edilerek jelle yüklenmiş bunun sonucu olarak elektroforez sonrası jelde yapılan gümüş boyamada enzim tek band protein olarak gözlenmiştir. Aynı sonuç *Bacillus clausii* GMBAE 42 serin alkalen proteazının [41], *Bacillus* KSM-K 16 serin alkalen proteazının [63] ve *Bacillus sphaericus* alkalen proteazının [8] SDS-PAGE analizlerinde de rapor edilmiştir. Farklı *Bacillus*

türlerinden izole edilen alkalen proteazların molekül ağırlıkları 15-36 kDa arasında değişmektedir [3, 7, 24, 30]. Çalışmamızda saflaştırılan *Bacillus marmariensis* GMBE 72 serin alkalen proteazının da sahip olduğu 24.6 kDa'luk molekül ağırlığı ile bu aralığa girdiği belirlenmiştir.

5.3. Alkalen Proteaz Enzim Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Sıcaklık ve pH'nın Etkisi

Bacillus soylarından izole edilen alkalen proteazların optimum sıcaklık değerleri genellikle 50-70°C aralığında [30, 41, 51, 58, 59, 60, 61, 67] olmakla birlikte bazı mezofilik *Bacillus* türlerinde 40-55°C, termofilik *Bacillus* türlerinde ise 70-75°C aralığında değişmektedir [9, 54, 62, 63, 64]. Kumar, C. G. [49], *Bacillus pumilus* alkalen proteazının optimal sıcaklık değerini pH 11.5'da 55-60 °C, Kazan ve diğ. [41], *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının optimal sıcaklık değerini pH 10.5'da 60°C olarak rapor etmişlerdir. Singh ve diğ. [9], *Bacillus* sp. SSR1 alkalen proteazının, Patel ve diğ. [62], haloalkalifilik *Bacillus* sp. proteazının optimal sıcaklık değerlerini pH 10'da sırasıyla 40°C ve 37°C olarak bildirmişlerdir. Bu proteazlar sahip oldukları düşük optimum sıcaklık değeri nedeniyle istisna proteazlar olarak değerlendirilmektedirler. Termofilik *Bacillus* türlerinden *Bacillus* sp. PS719 [52], alkalen proteazının pH 9'da, *Bacillus* sp. [60] ve *Bacillus licheniformis* NH1 [61], proteazlarının pH 10'daki optimal sıcaklık değerleri sırasıyla 75, 70, 65-70°C olarak belirlenmiştir. Diğer yandan bazı *Bacillus* soylarından saflaştırılan proteazların sahip oldukları optimum sıcaklık değerlerinde özellikle Ca²⁺ iyonlarının ilavesi ile 5-15 °C arasında değişen kaymaların gözleendiği rapor edilmiştir [8, 41, 55, 61, 62]. Patel ve diğ. [62], haloalkalifilik *Bacillus* sp. proteazının optimal sıcaklık değerinin % 1 NaCl ilavesiyle 37°C'den 55°C'ye, Kazan ve diğ. [41], *Bacillus clausii* GMBAE 42 proteazının, Fujiwara ve Masui [60], *Bacillus* sp. alkalen proteazının optimal sıcaklık değerlerinin 5 mM Ca²⁺ iyonları varlığında sırasıyla 60°C'den 70°C'ye, 70°C'den 85°C'ye kaydığını bildirmişlerdir. Gessesse ve diğ. [53], *Nesterkonkia* sp. AL-20'den izole edilen alkalen proteazın optimum sıcaklık değerinin 70 °C olduğunu 5 mM Ca²⁺ iyonları ilavesinin enzimin optimum sıcaklık değerinde kaymaya neden olmadığını buna karşılık *B. pseudofirmus* AL-89'dan izole edilen alkalen proteazın 60°C'de maksimum aktiviteye sahip olduğunu ve 5 mM

Ca²⁺ iyonları ilavesinin enzimin optimum sıcaklık değerini 60°C'den 70°C'ye kaydırıldığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda enzimimizin optimal sıcaklık değeri 60°C olarak belirlenmiş olup 4 mM Cu²⁺ veya 5 mM Ca²⁺ iyonları ilavesiyle optimal sıcaklık değerinde kayma gözlenmemiştir. Enzimimiz sahip olduğu optimum sıcaklık değeri ile proteazlar için belirlenen optimum sıcaklık değer aralığına girmekte ve ayrıca maksimum aktivite gösterebilmek için kofaktör olarak bir metal iyonuna ihtiyaç duymamaktadır.

Literatürde *Bacillus* soylarından izole edilen alkalen proteazların 30-60°C sıcaklık aralığında 10-15 dakika arasında değişen sürelerde termal stabiliteye sahip oldukları bildirilmiştir [9, 24, 41, 50, 57, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69]. Singh ve diğ. [9], *Bacillus* sp. SSR1 alkalen proteazının pH 10'da 40°C'de 360 dakika inkübasyondan sonra % 100 oranında koruduğunu, Kazan ve diğ. [41], *Bacillus clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının 30°C'de 6 gün süre ile % 100 stabil kaldığını enzimin 50°C'de 2 saat inkübasyon sonunda aktivitesini koruduğunu, aynı inkübasyon süresinde 55 ve 60°C'de aktivitesini sırasıyla % 60 ve % 100 oranında kaybettiğini rapor etmişlerdir. GMBAE 42 proteazı 60°C'de 30 dakika inkübasyondan sonra aktivitesini % 55 oranında korumuştur [41]. Kobayashi ve diğ. [55], *Bacillus* sp. KSK-K 16 serin alkalen proteazının 50 ve 60°C'de 10 dakika, Yamagata ve diğ. [65], alkalifilik *Bacillus* sp. proteazının pH 10'da değişen sıcaklıklarda 10 dakika inkübasyonundan sonra, 65°C' nin altındaki sıcaklıklarda kararlı olduğunu 65°C'da aktivitesinin % 30'unu, 70°C'da ise aktivitesini tamamen kaybettiğini bildirmişlerdir. Ferrero ve diğ. [66], *Bacillus licheniformis* MIR 29 proteazının 60°C'da 10 dakika süre ile %100 oranında stabilitesini koruduğunu bildirilmişlerdir. Banerjee ve diğ. [69], *Bacillus brevis* termostabil alkalen proteazının 25°C'de 288 saat (12 gün) stabil kaldığını 30 ve 37 °C'de aktivitesinin % 70'ini koruduğunu bildirmişlerdir. Yang ve diğ. [68], *Bacillus subtilis* proteazının 25-50°C aralığında 30 dakika inkübasyon sonunda başlangıç aktivitesini koruduğunu daha yüksek sıcaklıklara çıkıldıkça aktivitesini hızla kaybettiğini ve 60°C'de tamamıyla inaktive olduğunu bildirmişlerdir. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının stabilitesi değerlendirildiğinde enzimin 4 gün boyunca oda sıcaklığında aktivitesini % 100 oranında koruduğu; 30, 40 ve 50°C sıcaklıklarda enzimin yarılanma ömrünün sırasıyla 2310, 385 ve 97.6 dakika olduğu belirlenmiştir. 60°C'da ise yarılanma ömrü hızla azalarak 2.2 dakikaya

inmiştir. Bu 60°C’da 5 dakikanın üzerindeki inkübasyon sürelerinde enzimin komple inaktivasyonuna işaret eder. Singh ve diğ. [9], SSR 1 proteazı için 50 ve 60°C sıcaklıklarda enzimin yarılanma ömrünün sırasıyla 300 ve 60 dakika olduğunu bildirmişlerdir. Banerjee ve diğ., [69], *Bacillus brevis* alkalen proteazının termostabilite çalışmasında enzimin 25°C’de 288 saat stabil olduğunu, 30 ve 37°C’de maksimum aktivitesinin % 70 kadarını koruduğunu ayrıca enzimin 50 ve 60°C’de sırasıyla 60 ve 7 saat yarılanma ömrüne sahip olduğunu rapor etmişler, ortama Ca²⁺ iyonları (10 mM) ve/veya glisin (1 M) ilavesinin enzimin termostabilitesine katkıda bulunduğunu, enzimin Ca²⁺ iyonları ve glisin varlığında 60°C’de 4 gün sonra maksimum aktivitesinin % 50’sinden fazlasını koruduğunu bildirmişlerdir. Towatana ve diğ., [52], *Bacillus* sp. PS719 proteazının 40°C’nin altındaki sıcaklıklarda 50 mM Tris-HCl tampon çözeltisinde, pH 9.0, 15 dakika inkübasyonu sonrasında stabil olduğunu daha yüksek sıcaklıklara çıkıldıkça da enzimin kademeli olarak inaktivasyona uğradığını ve 90°C’de 15 dakika inkübasyondan sonra başlangıç aktivitesinin % 60’ından fazlasını kaybettiğini belirlemişlerdir. Ortama 2 mM Ca²⁺ iyonları ilavesiyle, enzimin termal stabilitesinde iyileşme olduğunu ve 70-90°C sıcaklık aralığında 15 dakika inkübasyon sonrasında enzimin termal stabilitesinde kayıp gözlenmediğini rapor etmişlerdir [52].

Çalışmamızda *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında 30, 40 ve 50 °C sıcaklıklarda yarılanma ömrünün sırasıyla 3465, 630 ve 247.5 dakika olduğu belirlenmiştir. 60°C’de ise enzimin yarılanma ömrü hızla azalarak 2.63 dakikaya inmiştir. Bu 60°C’da 5 dakikanın üzerindeki inkübasyon sürelerinde enzimin komple inaktivasyonuna işaret eder. 30, 40 ve 50°C’de Cu²⁺ iyonları varlığında enzimin termostabilitesindeki artışlar sırasıyla % 67, % 61 ve % 40 olarak belirlenmiştir. Cu²⁺ iyonları varlığında enzimin termostabilitesindeki bu artışın nedeni Cu²⁺ iyonlarının protein molekülü içindeki etkileşimleri kuvvetlendirdiği ve muhtemelen Cu²⁺ iyonlarının enzimin otolizine sebep olan bölgeye bağlanarak protein molekülünün termostabilitesine katkıda bulunduğu şeklinde açıklanabilir [73, 74, 75]. Literatürdeki termostabilite çalışmalarında termostabil serin proteazların 50°C’deki yarı ömür değerlerinin 200 dakikanın üzerinde, 60°C’de ise 2-22 dakika olarak rapor edilmiştir [9]. Ticari deterjan enzimlerinden subtilizin Carlsberg ve subtilizin BPN için 50°C’deki yarı

ömür değerleri sırasıyla 3.4 ve 2.4 dakika olarak bildirilmiştir [9, 30]. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının 50°C'deki yarı ömür değeri subtilizin Carlsberg ve subtilizin BPN'nin yarı ömür değerlerinden daha yüksek olduğundan daha yüksek termostabiliteye sahiptir ve ticari deterjanlarda kullanılmak için daha iyi bir katkı maddesi olarak düşünülebilir.

Değişik *Bacillus* türlerinden izole edilen alkalen proteazların optimal pH değerleri genellikle pH 10-11 aralığında olup bütün proteazlar pH 6-12 arasında stabildirler [29]. *Bacillus* türlerinden izole edilen ve bu aralık dışında kalan *Bacillus stearothermophilus* ve *B. horikoshii* gibi bazı *Bacillus* türlerinin optimum pH değerinin 9, *B. licheniformis* gibi bazı *Bacillus* türlerinin optimum pH değerinin ise 12-13 aralığında olduğu bildirilmiştir [41]. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının optimal pH değeri 11 olarak belirlenmiştir.

Alkalin proteazların büyük bir çoğunluğu pH 6-12 arasında, 25 ile 60°C arasında değişen sıcaklıklarda, 10-60 dakika aralığında stabildirler [41]. Banerjee ve diğ., [69], *Bacillus brevis* alkalin proteazının pH 10.5 ve pH-11'de, 60°C'de 1 saat inkübasyonundan sonra, sırasıyla % 100 ve % 92 oranında stabilitesini koruduğunu, pH'daki artışlarla birlikte enzim aktivitesinde azalmanın gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Singh ve diğ., [9], *Bacillus* sp. SSR1 alkalin proteazın optimum pH değerinin 10 olduğunu, pH 8-11 aralığında, 40°C'de 1 saat inkübasyonundan sonra, aktivitesinin % 90'ından fazlasını koruduğunu, Beg ve Gupta, [56], *B. mojavensis* alkalin proteazının optimum pH değerinin 10.5 olduğunu ve enzimin pH 7-11.5 aralığında, oda sıcaklığında, 48 saat stabil kaldığını, Joo ve diğ., [70], *B. horikoshi* alkalin proteazının pH 5.5-12 aralığında geniş bir pH stabilitesine sahip olduğunu ve enzimin pH 5'de, 45°C'de 16 saat inkübasyondan sonra bile, aktivitesinin yaklaşık % 60'ını koruduğunu, Kazan ve diğ., [41], *Bacillus clausii* GMBAE 42 alkalin proteazının pH 9-11.5 aralığında, oda sıcaklığında, 4 gün süreyle stabil kaldığını ve aynı inkübasyon koşullarında enzimin pH 11-13 aralığında aktivitesinin sadece % 30'unu kaybettiğini bildirmişlerdir. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalin proteazı pH 8.0-13.0 aralığında oda sıcaklığında 7 gün süre ile stabilitesini korumuştur. Ticari deterjan enzimlerinden *B. licheniformis* tarafından üretilen Alcalase™ (Novozymes A/S), *Bacillus clausii* tarafından üretilen Savinase™

(Novozymes A/S), *Bacillus* sp.'de ekspresse edilmiş *B. lentus* tarafından üretilen Purafect™ (Genencor Int. Inc., USA) ve *B. licheniformis* tarafından üretilen Maxatase™ (Gist-Brocades) enzimlerinin maksimum aktivite gösterdikleri pH aralıkları sırasıyla pH 8-9, pH 8-10, pH 10 ve pH 9.5-10 olarak bildirilmiştir [74]. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının optimal pH'sı 11 olup yukarıda belirtilen ticari proteazların pH değerlerinden daha yüksektir.

