

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Bacillus clausii* ALKALEN PROTEAZI'NIN SU İLE
KARIŞABİLEN ORGANİK ÇÖZÜCÜLER VARLIĞINDA
KİNETİK ve TERMODİNAMİK ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

KİMYAGER Yonca (AVCI) DUMAN

Anabilim Dalı: Kimya

Danışman: Prof. Dr. Altan ERARSLAN

KOCAELİ 2008

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



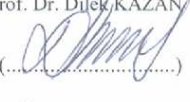
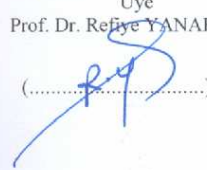
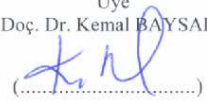
***Bacillus clausii* ALKALEN PROTEAZI'NIN SU İLE KARIŞABİLEN
ORGANİK ÇÖZÜCÜLER VARLIĞINDA KİNETİK VE TERMODİNAMİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Kimyager Yonca (AVCI) DUMAN

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 23 Ekim 2008

Tezin Savunulduğu Tarih: 18 Aralık 2008

Tez Danışmanı Prof. Dr. Altan ERARSLAN	Üye Prof. Dr. Hikmet AĞIRBAŞ	Üye Prof. Dr. Dilek KAZAN
()	()	()
Üye Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ	Üye Doç. Dr. Kemal BAYSAL	
()	()	

KOCAELİ 2008

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Tez çalışmasında *Bacillus clausii* GMBAE 42 serin alkalen proteaz enziminin kazein hidrolizinin su ile karışabilen 8 farklı organik çözücü varlığında kinetik ve termodinamik özellikleri incelenmiştir. Organik çözücülerin log P değerleri, dielektrik sabitleri ve solvatokromik parametreleri ile enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri arasında lineer ilişkiler belirlenmiştir.

Doktora tezimin hazırlanması sırasında, her aşamada engin bilgi ve tecrübelerinden yararlanmama olanak sağlayan, sabrını hiçbir zaman eksik etmeyen, biyokimyaya ilgi duymamda çok büyük pay sahibi olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Altan ERARSLAN'a, tez çalışmamın şekillenmesinde ve ilerlemesinde büyük payı olan, yardımlarını ve bilgi birikimini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Dilek KAZAN hocama (Marmara Üniversitesi Müh. Fakültesi Kimya Mühendisliği Öğretim Üyesi, TÜBİTAK-MAM GMBE Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuvarı) teşekkürlerimi borç bilirim.

Tez çalışmamın aksamadan yürüyebilmesi için gerekli kimyasal maddelerin, cam malzemelerin ve enzimin sağlanmasında samimi yardımlarını esirgemeyen TÜBİTAK-MAM GMBE Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuvarı çalışanlarından Sayın Dr. A.Akın Denizci, Dr. Dilek COŞKUNER ÖZTÜRK ve Nesrin KARAHAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemi sağlayan ve doktora çalışmam boyunca manevi desteğini ve teşvikini eksik etmeyen annem Yıldız AVCI, babam Hayrettin AVCI'ya ve aileme, tez çalışmamı tamamlayabilmem adına benimle birlikte her türlü fedakarlığa katlanan sevgili eşim Ferudun DUMAN'a ve doktora çalışmam esnasında dünyaya gelen, çalışmamı tamamlayabilmem için onlardan çaldığım vakit için beni üzmeyen sevgili ikizlerim Can ve Bilge DUMAN'a teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	ii
TABLolar DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1 Enzimler	1
1.2 Enzimlerin Çalışma İlkesi	1
1.3 Enzimlerin Sınıflandırılması	2
2. PROTEOLİTİK ENZİMLER	3
2.1 Proteolitik Enzimlerin Enzim Teknolojisindeki Yeri	3
2.2 Proteazlar.....	4
2.2.1 Proteazların sınıflandırılması	6
2.2.1.1 Kaynağına göre proteazlar	7
2.2.1.2 Aktif bölgelerindeki fonksiyonel gruplarına göre proteazlar.....	15
2.2.1.3 Proteinleri hidrolizleme biçimlerine göre proteazlar	26
2.2.2 Proteazların endüstrideki uygulama alanları.....	29
2.2.3 Proteazların fizyolojik işlevleri	33
2.2.4 Alkalen Proteazlar	35
2.2.5 Organik çözücü ortamında biyokataliz	36
2.2.5.1 Organik çözücü içinde enzimatik aktivite.....	39
2.2.5.2 Çözücünün biyokataliz üzerine etkisi	41
2.2.5.3 Çözücü Seçimi	42
2.2.5.4 Organik çözücü içinde enzimatik katalizin diğer özellikleri.....	42
2.2.5.5 Organik çözücü varlığında enzimatik katalizi etkileyen faktörler	44
2.2.5.5.1 Solvatokromizim ve solvatokromik parametreler	45
2.2.5.6 Peptid sentezi ve rasemik karışımların ayrılmasında proteazlar	47
2.3 <i>Bacillus clausii</i> GMB AE 42 Serin Alkalen Proteaz Enziminin Genel Özellikleri	49
2.4 Tez Çalışmasında Kullanılan Kinetik ve Termodinamik Bağlıntılar.....	50
2.4.1 K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi için Michaelis–Menten denklemi	50
2.4.2 Enzim aktivasyonu söz konusu olduğu durumda kullanılan kinetik bağıntılar	64
2.4.3 Organik çözücüler varlığında alkalen proteaz ile kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametreler	69
2.4.4 Alkalen proteazın katalitik gücünü etkileyen parametrelerin organik çözücü konsantrasyonu ile ilişkilerinin hesabı	71
2.4.4.1 Organik çözücülerin çalışıldığı konsantrasyonlardaki log p değerlerinin hesabı.....	71
2.4.4.2 Organik çözücülerin çalışıldığı konsantrasyonlardaki dielektrik sabitlerinin hesabı.....	71
2.4.4.3 Organik çözücülerin solvatokromik parametrelerinin çalışılan çözücü konsantrasyonu ile ilişkilerinin hesabı	76
2.4.5 Standart sapma hesabı	77
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	79
3.1 Kimyasallar	79
3.2 Mikroorganizma.....	79
3.3 Alkalen Proteaz Enziminin Üretimi ve Saflaştırılması	79