Çamaşır deterjanlarında kullanılan enzimlerin pH optimumlarının pH 9-12, termostabiliteilerinin 50-70°C aralığında, [41, 58], olduğu göz önünde bulundurulacak olursa *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazı sahip olduğu optimum pH değeri (pH 11) ve yıkama sıcaklıklarında termostabil ticari proteazlara yakın termostabilitesi ile uygun bir ticari deterjan enzimi olarak değerlendirilebilir.

5.4. Alkalen Proteaz Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi

Bacillus soylarından saflaştırılan alkalen proteazlar üzerinde Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} gibi iki değerlikli metal iyonlarının aktivatör etkisine sahip olduğu [9, 41, 51, 54, 58, 66, 70, 71, 74, 78] Fe^{3+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cu^{3+} , Ag^{+} ve Zn^{2+} gibi metal iyonlarının da enzim üzerinde kuvvetli inhibisyon etkisi yarattığı bildirilirken [9, 41, 64, 71, 74]; Na^{+} , K^{+} , Co^{2+} , Cd^{2+} ve Fe^{2+} gibi diğer metal iyonlarının proteazları çok az inhibe ettikleri ya da hiç inhibisyon etkisi yaratmadıkları [58, 71, 74, 78] rapor edilmiştir. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının 30°C'de Cu^{2+} iyonları tarafından kuvvetli bir şekilde aktive edildiği belirlenmiştir. Enzimin Cu^{2+} iyonları tarafından aktive edilmesi ilginçtir çünkü literatürde bakır iyonlarının aktivasyon etkisi *Bacillus mojavensis* tiyol-bağımlı serin alkalen proteazı üzerinde Beg ve Gupta, [56], ve *Bacillus* sp. SSR1 proteazı üzerinde Singh ve diğ. [9], tarafından rapor edilmiştir. 1 mM Cu^{2+} iyonları varlığında oda sıcaklığında 60 dakika süre ile inkübe edilen *Bacillus mojavensis* alkalen proteazının aktivitesinin % 36'ın üzerinde arttığı, 10 mM Cu^{2+} iyonları varlığında 40°C'de 10 dakika süre ile inkübe edilen *Bacillus* sp. SSR1 alkalen proteazının aktivitesinin % 13.5 oranında arttığı bildirilirken [9], 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında 30°C'de 20 dakika süre ile inkübe edilen *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının aktivitesinin % 52 oranında arttığı tespit edilmiştir. 5 mM Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Co^{2+} iyonları GMBE 72 alkalen proteazı üzerinde sırasıyla % 21,

% 34 ve % 21 oranında inhibisyon etkisi yaratırlarken 5 mM Zn²⁺ ve Fe²⁺ iyonları enzimi % 57 oranında inhibisyona uğratmışlardır. Mikrobiyal proteazların aktivitelerinin korunmasında Ca²⁺ iyonlarının aktivatör etkisi literatür çalışmalarının birçoğunda bildirilmesine [9, 41, 51, 54, 58, 66, 70, 74, 78] rağmen Ca²⁺ ve Mg²⁺ iyonlarının *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazını inhibisyona uğrattıkları belirlenmiştir. Fe²⁺ ve Zn²⁺ metal iyonlarının alkalen proteazlar üzerinde çok az ya da hiç inhibisyon etkisi yapmadığı bildirilmekle birlikte [9, 41, 64, 71, 74, 78] GMBE 72 alkalen proteazı Fe²⁺ ve Zn²⁺ metal iyonları tarafından kuvvetli inhibisyona uğratılmıştır. Cu²⁺ iyonlarının enzim üzerindeki aktivasyon etkisi metal iyonlarının enzimin aktif konformasyonunu kuvvetlendirdiği ve termal denatürasyona karşı enzimi koruduğu şeklinde açıklanabilir [51, 58].

Hutadilok ve diğ. [52], *Bacillus* sp. PS719 proteazı ile yaptıkları çalışmada enzimin metal iyonuna olan afinitesinin metal iyon çapı ile doğru orantılı olduğunu iyonik çaptaki artışla enzim-metal afinitesinin arttığını ve test ettikleri metal iyonları arasında en yüksek iyonik çapa Ca²⁺ iyonlarının sahip olduğunu bildirmişler ve Ca²⁺ iyonları varlığında enzimin en yüksek aktiviteye sahip olmasını da bu şekilde açıklamışlardır [52]. Yine aynı çalışmada Cu²⁺ iyonunun en küçük iyonik çaplardan birine sahip olması sebebiyle enzim üzerindeki aktivasyon etkisinin gözlenmediğini bildirmişlerdir. Buna karşılık bizim çalışmamızda denenen metal iyonları arasında en yüksek aktivasyon etkisinin en küçük iyonik çapa sahip olmasına rağmen Cu²⁺ iyonları tarafından gerçekleştirildiği belirlenmiştir.

5.5. Alkalen Proteaz Enzim Aktivitesi Üzerine Aktif Bölge Yönelimli İnhibitörlerin Etkisi

Bacillus türlerinden izole edilen alkalen proteazların birçoğu serin proteaz inhibitörü fenilmetil sülfonil florür (PMSF) tarafından kuvvetli bir şekilde inhibe edilirler [7, 30, 41, 58, 61, 63, 64, 69, 76]. Beg ve Gupta [56], *Bacillus mojavensis* alkalen proteazının 1 mM PMSF veya 1 mM iyodoasetik asit tarafından tamamen inhibisyona uğratıldığını buna karşılık proteolitik aktivitenin 1 mM 2-merkaptolanol veya 1 mM ditiyotreitol tarafından 2 kattan fazla arttırıldığını bildirmişler bu sebeple *Bacillus mojavensis* alkalen proteazının tiyol-bağımlı serin alkalen proteaz olduğunu

rapor etmişlerdir. Huang ve diğ., [67], *Bacillus pumilus*, Kazan ve diğ., [41], *Bacillus clausii* GMBAE 42 alkalen proteazlarının 1 mM PMSF tarafından kuvvetli inhibisyona uğratıldıklarını bildirmişlerdir. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteaz aktivitesi üzerine değişik sentetik inhibitörlerin etkisi araştırılmış ve protein molekülünün sadece PMSF tarafından komple inhibisyona uğratıldığı belirlenmiştir. Enzim 1 ve 4 mM PMSF tarafından 1 saat sonunda sırasıyla % 74 ve % 100 oranında inhibisyona uğratılırken, tripsin ailesi enzimlerin spesifik ajanı tosil-L-lizin klorometil keton (TLCK) tarafından inhibisyona uğratılmamış, kimotripsin ailesi enzimlerin spesifik alkilleyici ajanı tosil L-fenilalanil klorometil keton (TPCK)'nin ise enzim üzerinde % 30 oranında inhibisyon etkisi gözlenmiştir. Diğer proteaz inhibitörlerinin enzim üzerinde inhibisyon etkileri gözlenmemiştir. Bu inhibisyon profili *Bacillus marmariensis* GMBE 72 hücre dışı alkalen proteazının PMSF tarafından komple inhibisyona uğratılması nedeniyle serin proteaz ailesinden bir serin alkalen proteaz olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan enzim üzerinde şelat yapıcı ajan EDTA tarafından yaratılan bir inhibisyon etkisi gözlenmemiş, enzimin 10 mM EDTA varlığında aktivitesini % 100 oranında koruduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç *Bacillus marmariensis* GMBE 72 proteazının bir metaloproteaz olmadığını enzimin aktivite gösterebilmek için kofaktöre ihtiyaç duymadığını göstermiştir. Kazan ve diğ., [41], *Bacillus clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının, Joo ve Chang, [79], *Bacillus* sp. I-312 proteazının, Joo ve diğ., [80], *Bacillus* sp. alkalen proteazının EDTA varlığında aktivitelerini koruduklarını rapor ederlerken, Banerjee ve diğ., [69], *Bacillus brevis*, Sellami-Kamoun ve diğ., [71], *Bacillus licheniformis* RP1 alkalen proteazlarının 5 mM EDTA varlığında sırasıyla ve % 84 ve % 70 oranında inhibisyona uğradıklarını bildirmişlerdir.

5.6. Alkale Proteaz Enziminin Substrat Spesifitesi

Literatürde *Bacillus* cinsi mikroorganizmalardan saflaştırılan alkalen proteazların substrat spesifiteleri ile ilgili çok fazla bilgiye rastlanmamıştır. Kazan ve diğ., [41], *Bacillus clausii* GMBAE 42 serin alkalen proteazı ile yaptıkları substrat spesifitesi çalışmasında enzimin denenen sentetik substratlardan N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA'ı en yüksek spesifite ile hidrolizlediğini ve bu substrat varlığında enzimin K_m değerinin 0.655 μ M olarak belirlendiğini bildirmişlerdir. GMBAE 42 proteazının N-

Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Val-pNA ve Np-Tos-Gly-Pro-Lys-pNA substratlarına karşı bağıl olarak düşük spesifite gösterirken, L-Leu-pNA ve N α -Benzoil-L-Arg-pNA (L-BAPNA) substratlarına karşı spesifite göstermediği araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Singh ve diğ., [8], alkalifilik *Bacillus sphaericus*'dan saflaştırılan proteaz A ve proteaz B ile oligopeptidil-p-nitroanilid konjuge sentetik substratları varlığında yaptıkları çalışmada kimotripsin-benzer serin proteaz enzimlerinin spesifik substratlarından olan N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA ve N-Suc-Phe-Ala-pNA sentetik substratlarından N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA'e karşı her iki proteazın da yüksek aktivite gösterdiğini, bu substrat varlığında proteaz A ve B için K_m değerlerinin sırasıyla 9.6×10^{-5} M ve 11.6×10^{-5} M olarak belirlendiğini, N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA ve N-Suc-Phe-Ala-pNA'in proteaz A tarafından hidrolizlenmediğini ve proteaz B'nin de N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA'e karşı çok dşuk katalitik aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Joo ve Chang, [54], halo-tolerant *Bacillus clausii* I-52 proteazı ile yaptıkları çalışmada enzimin test edilen sentetik substratlardan N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA kromojenik substratını yüksek spesifite ile hidrolizlediğini ve enzimin bu substrat varlığında belirlenen K_m ve k_{cat} değerlerini sırasıyla $83.9 \mu\text{mol l}^{-1}$ ve 238.6 s^{-1} olarak bildirmişlerdir. Yamagata ve diğ., [65], alkalifilik *Bacillus* sp. proteazı subtilizin Sendai'nin subtilizin ailesi proteazlarının spesifik substratları olan florojenik peptidil-4-metilkumaril-7-amid (peptidil-MCA) substratlarından Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA ve Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA'e karşı yüksek spesifite gösterdiğini ve bu substratlar için K_m değerlerinin sırasıyla 0.38 mM ve 0.13 mM olarak belirlendiğini belirtmişlerdir. Saeki ve diğ., [81], alkalifilik *Bacillus* spp. serin proteazının Ala-Ala-Pro-Leu-pNA, Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, Ala-Pro-Ala-pNA ve Ala-Ala-Ala-pNA substratlarını sırasıyla 100:10:7:1 bağıl aktiviteyle hidrolizlediğini rapor etmişlerdir. Kumar, C. G., [49], alkalifilik *Bacillus pumilus* termostabil alkalen proteazının Glu-Gly-Ala-Phe-pNA ve Glu-Ala-Ala-Ala-pNA peptid substratlarını etkin bir şekilde hidrolizlediğini bu substratlar için belirlenen K_m ve k_{cat} değerlerinin ise Glu-Gly-Ala-Phe-pNA için sırasıyla 1.1 mM ve 624 s^{-1} , Glu-Ala-Ala-Ala-pNA için sırasıyla 3.7 mM ve 826 s^{-1} olarak belirlendiğini bildirmiştir. Dabonné ve diğ., [83], *Bacillus halodurans* H4 metalopeptidazı ile yaptıkları çalışmada enzimin pNA konjuge sentetik substratlara karşı aktivite göstermediğini rapor etmişlerdir. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazı ile yapılan substrat spesifitesi çalışmasında

enzim test edilen peptidil-pNA substratlar arasında en yüksek spesifik aktiviteyi N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA sentetik substratına karşı göstermiş ve bu substrat varlığında enzimin K_m değeri 1.47 μM olarak belirlenmiştir. Enzim N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA ve N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA substratlarını bağıl olarak daha düşük bir spesifite ile hidrolizlemiş, N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA substratına karşı ise çok zayıf hidrolitik aktivite göstermiştir. GMBE 72 alkalin proteazının K_m ve k_{cat} değerleri sırasıyla; N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA için 1.47 μM ve $4.66 \times 10^3 \text{ dak}^{-1}$, N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA için 1.61 μM ve $3.99 \times 10^3 \text{ dak}^{-1}$, N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA için 4.30 μM ve $6.49 \times 10^2 \text{ dak}^{-1}$ ve N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA substratları için belirlenen 10.32 μM ve 3.614 dak^{-1} olarak belirlenmiştir. GMBE 72 proteazının N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA'ye karşı spesifitesinin *Bacillus clausii* GMBAE alkalin proteazına göre daha düşük, [41], alkalifilik *Bacillus sphaericus*'dan saflaştırılan proteaz A ve proteaz B proteazlarına, [8], ve halo-tolerant *Bacillus clausii* I-52, [54], proteazına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Substrat spesifitesi sonuçlarına göre *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalin proteazı kimotripsin inhibitörü TLCK tarafından inhibe edilmemesine rağmen enzimin sentetik substratın P_1 ucundaki aromatik fenil alanin, (-Phe), kalıntısını tercih ederek kimotripsin spesifik substratı olan N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA'ye karşı yüksek hidrolitik aktivite gösterdiği görülmüş bu sebeple *Bacillus marmariensis* GMBE 72 proteazı kimotripsin benzer serin proteaz olarak değerlendirilmiştir. GMBE 72 proteazı tripsin benzer enzimlerin spesifik substratı olan N α -benzoil-L-Arg-pNA (L-BAPNA)'e [50], karşı hidrolitik aktivite göstermemiştir.

Doğal substratlar ile yapılan çalışmalar incelendiğinde kazein, sığır serum albumini, hemoglobin, jelatin, keratin ve süt tozu ile rapor edilen çalışmalara rastlanmıştır [8, 49, 50, 52, 59, 65, 66, 74, 78, 80]. Singh ve diğ., [8], alkalifilik *Bacillus sphaericus*'dan saflaştırılan proteaz A ve proteaz B'nin her ikisinde doğal substratlardan hemoglobini yüksek spesifite ile hidrolizlediğini bildirmişlerdir. Sana ve diğ. [48], *γ-Proteobacterium* proteazının hemoglobini etkin bir şekilde hidrolizlediğini bu sebeple de enzimin kurumuş kan lekelerinin giderilmesinde kullanılabilecek etkili bir ajan olduğunu belirtmişlerdir. Singh ve diğ., [57], *Bacillus sphaericus* proteazının jelatin hidrolizinde başarılı olduğunu bu sebeple kullanılmış X-ışınlama filmlerinden gümüşün uzaklaştırılmasında kullanılabileceğini rapor

etmişlerdir. Bakhtiar ve diğ., [47], *Nesterenkonia* sp. AL 20 alkalin proteazının kazein ve hemoglobini yüksek spesifik aktivite ile hidrolizlediğini belirtmişlerdir. Kobayashi ve diğ., [63], *Bacillus* sp. KSM-K16 proteazı ile yaptıkları çalışmada enzimin kazeini en yüksek spesifikite ile hidrolizlediğini hemoglobin, keratin, α -keratin, elastin ve yumurta beyazı proteinlerinin kazeine göre bağıl hidroliz hızlarının sırasıyla % 34, % 52, % 79, % 12 ve % 2.1 olduğunu rapor etmişlerdir. Rahman ve diğ., [64], *B. stearothermophilus* F1 alkalin proteazının sığır serum albumini, kazein ve hemoglobin doğal substratlarından kazeine karşı en yüksek aktivite gösterdiğini albumin ve hemoglobinin enzim tarafından daha düşük aktivite ile hidrolizlendiğini bildirmişlerdir. Dabonné ve diğ., [83], *Bacillus halodurans* H4 metalopeptidazı ile yaptıkları çalışmada enzimin protein substratlardan azokazein ve sığır serum albumini varlığında hidrolitik aktivite göstermediğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalin proteazının süt tozu, hemoglobin, sığır serum albumini ve jelatin doğal proteinlerinin hidrolizini gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Enzim için en iyi substrat süt tozu olarak belirlenmiştir. Enzimin kazein substratı varlığında kazein aktivitesi % 100 alındığında süttozu, hemoglobin, sığır serum albumini ve jelatin substratlarının bağıl hidroliz hızı sırasıyla % 143.10, % 42.60, % 16.84 ve % 1.18 olarak belirlenmiştir. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalin proteazının keratin substratına karşı hidrolitik aktivitesi gözlenmemiştir. Buna göre enzimin en çok kazein hidrolizatlarının eldesinde kullanılması uygundur. Bununla birlikte hemoglobine karşı yüksek sayılabilecek bir bağıl aktivitesinin olması nedeniyle de kan lekelerinin uzaklaştırılmasında da kullanılabileceği düşünülebilir.

5.7. Alkalin Proteaz Enzim Aktivitesi Üzerine Yükseltgeyici Ajan ve Sürfaktanların Etkisi

Deterjan bileşeni olarak kullanılan iyi bir deterjan proteazından, sıcaklık ve pH stabilitesinin yanında, farklı yüzey aktif ajanlar ve yükseltgeyici ajanlar varlığında kararlı olması beklenir. Kazan ve diğ., [41], *Bacillus clausii* GMBAE 42 alkalin proteazının % 2 non-iyonik sürfaktanlar Tween-20, 40, 60, 80 ve % 0.1 anyonik sürfaktan SDS varlığında yüksek stabiliteye sahip olduğunu, enzimin 30°C'da 1 saat inkübasyondan sonra % 100 stabil kaldığını rapor etmişlerdir. Joo ve Chang [54],

Bacillus clausii I-52 yükseltgen ve SDS-stabil alkalen proteazının non-iyonik sürfaktanlar varlığında yüksek stabiliteye sahip olduğunu, enzimin aktivitesinin 37°C'da 20 saat süre ile % 5 Tween-20 varlığında inkübasyonu sonrasında % 67 oranında arttığını bildirmişlerdir. Oberoi ve diğ. [85], *Bacillus* sp. RGR-14 alkalen proteazının % 0.1 SDS varlığında 1 saat süre ile kararlı kaldığını ve non-iyonik sürfaktanlar Tween-40 ve Tween-60 varlığında aktivitesinin % 70'inden fazlasını koruduğunu enzimin yükseltgeyici ajan H₂O₂ varlığında 1 saat sonunda aktivitesinin % 40'ını kaybettiğini bildirmişlerdir. Buna karşılık Saeki ve diğ. [59], *Bacillus* sp. KSM-KP43 alkalen proteazının % 10 H₂O₂ varlığında 30 dakika stabil kaldığını rapor etmişlerdir. Jasvir ve diğ. [86], *Bacillus* sp. NG312 alkalen proteazının 37°C'da % 0.2 SDS varlığında 1 saat aktivitesini koruduğunu, Johnvesly ve Naik [87], *Bacillus* sp. JB-99 alkalen proteazının 40°C'da % 0.5 SDS ile 2 saat inkübasyonunu takiben aktivitesinin % 75'ini koruduğunu ve enzimin aynı inkübasyon koşullarında % 5 H₂O₂ varlığında % 100 stabil kaldığını tespit etmişlerdir. Joo ve diğ. [88], yükseltgen ve SDS-stabil *Bacillus clausii* I 52 alkalen proteazının % 5 SDS ve % 10 H₂O₂ varlığında 72 saat inkübasyondan sonra sırasıyla % 75 ve % 110 oranında aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir. Jaouadi ve diğ. [74], *Bacillus pumilus* CBS deterjan stabil alkalen proteazının % 1 ve % 5 yükseltgen ajanlar varlığında özellikle de güçlü anyonik sürfaktan SDS'e karşı yüksek stabiliteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Enzimin 65°C'da % 1 Tween-20 ve % 5 Tween-80, % 1 SDS ve % 10 H₂O₂ varlığında aktivitesini 15 dakika süre ile koruduğunu, aynı ajanlar varlığında 40°C'da 24 saat inkübasyonu takiben enzimin stabil kaldığı bildirmişlerdir. Haddar ve diğ. [72], *Bacillus mojavensis* sürfaktan-stabil alkalen proteazı ile yaptıkları çalışmada enzimin 30°C'da 1 saat inkübasyonundan sonra % 0.1, %0.5 ve % 1 SDS varlığında başlangıç aktivitesini yaklaşık olarak sırasıyla % 91, 66.3 ve 50 oranında koruduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan literatür araştırmalarında farklı yüzey aktif ajanlar ve yükseltgeyici ajanlar varlığında enzimlerin kararlılığını koruduğunu bildiren çalışmaların yanında bu ajanlardan özellikle SDS varlığında inhibisyon gözlemlendiğini belirten bilgiyle de karşılaşmıştır. Fujiwara ve diğ. [60], *Bacillus* sp. termostabil alkalen proteazının aktivitesinin SDS'in kuvvetli inhibitör etkisi nedeniyle SDS varlığında belirlenemediğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Kumar ve diğ. [78], alkalifilik

Bacillus spp. alkalen proteazları AP-1 ve AP-2 üzerinde anyonik sürfaktan SDS'in ortamda % 0.1 olması durumunda enzimlerin sırasıyla % 23 ve % 24 oranında inhibe edildiğini ve SDS konsantrasyonunun artmasıyla gözlenen inhibisyonun da arttığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının non-iyonik sürfaktanlar tarafından dikkate değer oranlarda aktive edildiği belirlenirken, SDS ve H₂O₂ varlığında değişik oranlarda stabilitesini koruduğu gözlenmiştir. Enzimin, 30°C'da 1 saat inkübasyonu sonrasında Tween-20, 40, 60 ve 80 non-iyonik yüzey aktif ajanları tarafından sırasıyla % 91, 64, 71 ve 34 oranında aktive edildiği, SDS varlığında ise aynı inkübasyon koşullarında % 15'lik bir aktivite kaybına uğradığı belirlenmiştir. Enzim, % 5 ve % 10 hidrojen peroksit varlığında 30 °C'da 30 dakika inkübasyon sonrasında sırasıyla % 15 ve 25 oranında aktivite kaybına uğramıştır.

Deterjan formülasyonlarında kullanılan enzimlerden var olan beklentiler dikkate alındığında *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazı non-iyonik sürfaktanlara karşı gösterdiği yüksek stabilite ile bu beklentileri karşılamaktadır. Literatür bilgileri de dikkate alınarak enzimin SDS stabilitesi değerlendirildiğinde *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının literatürde az sayıda karşılaşılan SDS stabilitesi yüksek enzimlerden biri olduğu ve bu özelliği ile ticari deterjan katkı maddesi olarak değerlendirilebileceği düşünülebilir.

5.8. 4 mM Cu²⁺ İyonları Varlığında ve Yokluğunda Alkalen Proteaz Enziminin Stabilizasyon Çalışmasına Ait Sonuçların Değerlendirilmesi

5.8.1. 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyon kinetiğinin incelenmesi

Yapılan literatür araştırmalarında alkalen proteazların termal inaktivasyon kinetiğine ilişkin az sayıda çalışma ile karşılaşılmıştır [88, 91, 92]. Bununla birlikte alkalen proteazların Cu²⁺ iyonları varlığında yapılan termal inaktivasyon kinetiği çalışmasına da rastlanmamıştır. Joo ve diğ. [88], *Bacillus clausii* I-52 alkalen proteazının termal inaktivasyon kinetiği çalışmasında 50 ve 55°C'da enzimin yarı ömür değerlerini sırasıyla 6.5 ve 1.5 saat olarak bildirmişlerdir. Zhang ve diğ. [90], doğal ve modifiye

tripsin ile yaptıkları çalışmada, 60°C’da doğal tripsin ve modifiye tripsinin yarı ömür değerlerini sırasıyla 23 ve 231 dakika olarak bildirmişlerdir. Ikegaya ve diğ. [91], *Aspergillus oryzae* alkalen proteazı ile yaptıkları termal inaktivasyon kinetiği çalışmasında 55°C’da Ca²⁺ iyonları yokluğunda ve varlığında enzimin yarı ömür değerlerini sırasıyla 1.7 ve 19 dakika olarak tespit etmişlerdir. Veltman ve diğ. [92], *Bacillus stearothermophilus* termolizin-benzer proteazı ile yaptıkları termal inaktivasyon kinetiği çalışmasını 0.2 mM Ca²⁺ ve 5 mM Ca²⁺ iyonları varlığında gerçekleştirmişler ve enzimin yarı ömür değerlerini sırasıyla 2.6 ve 31 dakika olarak belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda Cu²⁺ iyonları yokluğunda ve varlığında *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının 50 ve 55°C’deki yarı ömür değerleri Cu²⁺ iyonları yokluğunda sırasıyla 97.6 ve 63.6 dakika, Cu²⁺ iyonları varlığında sırasıyla 247.5 ve 75.3 dakika olarak belirlenmiş olup *Bacillus stearothermophilus* termolizin-benzer proteazının, [92], Ca²⁺ iyonları varlığında belirlenen yarı ömür değerlerinden daha yüksektir.

Çalışmamızda 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70°C sıcaklık değerleri için alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları yokluğunda, 30, 40, 45, 50, 55 ve 60°C sıcaklık değerleri için alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında termal inaktivasyonunun birinci mertebeden inaktivasyon kinetiğine uyduğu belirlenmiştir. 30-50°C aralığında 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında enzimin her bir sıcaklık için belirlenen inaktivasyon hız sabiti değerleri yokluğundaki değerlerden daha düşük, yarılanma ömürleri de daha yüksek bulunmuştur. Buna göre Cu²⁺ iyonları 30-50°C aralığında enzime termal inaktivasyona karşı stabilizatör etki yapmaktadır. 55°C’da Cu²⁺ iyonları yokluğunda ve varlığında enzimin yarı ömür ve inaktivasyon hız sabiti değerleri anlamlı değişiklikler göstermemiştir. Bu 55°C’da Cu²⁺ iyonlarının stabilizatör etkisinin olmadığını göstermektedir. 60°C’da ise enzim Cu²⁺ iyonları varlığında Cu²⁺ iyonları yokluğundan daha hızlı inaktivasyona uğramaktadır. 60°C enzimimizin optimum sıcaklığı olup bu sıcaklıkta enzim Cu²⁺ iyonları varlığında inkübe edildiğinde şiddetle otolize uğramakta dolayısıyla aktivitesi de ortadan kalkmaktadır.

30-55°C aralığında 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında enzimin termal inaktivasyonunun serbest enerji değerleri serbest enziminkinden daha yüksek bulunmuştur. Termal

inaktivasyonun entalpi ve entropi değişim değerleri ise Cu^{2+} iyonları varlığında serbest enzimin entalpi ve entropi değerlerinden daha yüksektir. Bu bulgular çalışılan sıcaklık aralığında Cu^{2+} iyonlarının stabilizatör etkisinin termodinamik göstergeleridir.

Bacillus marmariensis GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu^{2+} iyonları yokluğunda ve varlığında artan sıcaklık değerleri için belirlenmiş kazein hidrolizinin kinetik parametreleri değerlendirildiğinde metal iyonları varlığında elde edilen K_m değerlerinin daha düşük, k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin ise daha yüksek olduğu görölmektedir. Bu sonuçlar metal iyonları varlığında enzimin substrata olan afinitesinin ve katalitik performansının arttığını göstermektedir. Cu^{2+} iyonları yokluğunda 30-60°C aralığında, metal iyonları varlığında 30-50°C aralığında artan sıcaklık değerleri ile birlikte enzimin K_m değerinin değişmediği fakat k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin arttığı gözlenmiştir. K_m değerindeki azalma enzimin substratına olan afinitesinin artması şeklinde yorumlanır. Ancak Cu^{2+} iyonları yokluğunda ve varlığında sırasıyla 60 ve 50°C'ın üzerinde K_m değerleri azalırken k_{cat} değerlerinin de azalması K_m değerindeki azalmanın substrat afinitesinde artış olarak yorumlanmasının doğru olmayacağını gösterir. Beg ve diğ. [89], tarafından *Bacillus mojavensis* alkalen proteazı ile yapılan çalışmada artan sıcaklık değerleri ile birlikte azalan K_m ve artan V_m değerleri elde edilmiş ve sıcaklıktaki artışın enzimin kazein afinitesindeki artışı olarak yorumlanmıştır. Bizim alışmamızda artan sıcaklık ile V_m değerleri de azalmıştır. Alam ve diğ., [94]'de *Clostridium* sp. proteazı ile yaptıkları çalışmada 10-37°C aralığında artan sıcaklıklarda azalan K_m değerlerinin elde edildiğini bildirmişlerdir. Buna karşılık artan sıcaklık değerleri ile birlikte artan K_m değerlerinin belirtildiği çok sayıda yayın ile karşılaşılmıştır [31, 95, 96, 97, 98, 99, 100].

Enzim katalizli reaksiyonların birçoğu için K_m ve V_m önemli kinetik parametreler olup farklı hız sabitlerine bağlıdırlar ve her ikisi de sıcaklıkdaki değişmelerden farklı şekilde etkilenirler. *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazı ile yapılan bu çalışmada artan sıcaklık değerlerine karşılık görünen K_m değerlerindeki bu düşüş sıcaklığın hız sabitleri üzerindeki etkisi göz önüne alınarak incelenmiştir [35, 89, 93]. Cu^{2+} iyonları yokluğunda 62.5°C, Cu^{2+} iyonları varlığında 52.5°C'dan sonra enzim

substrat etkileşiminin steady-state (yatışkın hal) kinetikten uzaklaşıp hızlı denge kinetiğine döndüğü ($K_m=K_s$) düşünülerek, [35], artan sıcaklık değerlerinin reciprokal değerlerine ($1/T$) karşılık $-\log K_s$ değerleri grafiğe geçirilmiş elde edilen lineer doğrunun eğiminden de $E+S \rightleftharpoons ES$ reaksiyonunun entalpi değişimi, (ΔH^0), hesaplanmıştır. Metal iyonları yokluğunda ve varlığında ES dissosiasyonunun ΔH^0 değerleri sırasıyla $-86.46 \text{ kJ mol}^{-1}$ ve $-29.81 \text{ kJ mol}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir. Metal iyonları varlığında daha küçük bir entalpi değerinin elde edilmesi ortamdaki Cu^{2+} iyonları varlığının protein molekülü üzerindeki negatif yüklerin nötralizasyonuna neden olduğu bunun da Cu^{2+} iyonları varlığında daha yüksek V_m değerlerinin elde edilmesini sağladığı düşünülebilir. Enzim kinetiğinde yatışkın hal yaklaşımına göre göre Cu^{2+} iyonları enzim-substrat kompleksi stabilizasyonunu sağlıyor ise reaksiyonun geçiş hali kompleksinin daha düşük bir entalpi değerine sahip olması gerekir [35, 93]. Bu amaçla artan sıcaklık değerlerinin reciprokal değerlerine ($1/T$) karşılık $\log (k_1 / T)$ değerleri grafiğe geçirilmiş elde edilen lineer doğrunun eğiminden geçiş hali kompleksinin metal iyonları yokluğunda ve varlığında entalpi, (ΔH^\ddagger), değerleri hesaplanmıştır. Cu^{2+} iyonları yokluğunda ve varlığında elde edilen entalpi değerleri sırasıyla $-86.45 \text{ kJ mol}^{-1}$ ve $-22.79 \text{ kJ mol}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir. Cu^{2+} iyonları yokluğunda bulunan ΔH^\ddagger ve ΔH^0 değerlerinin aynı olması enzimin yatışkın hal kinetiğinden hızlı denge kinetiğine dönüş yaptığının göstergesidir. Hızlı denge kinetiği ile yürümekte olan enzimatik tepkimede K_m artık dissosiasyon denge sabiti olan K_s değerine eşittir. Dissosiasyon sabiti ise sıcaklıkla değişir. Bu nedenle Cu^{2+} iyonları yokluğunda 60°C 'ın üzerinde hızlı denge kinetiği sonucu azalan K_m (K_s) değerleri gözlenmiştir. Cu^{2+} iyonları varlığında ES geçiş hali kompleksinin entalpi değeri, (ΔH^\ddagger), dissosiasyon entalpisi değerinden, (ΔH^0), daha düşük bulunmuştur. Bu olgu 50°C 'ın üzerindeki sıcaklıklarda enzimin kinetik davranışının yatışkın hal yaklaşımından hızlı denge yaklaşımına geçişinde Cu^{2+} iyonlarının gösterdiği direnç olarak yorumlanabilir.

$30-60^\circ\text{C}$ arasındaki sıcaklıklarda Cu^{2+} iyonları içeren enzimin termal inaktivasyonunun aktivasyon serbest enerjisi, (ΔG_i), Cu^{2+} iyonlarını içermeyen enzime kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç Cu^{2+} iyonlarının enzimin termostabilizasyonuna katkı yaptığını göstermektedir. Diğer taraftan Cu^{2+} iyonları varlığında enzimin termal inaktivasyonunun entropi değişimi, (ΔS_i), Cu^{2+} iyonları

içermeyen enzime göre daha düşük bulunmuştur. Bu da Cu^{2+} iyonlarının enzim üzerindeki stabilizasyon etkisinin bir başka kanıtıdır. Enzime Cu^{2+} iyonları ilave edildikten sonra konformasyonel yapısı daha kararlı bir hal almış ve molekül içi düzensizlikleri azalmıştır [101].

Cu^{2+} iyonları yokluğunda ve varlığında gerçekleştirilen kazein hidrolizinin termodinamik verileri değerlendirildiğinde, Cu^{2+} iyonları varlığında 30-60°C arasındaki sıcaklık değerleri için hesaplanan substrat hidrolizinin serbest enerji değişimi, (ΔG^\ddagger), değerlerinin Cu^{2+} iyonları buldurmeyen enzimin serbest enerji değişimi göre daha düşük olduğu görülmüştür. Buna karşılık Cu^{2+} iyonu bulduran enzim çözeltisinin belirtilen sıcaklık değer aralığında geçiş hali bağlanma serbest enerjisi, (ΔG^\ddagger_{E-T}), değişimi Cu^{2+} iyonu buldurmeyen enzimin geçiş hali bağlanma serbest enerjisi değişimi değerlerine göre daha yüksek bulunmuştur. Cu^{2+} iyonları varlığında enzimin geçiş hali bağlanma enerjisinin serbest enziminkinden daha yüksek olması Cu^{2+} iyonları varlığında geçiş hali destabilizasyonundan kaynaklanan daha yüksek katalitik verimliliği gösterir [104, 105]. Diğer taraftan Cu^{2+} iyonları varlığında enzimin substrat bağlama serbest enerjisi, (ΔG^\ddagger_{E-S}), değerlerinin serbest enziminkinden dikkate değer bir şekilde daha düşük olması Cu^{2+} iyonu varlığında kazeinin enzimin aktif bölgesine hidrolizlenmeye daha uygun olacak şekilde bağlandığını gösterir [104].

30-60°C sıcaklık aralığında 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında alkalen proteaz enziminin kazein hidrolizinin Arrhenius aktivasyon enerjisi (E_a), serbest enzimin Arrhenius aktivasyon enerjisi değerinden daha yüksektir. Bu 60°C'a kadarki sıcaklıklarda enzimin Cu^{2+} iyonları ile stabilizasyonuna işaret eder. Kazein hidrolizi için 4 mM Cu^{2+} iyonları varlığında enzimin aktivasyon entalpisi (ΔH^\ddagger) ve entropisi (ΔS^\ddagger) ise belirtilen sıcaklık değerlerinde metal iyonu buldurmeyen enzimin aktivasyon entalpisi ve aktivasyon entropisi değerlerinden daha yüksek bulunmuştur. Aktivasyon entropisi, (ΔS^\ddagger), değerlerindeki farklılıklar Cu^{2+} iyonlarının enzimin konformasyonel yapısında değişikliğe neden olduğunu gösterir ki bu değişiklik enzimin stabilizasyonu ile sonuçlanmıştır [106].

5.8.2. 4 mM Cu²⁺ iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteaz enziminin otokatalitik hidrolizinin (otokatalitik inaktivasyonunun ya da otoproteolizinin) incelenmesi

Alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu²⁺ metal iyonları yokluğunda ve varlığında farklı sıcaklıklardaki otokatalitik hidrolizi çalışmasında enzimin otokatalitik hidrolizinin inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi, (E_{a,i}), değerleri sırasıyla 87.21 kJ mol⁻¹ ve 76.90 kJ mol⁻¹ olarak belirlenmiştir. Alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyon kinetiği çalışmasında ise enzimin metal iyonları yokluğunda ve varlığında termal inaktivasyonunun aktivasyon enerjisi, (E_{a,i}), değerleri sırasıyla 121.44 kJ mol⁻¹ ve 120.28 kJ mol⁻¹ olarak belirlenmiştir.

Otokatalitik hidrolizde enzim molekülünün kendisi enzim için substrat işlevi görmektedir. Farklı sıcaklıklarda inkübasyon sonucu kısmi denatürasyondan dolayı enzimin konformasyonel yapısı üzerinde olan değişiklikler aktivite ölçümü için substrat olarak ortama kazein ilave edildiğinde oluşan enzim-kazein kompleksinin daha karalı bir yapı oluşturması nedeniyle termal inaktivasyon için daha büyük Arrhenius aktivasyon enerji değerlerinin elde edilmesine neden olmuştur. Diğer taraftan Cu²⁺ iyonları içermeyen enzimin değişik sıcaklıklardaki termal inaktivasyon kinetiği çalışmalarında elde edilen yarı ömür değerleri ile aynı sıcaklıklardaki otokatalitik hidroliz yarı ömür değerlerinde birbirine yakın sonuçlar gözlenirken Cu²⁺ iyonları varlığında otokatalitik hidrolizin yarı ömür değerleri daha düşük gözlenmiştir. Bu Cu²⁺ iyonlarının otokatalitik hidrolizi de aktive etmesi ile açıklanabilir. Cu²⁺ iyonları varlığında enzimin optimum sıcaklığı olan 60°C'da otokatalitik yarılanma ömrü ile termal inaktivasyonun yarılanma ömrü birbirine çok yakın olmaktadır. Bu 60°C'da enzimin termal denatürasyona uğramasıyla otokatalitik hidroliz hızının da arttığının göstergesidir. Denatürasyonla birlikte üç boyutlu protein yapısının lineerleşmesi enzimin kendi kendini daha kolay hidrolizlemesine yol açmaktadır.

Jamdar ve Harikumar, [102], tavuk intestinal proteinlerinin otolitik hidrolizi üzerine artan sıcaklık değerlerinin etkisini incelemişler, artan sıcaklıkla birlikte proteinlerin inaktivasyonunun hızla arttığını yüksek sıcaklıklarda ise otolizin sıcaklık tarafından

bastırıldığını ve proteinlerin inaktivasyonunun otoliz nedeni ile değil yüksek sıcaklık nedeniyle gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Klomklo ve diğ., [39], endojen proteinazlar ile yaptıkları çalışmada 30°C'dan itibaren otolizin hızla arttığını 60°C'da en üst seviyeye ulaştığını daha yüksek sıcaklıklarda ise proteinazların sıcaklık nedeni ile hızlı bir şekilde inaktive olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgular bizim bulgularımızla uyumludur.

BÖLÜM 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Tez çalışmamız, TÜBİTAK-MAM-GMBE Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi laboratuvarı tarafından izole edilen ve tanımlanan zorunlu alkalifilik bir tür olan *Bacillus marmariensis* GMBE 72'den alkalen proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonunu kapsamaktadır.

Bacillus marmariensis GMBE 72 soyu tarafından alkalen proteaz üretimi aşlamayı takip eden 11. saatte logaritmik fazın başında başlamış hücre büyümesi uyum fazını (lag faz) takiben üstel olarak devam etmiş ve fermentasyon 32. saatin sonunda stasyoner (durgun) faza girmiştir. Enzim üretimi fermentasyonun 29. saatinden itibaren hızlanmaya başlamış ve 54. saatte stasyoner faza girmiştir.

Bacillus marmariensis GMBE 72 alkalen proteaz enzimi kültür üst sıvısından pH 6.5'da % 55 doygunlukta $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesiyle ayrılmış; daha sonra DEAE-selüloz anyon değiştirme kromatografisi uygulanarak 17 kat saflaştırılmıştır. Kromatografi kolonundan elüsyon 200 mM NaCl içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tamponu ile sağlanmıştır.

Bacillus marmariensis GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin karakterizasyonu çalışmasında enzim aktivitesi için optimum sıcaklık değeri Ca^{2+} ve Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda 60°C olarak belirlenmiş olup Ca^{2+} ve Cu^{2+} iyonları varlığı enzimin optimum sıcaklık değerinde bir kaymaya neden olmamıştır. Bu sonuç metal iyonlarının enzim aktivitesi için bir kofaktör olmadığını göstermiştir. Alkalen proteaz enziminin molekül ağırlığı sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile 24.26 kDa olarak belirlenmiş olup protein molekülü jelde tek band protein olarak gözlenmiştir. Enzimin sıcaklık stabilitesi incelendiğinde 2 saat ön inkübasyondan sonra 30°C 'da kararlı olduğu, 40 ve 50°C sıcaklıklarda

aktivitesinin sırasıyla % 16 ve 57'sini kaybettiği ve 60°C sıcaklıkta ise tamamı ile inaktive olduğu belirlenmiştir. Alkalen proteaz enzim aktivitesi için optimum pH değeri pH 11 olarak belirlenmiş olup enzim pH 8.0–11.5 aralığında 50 mM NaOH-glisin, pH:12-13 aralığında 200 mM NaOH-glisin tampon çözeltileri varlığında oda sıcaklığında 7 gün süre ile stabilitesini korumuştur. Serbest alkalen proteazın kazein hidrolizinin Arrhenius aktivasyon enerjisi, (E_a), 30-80°C'lar arasında 48.09 kJ mol⁻¹ (11.49 kcal mol⁻¹) olarak hesaplanmıştır.

Bacillus marmariensis GMBE 72 alkalen proteazının kinetik parametrelerinin belirlenmesinde 0.25–0.60 mg ml⁻¹ kazein konsantrasyon aralıklarında ve başlangıç hızı koşullarında çalışılmış enzimin K_m ve V_m değerleri sırasıyla 3.12 mg ml⁻¹ kazein, 1.60 µmol tirozin ml⁻¹ dak⁻¹ olarak belirlenmiştir. 6.0 mg ml⁻¹'nin üzerindeki kazein konsantrasyonlarında enzim üzerinde substrat inhibisyonu gözlenmiş ve substrat inhibisyon sabiti, (K_s), 14.45 mg ml⁻¹ bulunmuştur.

Bacillus marmariensis GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin substrat spesifitesi protein ve p-NA konjuge sentetik substratlara karşı belirlenmiştir. Enzim protein substratlarından kazein, süt tozu, hemoglobin, sığır serum albümini, jelatin ve keratin substratları varlığında kazein aktivitesi % 100 alındığında en yüksek bağıl aktiviteyi süt tozuna karşı göstermiş ve süt tozunu % 143.10'luk bağıl aktivite ile hidrolizlemiştir. Enzimin N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA, N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA, L-Leu-pNA ve Nα-benzoil-L-Arg-pNA (L-BAPNA) sentetik substratlarına karşı sırasıyla 49.31, 35.48, 16.44 ve 9.44 U mg⁻¹ spesifik aktivitesi belirlenmiş olup L-Leu-pNA ve Nα-benzoil-L-Arg-pNA (L-BAPNA) substratları enzim tarafından hidrolizlenmemiştir. Enzim tarafından hidrolizlenen sentetik substratların varlığında kinetik çalışmaları yapılmış enzimin substrat hidrolizinin K_m ve V_m değerleri belirlenmiştir. Buna göre; N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA için K_m ve V_m değerleri sırasıyla 1.47 µM ve 16.77 µmol pNA ml⁻¹ dak⁻¹, N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA için K_m ve V_m değerleri sırasıyla 1.61 µM ve 14.37 µmol pNA ml⁻¹ dak⁻¹, N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA için K_m ve V_m değerleri sırasıyla 4.30 µM ve 1.39 µmol pNA ml⁻¹ dak⁻¹, N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA için K_m ve V_m değerleri sırasıyla 10.32 µM ve 0.0077 µmol pNA ml⁻¹ dak⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Enzimin N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-

pNA, N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA, N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA substratları varlığında belirlenen k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri ise sırasıyla $4.66 \times 10^3 \text{ dak}^{-1}$ ve $389.96 \times 10^3 \text{ dak}^{-1}/\text{mg ml}^{-1}$, $3.99 \times 10^3 \text{ dak}^{-1}$ ve $304.71 \times 10^3 \text{ dak}^{-1}/\text{mg ml}^{-1}$, $6.49 \times 10^2 \text{ dak}^{-1}$ ve $18.60 \times 10^3 \text{ dak}^{-1}/\text{mg ml}^{-1}$, 3.614 dak^{-1} ve $3.29 \times 10^3 \text{ dak}^{-1}/\text{mg ml}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

Bacillus marmariensis GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi üzerine aktif bölge yönelimli inhibitörlerin geri dönüşümsüz inhibisyon etkisi incelendiğinde enzimin yalnız 4 mM PMSF varlığında 1 saat içinde komple inaktivasyonu gözlenmiş olup bu nedenle enzim bir serin alkalen proteaz olarak tanımlanmıştır.

5 ve 10 mM EDTA ilavesi enzim üzerinde bir inhibisyona neden olmamıştır. Bu da enzimin bir metaloproteaz olmadığını kanıtlar.

Bacillus marmariensis GMBE 72 alkalen proteazını Cu^{2+} iyonlarının aktive ve stabilize ettiği, sürfaktan materyaller olan Tween-20-80'lerin enzimi aktive ettiği, sodyumdodesil sülfat (SDS)'in ise 30°C 'da 1 saat inkübasyon sonunda zayıf bir inhibisyona neden olduğu belirlenmiştir.

Tween-20 varlığında enzim üzerinde gözlenen aktivasyon etkisi nedeni ile enzimin Tween-20 varlığında da kazein hidrolizinin kinetik parametreleri de belirlenmiştir. 30°C ve pH 10.5'da % 2 Tween-20 varlığında kazein hidrolizinin K_m ve V_m değerleri sırasıyla 1.25 mg ml^{-1} ve $1.83 \text{ } \mu\text{mol tirozin ml}^{-1} \text{ dak}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir. Enzimin Tween-20 varlığındaki termal inaktivasyon kinetiği incelenmiş buna göre % 2 Tween-20 varlığında enzimin termal inaktivasyonunun birinci mertebeye inaktivasyon kinetiğine uyduğu ve enzimin termal stabilitesinin 1.5-2.0 kat arttığı gözlenmiştir.

Enzimin Tween-20 varlığında termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi ($E_{a,i}$) değeri 115.94 kJ/mol ($27.70 \text{ kcal mol}^{-1}$) olarak hesaplanmıştır.

Bacillus marmariensis GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin % 5 ve % 10 hidrojen peroksit varlığında 30°C 'da 75 dakika inkübasyonu sonucunda

sırasıyla % 37 ve % 73 oranında aktivite kaybına uğradığı gözlenirken % 5 hidrojen peroksit varlığında 40 °C’da aynı inkübasyon süresinde % 46 oranında aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir.

Bacillus marmariensis GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin Cu^{2+} iyonları yokluğunda ve varlığında termal inaktivasyon kinetiği çalışılmış enzimin Cu^{2+} iyonları yokluğunda ve varlığında termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi, ($E_{a,i}$), değerleri sırasıyla $121.44 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($29.01 \text{ kcal mol}^{-1}$) ve 120.28 kJ/mol ($28.74 \text{ kcal mol}^{-1}$) olarak belirlenmiştir.

Enzimin Cu^{2+} iyonları yokluğunda ve varlığında termal inaktivasyonunun birinci merteye inaktivasyon kinetiğine uyduğu tespit edilmiştir. Cu^{2+} iyonları yokluğunda enzimin yarı ömür değerleri 30, 40, 45, 50, 55 ve 60°C için sırasıyla 2310, 385, 154, 97.60, 63.57 ve 2.19 dakika Cu^{2+} iyonları varlığında enzimin yarı ömür değerleri 3465, 630, 315, 247.5, 75.32 ve 2.63 dakika olarak belirlenmiştir. 30, 40, 45, 50 ve 55°C’de Cu^{2+} iyonları varlığında enzimin termostabilitesindeki artışlar sırasıyla % 67, % 61, % 48, % 39 ve % 40 olarak belirlenmiştir. Cu^{2+} iyonları yokluğunda ve varlığında 60°C’da yarılanma ömrü değerlerinin hızla azalarak sırasıyla 2.19 ve 2.2 dakikaya inmesi enzimimizin 60°C’da 5 dakikanın üzerindeki inkübasyon sürelerinde komple inaktive olduğunu göstermiştir.

Cu^{2+} iyonları yokluğunda 30, 40, 45, 50, 52.5, 55, 57.5, 60, 62.5 ve 65°C, Cu^{2+} iyonları varlığında 30, 40, 45, 50, 52.5, 55, 57.5, 60, 62.5 ve 65°C sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilen kazein hidrolizinin kinetik parametreleri (K_m , V_m) karşılaştırıldığında metal iyonları varlığında elde edilen K_m değerlerinin daha düşük, k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin ise daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar metal iyonları varlığında enzimin substrata olan afinitesinin ve katalitik performansının arttığını göstermektedir. Cu^{2+} iyonları yokluğunda 30–60°C aralığında, metal iyonları varlığında 30–50°C aralığında artan sıcaklık değerleri ile birlikte enzimin K_m değerinin değişmediği fakat k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin arttığı gözlenmiştir. Cu^{2+} iyonları yokluğunda ve varlığında sırasıyla 60 ve 50°C’ın üzerinde K_m değerleri azalırken k_{cat} değerlerinin de azalması K_m değerindeki azalmanın substrat afinitesinde artış olarak yorumlanmasının doğru olmadığı K_m değerindeki azalmaya

V_m değerindeki azalmanında eşlik ettiği belirlenmiştir. Artan sıcaklık değerlerine karşılık görünen K_m değerlerindeki bu düşüş sıcaklığın hız sabitleri üzerindeki etkisi göz önüne alınarak incelenmiş Cu^{2+} iyonları yokluğunda $60^\circ C$, Cu^{2+} iyonları varlığında $50^\circ C$ 'dan sonra enzim substrat etkileşiminin steady-state (yatışkın hal) kinetikten uzaklaşıp hızlı denge kinetiğine döndüğü ($K_m=K_s$) sonucuna varılmıştır.

Bacillus marmariensis GMBE 72 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enziminin 4 mM Cu^{2+} metal iyonları yokluğunda ve varlığında farklı sıcaklıklardaki otokatalitik hidrolizi çalışmasında enzimin otokatalitik hidrolizinin inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi, ($E_{a,i}$), değerleri sırasıyla $87.21 \text{ kJ mol}^{-1}$ ve $76.90 \text{ kJ mol}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyon kinetiği çalışmasında ise enzimin metal iyonları yokluğunda ve varlığında termal inaktivasyonunun aktivasyon enerjisi, ($E_{a,i}$), değerleri sırasıyla $121.44 \text{ kJ mol}^{-1}$ ve $120.28 \text{ kJ mol}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

Deterjan formülasyonlarında kullanılan enzimlerden var olan beklentiler dikkate alındığında *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazı sahip olduğu optimum pH değeri ile ticari proteazlarından daha yüksek bir pH optimumuna sahip olması, yıkama sıcaklıklarında subtilizin Carlsberg ve subtilizin BPN gibi ticari proteazlardan daha yüksek bir termostabiliteye sahip olması, aktivite gösterebilmek için bir kofaktöre ihtiyaç duymaması, hemoglobine karşı yüksek sayılabilecek bir bağlıl aktivitesinin olması nedeniyle kan lekelerinin uzaklaştırılmasında da kullanılabilmesi, non-iyonik srfaktanlara karşı gösterdiği yüksek stabilite ve literatürde az sayıda karşılaşılan SDS stabilitesi yüksek enzimlerden biri olması gibi sebeplerden dolayı uygun bir ticari deterjan enzimi olarak değerlendirilmesi düşünülebilir.

6.2. neriler

Tez alışmamızda yapılan karakterizasyon alışmaları *Bacillus marmariensis* GMBE 72 alkalen proteazının iyi bir deterjan proteazı olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir. İleriye yönelik çalışmalar düşünüldüğünde; enzimin doğal formunda sahip olduğu termal stabilite, SDS stabilitesi, yüzey aktif ajanlar varlığında gözlenen

aktivasyonu, kofaktör ihtiyacı göstermemesi gibi özellikleri dikkate alınarak bu özelliklerinin geliştirilmesine yönelik çalışmaların yapılmasının gerekliliği düşünülebilir. Bu amaçla aşağıda belirtilen çalışmalar gerçekleştirilebilir;

Enzimin yüksek sıcaklıklara, yüksek pH değerlerine karşı stabilizasyonunun artırılması,

Kimyasal modifikasyonlar ile enzimin stabilitesinde ve katalitik performansında olan değişikliklerin belirlenmesi,

Suyla karışabilen organik çözücüler varlığında enzimin katalitik davranışının belirlenmesi,

Enzimin peptid sentezlerinde kullanılabilirliğinin incelenmesi,

pH bağımlılık kinetiğinin incelenmesi.

KAYNAKLAR

- [1] Whitford, D., "Proteins, Structure and Function", *John Wiley & Sons, Ltd*, 188-245, (2005).
- [2] John, F.K., "Enzyme Technology" (H.J. REHM., G. REED editör), *Biotechnology*, Vol 7A, 37-62, (1987)
- [3] Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., "Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 597-635, (1998).
- [4] Kirk, O., Borchert T. V., Fuglsang C. C., "Industrial Enzyme Applications", *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 345-351, (2002).
- [5] Walsh, G., "Proteins Biochemistry and Biotechnology" *John Wiley and Sons, Ltd.*, 420-422, (2002).
- [6] Bugg, T., "An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry", *Blackwell Science*, 657-689, (1996).
- [7] Anwar, A., Saleemuddin, M., "Alkaline Proteases: A Review", *Bioresource Technology*, 64, 175-183, (1998).
- [8] Singh, J., Vohra, R.M., Sahoo, D.K., "Purification and Characterization of Two Extracellular Alkaline Protease from a Newly Isolated Obligate Alkalophilic *Bacillus sphaericus*", *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 26, 387-393, (2001).
- [9] Singh, J., Batra, N., Sobti, R. C., "Serine Alkaline Protease From Newly Isolated *Bacillus sp* SSR 1", *Process Biochemistry*, 36, 781-785, (2001).
- [9] Wiseman, A., "The Application of Enzymes in Industry", *Handbook of Enzyme Biotechnology*, Second Edition, Chapter 3, 274-373, (1987).
- [10] Denizci, A.A., Kazan, D., Abeln, E.C.A., Erarslan, A., "Newly Isolated *Bacillus clausii* GMBAE 42: an Alkaline Protease Producer Capable to Grow Under Higly Alkaline Conditions", *Journal of Applied Microbiology*, 96, 320-327, (2004).
- [11] Maurer, Karl-Heinz, "Detergent Proteases", *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 330-334, (2004).

- [12] Aoki, K., Miyamoto, K., Murakami, S., Shinke, R., “Anaerobic Synthesis of Extracellular Proteases by The Soil Bacterium *Bacillus* sp. AM-23: Purification and Characterization of The Enzymes”, *Soil Biology and Biochemistry*, 27, 11, 1377-1382, (1995).
- [13] Khaparde, S. S., Singhal R. S., “ Chemically Modified Papain for Applications in Detergent Formulations”, *Bioresource Technology*, 78, 1-4, (2001).
- [14] Serin proteases [online], http://www.sb.fsu.edu/~chapman/Classes/Bch5505/Content/serine_proteases.ppt#259,4, Serine Proteases differ in their Specificity, (Ziyaret Tarihi: 21 Ekim 2008).
- [15] Dodson, G., Wlodawer, A., “Catalytic Triads and Their Relatives”, *TIBS* 23, September 1998, 347-352, (1998).
- [16] Chemical structure of chymotrypsin [online], <http://chemical-quantum-images.blogspot.com/2007/02/chymotrypsin.html>, (Ziyaret Tarihi: 21 Ekim 2008).
- [17] Active side residues in chymotripsin [online], <http://www.bio.mtu.edu/campbell/401lec16all.pdf>, (Ziyaret Tarihi: 21 Ekim 2008).
- [18] Voet D., Voet J.G., “Biochemistry”, Third Edition, *John Wiley & Sons, Ltd*, 522-523, (2004).
- [19] chemical structure of HIV-1 proteases [online], http://en.wikipedia.org/wiki/Image:HIV_protease_1KJF.png, (Ziyaret Tarihi: 21 Ekim 2008).
- [20] Papain [online], <http://en.wikipedia.org/wiki/Papain>, (Ziyaret Tarihi: 21 Ekim 2008).
- [21] Metzler D. E., “Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells” Vol 1, *Harcourt Academic Press*, 625-627, (2001).
- [22] Thermolysin [online], <http://www.proteopedia.org/wiki/images/e/ee/8tln.png> , (Ziyaret Tarihi: 21 Ekim 2008).
- [23] Gupta, R., Beg, Q. K., Lorenz, P., “Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Applications”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 15-32, (2002).
- [24] Hood, E. E., “From Green Plants to Industrial Enzymes”, *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 279-283, (2002).
- [25] Khaparde, S. S., Singhal R. S., “ Chemically Modified Papain for Applications in Detergent Formulations”, *Bioresource Technology*, 78, 1-4, (2001).

- [26] Bromelain - <http://www.herbaextractsplus.com/bromelain.cfm?gclid=CK-a8sK0uJYCFQWB1AodXFikKw> , (Ziyaret Tarihi: 21 Ekim 2008).
- [27] Bromelain – Ananas [online], <http://www.bitkisel-tedavi.com/bromelain>, (Ziyaret Tarihi: 15 Ağustos 2007).
- [28] Immobilized ficin, [online], <http://www.piercenet.com/Products/Browse.cfm?fldID=7FC18EC5-57E3-4565-9DCD>, (Ziyaret Tarihi: 15 Ağustos 2007).
- [29] Kumar, C.G., Takagi, H., “Microbial Alkaline Proteases: From a Bioindustrial Viewpoint”, *Biotechnology Advances*, 17, 561-594, (1999).
- [30] Jonsson, A., Martin, S. M., “Protease production by *Aspergillus fumigatus*”, *Agricultural Biological Chemistry*, 28, 734-738, (1965).
- [31] Banerjee, R., Bhattacharyya, B. C., “Kinetic Properties of Extracellular Alkaline Proteases of *Rhizopus oryzae*”, *Journal of Fermentation Bioengineering*, 75, 380-382, (1993).
- [32] Moreira, K.A., Albuquerque, B.F., Teixeira, M.F.S., Porto, A.L.F., Lima, F.J.L., “Application of Protease from *Nocardiopsis* sp. as a Laundry Detergent Additive”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol.18, pp.309-315, (2002).
- [33] Grufferty, M.B. and Fox, P.F., “Milk Alkaline Proteinase: A Review.”, *Journal Dairy Research*, 55, 609-630, (1988).
- [34] Bastian, E.D. and Brown, R.J., “Plasmin in Milk and Dairy Products: an Update”, *International Dairy Journal*, 6, 435-457, (1996).
- [35] Segel, J.H., “Enzyme Kinetics”, *John Wiley and Sons*, New York, 926-941, (1975).
- [36] Erarslan, A., Koçer, H., “Thermal Inactivation Kinetics of Penicilin G acylase Obtained from a Mutant Derivative of *Escherichia coli* ATTC 11105”, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 55-79, (1992).
- [37] Rashid, M. H., Siddiqui, K. S., “Thermodynamic and Kinetic Study of Stability of the Native and Chemically Modified β -glucosidases from *Aspergillus niger*”, *Process Biochemistry*, 33, No:2, 109-115, (1998).
- [38] Erarslan, A.A., “Enzim Kinetiği Notları”, *TÜBİTAK-GMBAE*, 69-71, (2004).
- [39] Klomklao S., Kishimura H., Benjakul S., “Endogenous proteinases in true sardine (*Sardinops melanostictus*)”, *Food Chemistry*, 107, 213-220, (2008).
- [40] Bayazıt, M., Oğuz, B., “Mühendisler İçin İstatistik”, *Birsen Yayınevi*, (1998).

- [41] Kazan, D., Denizci, A.A., Öner, K.M.N., Erarslan, A., “Purification and Characterization of a Serin Alkaline Protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42”, ***Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology***, 32, 335-344, (2005).
- [42] Takami, H., Akiba, T. and Horikoshi, K., “Production of Extremely Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus* sp. No. AH-101”, ***Applied Microbiology and Biotechnology***, 30, 120-124, (1989).
- [43] Sedmak, J.J., Grossberg, S.E., “A Rapid, Sensitive and Versatile Assay for Protein Using Comassie Brilliant Blue G250”, ***Analytical Biochemistry***, 79, 544-552, (1977).
- [44] Spector, T., “Refinement of The Coomassie Blue Method of Protein Quantitation”, ***Analytical Biochemistry***, 86, 142-146, (1978).
- [45] Laemmli, U. K., “Cleavage of Structural Proteins During Assembly of the Head of Bacteriophage T4”, ***Nature***, 227, 680-685, (1970).
- [46] Damerval, C., Guilloux M., Blaisonneau, J., Vienne, D., “A simplification of Heukeshoven and Dernick's silver staining of proteins”, ***Electrophoresis***, 8, 158-159, (1987).
- [47] Bakhtiar, S., Estiveira R. J., Hatti-Kaul, R., “ Substrate Specificity of Alkaline Protease From Alkaliphilic Feather-Degrading *Nesterenkonia* sp. AL20”, ***Enzyme and Microbial Technology***, 37, 534-540, (2005).
- [48] Sana, B., Ghosh, D., Saha, M., Mukherjee, J., “Purification and Characterization of a Salt, Solvent, Detergent and Bleach Tolerant Protease From a New gamma-Protobacterium Isolated From The Marine Environment of The *Sundarbans*”, ***Process Biochemistry***, 41, 208-215, (2006).
- [49] Kumar, C.G., “Purification and Characterization of a Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus pumilus*”, ***Letters in Applied Microbiology***, 34, 13-17, (2002).
- [50] Mohamed, S.A., Fahmy, A. S., Mohamed, T. M., Hamdy, S. M., “ Proteases in Egg, Miracidium and Adult of *Fasciola gigantica*. Characterization of Serine and Cystein Proteases from Adult” ***Comperative Biochemistry and Physiology***, Part B 142, 192-200, (2005).
- [51] Bayouhd, A., Gharsallah, N., Chamkka, M., Dhouib, A., Ammar, S., Nasri, M., “Purification and Characterization of an Alkaline Protease From *Pseudomonas aeruginosa* MN1”, ***Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology***, 24, 291-295, (2000).
- [52] Hutadilok-Towatana, N., Painupong, A., Suntainalert, P., “ Purification and Characterization of an Extracellular Protease from Alkaliphilic and Thermophilic *Bacillus* sp. PS719”, ***Journal of Bioscience and Bioengineering***, 87, No. 5, 581-587, (1999).

- [53] Gessesse, A., Hatti-Kaul, R., Gashe, B. A., Mattiasson, B., “ Novel Alkaline Proteases from Alkaliphilic Bacteria Grown on Chicken Feather”, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 519-524, (2003).
- [54] Joo, H. S., Chang, C. S., “ Oxidant and SDS-stable Alkaline Protease from a Halo-Tolerant *Bacillus clausii* I-52: Enhanced Production and Simple Purification”, *Journal of Applied Microbiology*, 98, 491-497, (2005).
- [55] Kobayashi, T., Hakamada Y., Hitomi, J., Koike, K., Ito, S., “ Purification of Alkaline Proteases from a *Bacillus* Strain and Their Possible Interrelationship”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 63-71, (1996).
- [56] Beg, Q. K., Gupta, R., “ Purification and Characterization of an Oxidation-stable, Thiol-dependent Serine Alkaline Protease from *Bacillus mojavenensis*”, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 294-304, (2003).
- [57] Singh, J., Vohra, R.M., Sahoo D. K., “Alkaline Protease from a New Obligate Alkaliphilic Isolate of *Bacillus sphaericus*”, *Biotechnology Letters*, 21, 921-924, (1999).
- [58] Ghorbel, B., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M., “ Stability Studies of Protease from *Bacillus cereus* BG1”, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 513-518, (2003).
- [59] Saeki, K., Hitomi, J., Okuda M., Hatada, Y., Kageyama, Y., Takaiwa, M., Kubota H., Hagihara, H., Kobayashi, T., Kawai S., Ito, S., “ A Novel Species of Alkaliphilic *Bacillus* That Produces an Oxidatively Stable Alkaline Serin Protease”, *Extremophiles*, 6, 65-72, (2002).
- [60] Fujiwara, N., Masui, A., Imanaka, T., “Purification and Properties of the Highly Thermostable Alkaline Protease from an Alkaliphilic and Thermophilic *Bacillus* sp.”, *Journal of Biotechnology*, 30, 245-256, (1993).
- [61] Hadj-Ali, N., Agrebi, R., Ghorbel-Frikha, B., Sellami-Kamoun, A., Kanoun S., Nasri, M., “ 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, (2007).
- [62] Patel, R. K., Dodia, M. S., Joshi, R. H., Singh, S. P., “ Purification and Characterization of Alkaline Protease from a Newly Isolated Haloalkaliphilic *Bacillus* sp.”, *Process Biochemistry*, 41, 2002-2009, (2006).
- [63] Kobayashi, T., Hakamada Y., Adachi, J., Hitomi, J., Yoshimatsu, K., Koike, K., Kawai, S., Ito, S., “ Purification and Properties of an Alkaline Proteases from Alkaliphilic *Bacillus* sp. KSM-K16”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 473-481, (1995).

- [64] Rahman, R. N. Z., Razak, C. N., Ampon, K., Basri, M., Yunus W. M. Z. W., Salleh, A. B., “ Purification and Characterization of Heat-stable Alkaline Protease From *Bacillus stearothermophilus* F1”, ***Applied Microbiology and Biotechnology***, 40, 822-827, (1994).
- [65] Yamagata, Y., Isshiki K. , Ichishima E., “ Subtilisin Sendai from Alkalophilic *Bacillus* sp.: Molecular and Enzymatic Properties of Enzyme and Molecular Cloning and Characterization of the Gene, *aprS*”, ***Enzyme and Microbial Technology***, 17, 653-663, (1995).
- [66] Ferrero, M. A., Castro G. R., Abate, C. M., Bagion, M. D., Simeriz, F., “ Thermostable Alkaline Protease of *Bacillus licheniformis* MIR29: Isolation, Production and Characterization”, ***Applied Microbiology and Biotechnology***, 45-327-332, (1996).
- [67] Huang, Q., Peng, Y., Li, X., Wang, H., Zhang, Y., “Purification and Characterization of an Alkaline Serin Protease from Dehairing Function from *Bacillus pumilis*”, ***Current Microbiology***, 46, 169-173, (2003).
- [68] Yang, J., Shih, I., Tzeng, Y., Wang, S., “Production and Purification of Protease from a *Bacillus subtilis* That Can Deproteinize Crustacean Wastes”, ***Enzyme and Microbial Technology***, 26, 406-413, (2000).
- [69] Banerjee, U. C., Sani, R. K., Azmi, W., Soni R., “Thermostable Alkaline Protease From *Bacillus brevis* and Its Characterization as a Laundry Detergent Additive”, ***Process Biochemistry***, 35, 213-219,(1999).
- [70] Joo, H., Kumar, C. G., Park, G., Paik, S. R., Chang, C., “Optimization of the Production of an Extracellular Alkaline Protease from *Bacillus horikoshii*”, ***Process Biochemistry***, 38, 155-159, (2002).
- [71] Sellami-Kamoun, A., Haddar, A., Ali, N. E., Ghorbel-Frikha, B., Kanoun, S., Nasri, M., “ Stability of Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in Commercial Solid Laundry Detergent Formulations”, ***Microbiological Research***, 163, 299-306, (2008).
- [72] Haddar A., Bougatef A., Agrebi R., Sellami-Kamoun A., Nasri, M., “ A Novel Surfactant-Stable Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and Characterization”, ***Process Biochemistry***, in press, Accepted date: (9.9.2008).
- [73] Joo, H., Koo, Y., Choi, J., Chang, C., “ Stabilization Method of an Alkaline Protease From Inactivation by Heat, SDS and Hydrogen Peroxide”, ***Enzyme and Microbial Technology***, 36, 766-772, (2005).
- [74] Jaoudai B., Ellouz-Chaabouni, S., Rhimi, M., Bejar, S., “ Biochemical and Molecular Characterization of a Detergent-Stable Serine Alkaline Protease from *Bacillus pumilus* CBS With High Catalytic Efficiency”, ***Biochimie***, 90, 1291-1305, (2008).

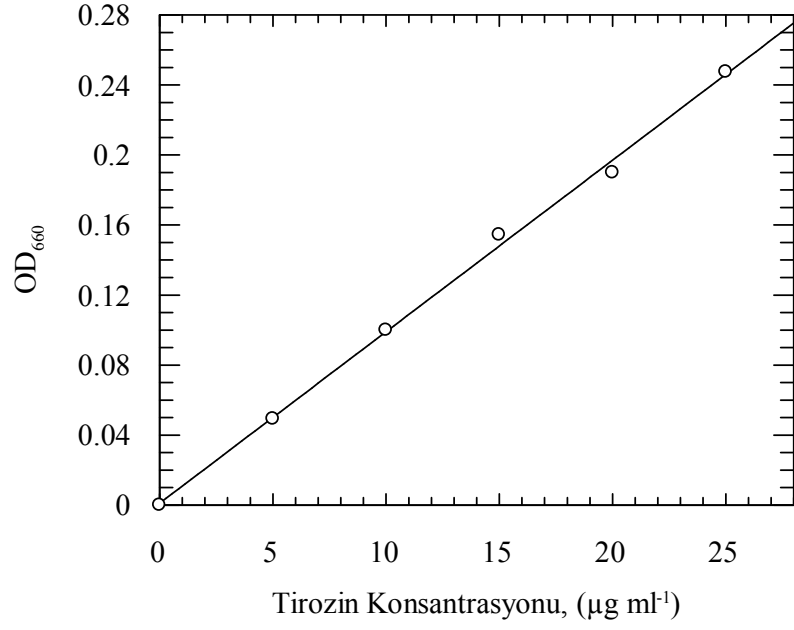
- [75] Yossan, S., Reungsang, A., Yasuda, M., “ purification and Characterization of Alkaline Protease From *Bacillus megaterium* Isolated From Thai Fish Sauce Fermentation Process”, ***Science Asia***, 32, 377-383, (2006).
- [76] Dhandapani, R., Vijayaragavan, R., “Production of a Thermophilic Extracellular Alkaline Protease by a *Bacillus stearothermophilus* AP-4”, ***World Journal of Microbiology and Biotechnology***, 10, 33-35, (1994).
- [77] Enzimler [online], <http://tip.cumhuriyet.edu.tr/cutf/Donem1/DonemI20042005/IIKenancelik/enz2.ppt#280,31,ENZİM AKTİF MERKEZİ>, (Ziyaret tarihi: 21 Ekim 2008).
- [78] Kumar, C. G., Tiwari, M. P., Jany, K. D., “ Novel Alkaline Serine Proteases From Alkalophilic *Bacillus* spp.: Purification and Some Properties”, ***Process Biochemistry***, 34, 441-449, (1999).
- [79] Joo, H., Chang, C., “ Production of Protease From a New Alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 Grown on Soybean Meal: Optimization and Some Properties”, ***Process Biochemistry***, 40, 1263-1270, (2005).
- [80] Joo, H., Kumar, C. G., Park, G., Paik, S. R., Chang, C., “Bleach-Resistant Alkaline Protease Produced by a *Bacillus* sp. Isolated From The Korean Polychaete, *Periserrula leucophryna*”, ***Process Biochemistry***, 39, 1441-1447, (2004).
- [81] Saeki, K., Okuda, M., Hatada, Y., Kobayashi, T., Ito, S., Takami, H., Horikoshi, K., “Novel Oxidatively Stable Subtilisin-like Serine Protease From Alkaliphilic *Bacillus* spp. : Enzymatic Properties, Sequences and Evolutionary Relationships”, ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, 279, 313-319, (2000).
- [82] Bhaskar, N., Sudeepa, E. S., Rashmi, H. N., Tamil Selvi, A., “Partial Purification and Characterization of Protease of *Bacillus proteolyticus* CFR 3001 Isolated From Fish Processing Waste and Its Antibacterial Activities”, ***Bioresource Technology***, 98, 2758-2764, (2007).
- [83] Dabonné, S., Moallic, C., Sine, J., Niamké, S., Dion, M., Colas, B., “ Cloning, Expression and Characterization of a 46.5-kDa Metallopeptidase From *Bacillus halodurans* H4 Sharing Properties With The Pitrilysin Family”, ***Biochimica et Biophysica Acta***, 1725, 136-143, (2005).
- [84] Genckal, H., Tari, C., “ Alkaline Protease Production From Alkalophilic *Bacillus* sp. Isolated From Natural Habitats”, ***Enzyme and Microbial Technology***, 39, 703-710, (2006).
- [85] Oberoi, R., Beg, Q. K., Puri, S., Saxena, R. K., Gupta, R., “Characterization and Wash Performance Analysis of an SDS-stable Alkaline Protease From a *Bacillus* sp.”, ***World Journal of Microbiology and Biotechnology***, 17, 493-497, (2001).

- [86] Jasvir, S., Navdeep, G., Devasahayam, G., Sahoo, D. K., “Studies on Alkaline Protease Produced by *Bacillus* sp. NG312”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 76, 57-63, (1999).
- [87] Johnvesly, B., Naik, G. R., “Studies on Production of Thermostable Alkaline Protease From Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a Chemically Defined Medium”, *Process Biochemistry*, 37, 139-144, (2001).
- [88] Joo, H. S., Kumar, C. G., Park, G. C., Paik, S. R., Chang, C. S., “Oxidant and SDS-stable Alkaline Protease from *Bacillus clausii* I-52: Production and Some Properties”, *Journal of Applied Microbiology*, 95, 267-272, (2003).
- [89] Beg, Q. K., Saxena, R. K., Gupta, R., “Kinetic Constants Determination for an Alkaline Protease From *Bacillus mojavensis* Using Response Surface Methodology”, *Biotechnology and Bioengineering*, 78, 289-295, (2002).
- [90] Zhang, Z., He, Z., Guan, G., “Thermal Stability and Thermodynamic Analysis of Native and Methoxypolyethylen Glycol Modified Trypsin”, *Biotechnology Techniques*, 13, 781-786, (1999).
- [91] Ikegaya, K., Sugio, S., Murakami, K., Yamanouchi, K., “Kinetic Analysis of Enhanced Thermal Stability of an Alkaline Protease With Engineered Twin Disulfide Bridges and Calcium-Dependent Stability”, *Biotechnology and Bioengineering*, 81, 187-192, (2003).
- [92] Veltman, O. R., Vriend, G., Burg, B., Hardy, F., Venema, G., Eijssink, V. G. H., “Engineering Thermolysin-like Proteases Whose Stability is Largely Independent of Calcium”, *FEBS Letters*, 405, 241-244, (1997).
- [93] Segel, I.H., “Biochemical Calculations”, 2nd Edition, *John Wiley and Sons*, New York, 200-205, (1975).
- [94] Alam, S. I., Dube, S., Reddy, G. S. N., Bhattacharya, B. K., Shivaji, s., Singh, L., “Purification and Characterization of Extracellular Protease Produced by *Clostridium* sp. From Schirmacher oasis, Antarctica”, *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 824-831, (2005).
- [95] Shi-yong, G., Yu-bin, J., Xiang, Z., Chen-feng, J., “Calculation of the Effect of Solanine on the Michaelis Constant and the Maximum Reaction Rate of NAT”, *Nation Nature Science Fund.*, 1260-1263, (1978).
- [96] Hug, D. H., Hunter, J. K., “Effect of Temperature on Histidine Ammonia-Lyase From a Psychrophile, *Pseudomonas putida*”, *Journal of Bacteriology*, 119, 92-97, (1974).
- [97] Jones, R. D., Morita, R. Y., “Low-temperature Growth and Whole-cell Kinetics of a Marine Ammonium Oxidizer”, *Marine Ecology*, 21, 239-243, (1985).

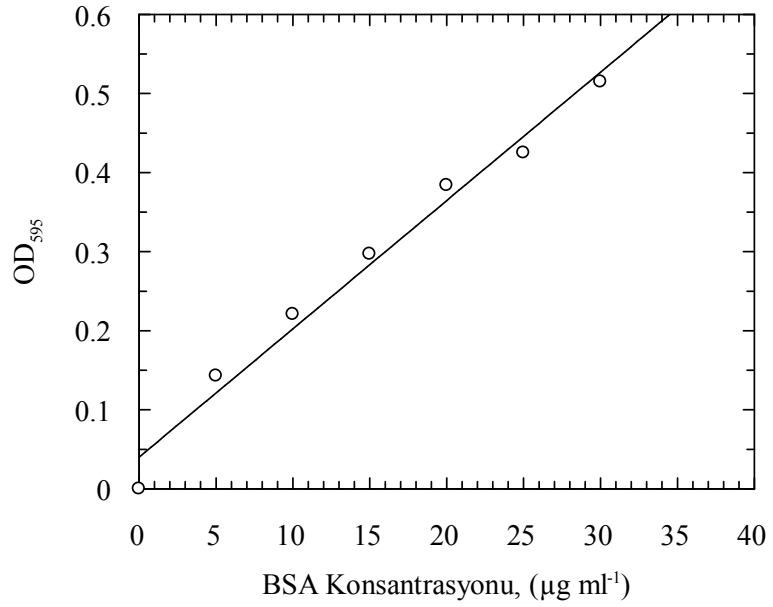
- [98] Wu, B., Wang, L., Gao, P., “The Combined Effect of Temperature and Assay Time on the Catalytic Ability and Stability of 1,4- β -D-glucan Cellobiohydrolase I”, *Enzyme and Microbial Technology*, 43, 237-244, (2008).
- [99] Snoke, J. E., Neurath, H., “The Effect of Temperature on the Esterase Activity of Chymotrypsin”, *The Journal of Biological Chemistry*, 577-584, (1949).
- [100] Turner, L. B., Pollock, C. J., “The Effects of Temperature and pH on the Apparent Michaelis Constant of Glutathione Reductase From Maize (*Zea mays* L.)”, *Plant, Cell and Environment*, 16, 289-295, (1993).
- [101] Solomons, T. W. G., Fryhle, C. B., “Organic Chemistry”, 9th Edition, *John Wiley and Sons*, New York, 111-112, (2008).
- [102] Jamdar, S. N., Harikumar, P., “Autolytic Degradation of Chicken Intestinal Proteins”, *Bioresource Technology*, 96, 1276-1284, (2005).
- [103] Joo, H., Chang, C., “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 and Microbial Technology*, 38, 176-183, (2006).
- [104] Coşkuner Öztürk, D., Kazan, D., Erarslan, A., “Stabilization and Functional Properties of *Escherichia coli* Penicillin G Acylase by Covalent Conjugation Of Anionic Polysaccharide Carboxymethylcellulose”, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 18, 881-888, (2002).
- [105] Lienhard, G. E., “Enzymatic Catalysis and Transition State Theory”, *Science*, 180, 149-154, (1973).
- [106] Rashid, M. H., Siddiqui, K. S., “Thermodynamic and Kinetic Study of Stability of the Native and Chemically Modified β -glucosidases from *Aspergillus niger*”, *Process Biochemistry*, 33, No:2, 109-115, (1998).

EKLER

Ek A. Alkale Proteaz Aktivitesi ve Protein Miktarı Tayini İçin Standart Grafikleri



Şekil A.1: Tirozin standart doğrusu ($r = 0.9989$)



Şekil A.2: Protein standart doğrusu ($r = 0.9905$)



Confirmation of the availability of a strain for the purpose of valid publication of a new name according to the Bacteriological Code

The following information is confidential and serves only to allow the International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology to confirm that a strain has been deposited and will be available from the DSMZ in accordance with the Rules of the Bacteriological Code (1990 revision) as revised by the ICSP at the plenary sessions in Sydney and Paris.

Strain ***Bacillus marmariensis*** (GMBE72) has been deposited in the DSMZ under the number

DSM 21297

This strain is available in the publicly accessible section of the DSMZ and restrictions have not been placed on access to information concerning the presence of this strain in the DSMZ. It will be included in published and online catalogues after publication of this number by the authors

This strain has been checked for viability in the DSMZ and is stored using one of the standard methods used in the DSMZ

The depositor of this strain has also carried out a “depositor’s check” and confirmed the identity of the strain held under this DSM number

Dr. R. Pukall
DSMZ



JAPAN COLLECTION OF MICROORGANISMS

Microbe Division, RIKEN BioResource Center
2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan

Phone : +81-48-467-9560
Fax : +81-48-462-4617
E-mail : inquiry@jcm.riken.jp

November 11, 2008

Dr. Aziz Akın Denizci
TUBiTAK-MAM-GMBE
Microbial Biotechnology Group
PO Box 21, 41470, Gebze-Kocaeli
Turkey

Dear Dr. Denizci,

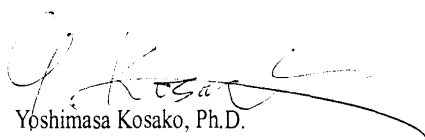
The microorganism that you deposited has been accessioned with the following JCM number:

JCM 15719 *Bacillus marmariensis* A. A. Denizci GMBE72

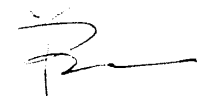
When you make contact with JCM on this matter, please refer to the JCM number.

Thank you very much for your cooperation.

Yours sincerely,



Yoshimasa Kosako, Ph.D.
Curator (Bacteria)



Yoshimi Benno, D.V.M., Ph.D.
Head of the Microbe Division/
Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BRC

Ek B. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

B 1: Enzim Üretim Ortamında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

10 gr nişasta, 5 gr pepton, 5 gr yeast ekstrakt, 1 gr K_2HPO_4 ve 0.2 gr $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ fermentasyon ortamı ve sesquik tampon çözeltisi (4.2 gr $NaHCO_3$ ve 5.3 gr Na_2CO_3) bir miktar distile suda çözülerek çözelti hacmi sırasıyla 900 ml ve 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan her iki çözeltide ayrı ayrı steril edilmişlerdir (20 dak., $121^\circ C$, 1.7 bar). Sterilizasyon sonunda 100 ml sesquik tampon çözeltisi fermentasyon ortamına ilave edilerek ortam pH'sı 9.7'ye ortam hacmi 1000 ml'ye ayarlanmıştır.

B 2: Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

% 0.6 (w/v)'lık kazein çözeltisi: 0.6 gr kazein 100 ml 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisinde çözülerek hazırlanmıştır.

TCA (Trikloroasetik asit) çözeltisi: 0.11 M TCA (17.97 gr l^{-1}), 0.22 M $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ (29.9 gr l^{-1}) ve 0.33 M CH_3COOH (19.81 ml l^{-1}) olacak şekilde tüm bileşenler bir miktar distile suda çözülerek çözelti hacmi 1 l'ye tamamlanmıştır.

0.5 M Na_2CO_3 çözeltisi: 52.995 gr sodyum karbonat bir miktar distile suda çözülerek çözelti hacmi 1 l'ye tamamlanmıştır.

Folin-Ciocalteu Ayırıcı: Folin reaktifi $\frac{1}{2}$ oranında distile su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi: 50 mM glisin (3.7535 gr l^{-1}) ve 50 mM NaOH (2 gr l^{-1}) bir miktar distile suda çözülerek çözelti hacimleri 1 l'ye tamamlanmıştır. Ardından 50 mM glisin çözeltisinin pH'ı 10.5 olana kadar 50 mM NaOH çözeltisinden ilave edilmiştir.

50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisi: 50 mM glisin (3.7535 gr l^{-1}) ve 50 mM NaOH (2 gr l^{-1}) bir miktar distile suda çözülerek çözelti hacimleri 1 l'ye

tamamlanmıştır. Ardından 50 mM glisin çözeltisinin pH'ı 10.5 olana kadar 50 mM NaOH çözeltisinden ilave edilmiştir. Elde edilen tampon çözeltisinin hacmi ölçülerek litreye 2.925 gr olacak şekilde NaCl ilavesi yapılmıştır.

B 3: DEAE-Selüloz Kromatografi Kolonunun Yıkanmasında Kullanılan Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması

50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi: 50 mM glisin (3.7535 gr l⁻¹) ve 50 mM NaOH (2 gr l⁻¹) bir miktar distile suda çözülerek çözelti hacimleri 1 l'ye tamamlanmıştır. Ardından 50 mM glisin çözeltisinin pH'ı 10.5 olana kadar 50 mM NaOH çözeltisinden ilave edilmiştir.

50 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisi: 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi hazırlandıktan sonra çözeltinin toplam hacmi ölçülüp üzerine 2.925 gr l⁻¹ olacak şekilde NaCl ilave edilmiştir.

100 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisi: 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi hazırlandıktan sonra çözeltinin toplam hacmi ölçülüp üzerine 5.85 gr l⁻¹ olacak şekilde NaCl ilave edilmiştir.

150 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisi: 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi hazırlandıktan sonra çözeltinin toplam hacmi ölçülüp üzerine 8.775 gr l⁻¹ olacak şekilde NaCl ilave edilmiştir.

200 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisi: 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi hazırlandıktan sonra çözeltinin toplam hacmi ölçülüp üzerine 11.7 gr l⁻¹ olacak şekilde NaCl ilave edilmiştir.

250 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisi: 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi hazırlandıktan sonra çözeltinin toplam hacmi ölçülüp üzerine 14.625 gr l⁻¹ olacak şekilde NaCl ilave edilmiştir.

500 mM pH 10.5 NaOH-glisin-NaCl tampon çözeltisi: 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözeltisi hazırlandıktan sonra çözeltinin toplam hacmi ölçülüp üzerine 29.25 gr l⁻¹ olacak şekilde NaCl ilave edilmiştir.

B 4: SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması

%12 (w/v) ayırma jelinin hazırlanması:

Distile su	1.6 ml
%30 akrilamid mix	2.0 ml
1.5M Tris (pH:8.8)	1.3 ml
%10 SDS	0.05 ml
%10 Amonyum persülfat, (APS)	0.05 ml
N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin, (TEMED)	0.002 ml

%5 (w/v) örnek yükleme jelinin hazırlanması:

Distile su	3.4 ml
%30 akrilamid mix	0.83 ml
1.5M Tris (pH:6.8)	0.63 ml
%10 SDS	0.05 ml
%10 Amonyum persülfat, (APS)	0.05 ml
N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin, (TEMED)	0.005 ml

B 5: Gümüş Boyamada Kullanılan Yöntem ve Yöntemde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Fiksasyon çözeltisi:	30 ml Etanol 10 ml Asetik asit 60 ml distile su
Çözelti 2:	%20'lik etanol
Çözelti 3:	0.2 gr/lit Sodyumtiyosülfat
Gümüş çözeltisi:	2gr/lit Gümüş nitrat

Gelişme çözeltisi:	30gr/lt Sodyum karbonat (susuz)
	0.25ml/lt %35'lik formaldehit
	10mg/lt Sodyumtiyosülfat
Stop çözeltisi:	50gr/lt Tris-baz
	25ml/lt asetik asit
Bekletme çözeltisi:	%1 Asetik asit

Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyama Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Boyama çözeltisi:	250 ml etanol
	100 ml glasiyal asetik asit
	650 ml distile su

olacak şekilde hazırlanan boya giderme çözeltisinin içinde % 0.2 gr Coomassie Brilliant Blue R-250 çözülerek çözelti hazırlanmıştır.

Boya giderme çözeltisi çözeltisi:	250 ml Etanol
	100 ml glasiyal asetik asit
	650 ml distile su

ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında İzmit'te doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İzmit'te tamamladı. 1989 yılında girdiği Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nden 1994 yılında kimyager olarak mezun oldu. 1994–1997 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. 01.09.1995–15.09.2000 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yaptı. 15.09.2000 tarihinde Kocaeli Üniversitesi Köseköy MYO Fermentasyon Programına geçiş yaptı. 15.08.2004 yılından beri Hereke Ömer İsmet Uzunyol MYO'nda Öğretim Görevlisi olarak görev yapmakta olup, evli ve bir çocuk annesidir.