3.4 Alkalen Proteaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi	79
3.4.1 Folin-Ciocalteu reaktifi içeren aktivite belirleme yöntemi	79
3.4.1.1 Folin-Ciocalteu reaktifi içeren aktivite belirleme yöntemi için tirozin standart grafiğinin hazırlanması	80
3.4.2. Folin Ciocalteu reaktifi içermeyen aktivite belirleme yöntemi.....	81
3.4.2.1 Folin Ciocalteu reaktifi içermeyen aktivite belirleme yöntemi için tirozin standart grafiğinin hazırlanması	82
3.5 Alkalen Proteaz Örneklerinde Protein Miktarlarının Belirlenmesi.....	82
3.5.1 Coomassie Blue G-250 boyası bağlama yöntemi ile protein miktarının belirlenmesi	83
3.5.1.1 Coomassie Blue G-250 boyası bağlama yöntemi ile protein standart grafiğinin oluşturulması	83
3.6 Su ile Karışabilen Organik Çözücülerin Alkalen Proteaz Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi	84
3.6.1 Organik çözücülerin optimal pH üzerine etkileri.....	84
3.6.2 Enzimin inhibisyona uğradığı organik çözücü yüzdesinin belirlenmesi.....	84
3.6.2.1 Folin-Ciocalteu reaktifi içeren yöntem ile enzimin inhibisyona uğradığı organik çözücü yüzdesinin belirlenmesi	84
3.6.2.2 Folin-Ciocalteu reaktifi içermeyen yöntem ile enzimin inhibisyona ve aktivasyona uğradığı organik çözücü yüzdesinin belirlenmesi.....	86
3.7 Organik Çözücü Varlığında ve Yokluğunda Alkalen Proteaz Enziminin Kinetik Parametrelerinin (K_m ve V_m Değerleri) Belirlenmesi	87
3.7.1 Organik çözücü yokluğunda alkalen proteaz enziminin Folin-Ciocalteu reaktifi içeren yöntem ile kinetik parametrelerinin belirlenmesi	87
3.7.2 Organik çözücü yokluğunda Folin-Ciocalteu reaktifi içermeyen yöntem ile alkalen proteazın enziminin kinetik parametrelerinin belirlenmesi	88
3.7.3 Organik çözücü varlığında Folin-Ciocalteu reaktifi içeren yöntem ile alkalen proteazın enziminin kinetik parametrelerinin belirlenmesi.....	88
3.7.4 Organik çözücü varlığında Folin-Ciocalteu reaktifi içermeyen yöntem ile alkalen proteazın enziminin kinetik parametrelerinin belirlenmesi	89
3.8 Alkalen Proteaz Enziminin Organik Çözücü Varlığında ve Yokluğunda Katalitik Hız Sabiti (Turn-over Sayısı) ve Katalitik Performansının (k_{cat} ve k_{cat}/K_m) Belirlenmesi	90
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	91
4.1 BULGULAR.....	91
4.1.1 Organik çözücülerin optimal pH üzerine etkileri.....	91
4.1.2 Enzimin inhibisyona uğradığı organik çözücü yüzdesinin belirlenmesi.....	92
4.1.2.1 Folin-Ciocalteu reaktifi içeren yöntemle:.....	92
4.1.2.2 Folin-Ciocalteu reaktifi içermeyen yöntemle:.....	94
4.1.3 Organik çözücü varlığında ve yokluğunda alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi ve organik çözücülerin enzim üzerinde yarattıkları tersinir inhibisyon ve aktivasyon etkisinin belirlenmesi	99
4.1.3.1 Organik çözücü yokluğunda alkalen proteaz enziminin Folin-Ciocalteu Reaktifi içeren yöntem ile K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi	99
4.1.3.2 Alkalen proteaz enziminin k_{cat} değeri (turn-over katsayısı) ve katalitik performansının (k_{cat}/K_m) belirlenmesi.....	101
4.1.3.3 Alkalen proteaz enziminin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi....	101

4.1.3.4 Organik çözücü varlığında Folin-Ciocalteu reaktifi içeren yöntem ile alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi ve organik çözücülerin enzim üzerinde yarattıkları tersinir inhibisyon etkisinin belirlenmesi.....	101
4.1.3.4.1 Metanol varlığında enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin belirlenmesi	102
4.1.3.4.1.1 Metanol varlığında enzimatik katalizi etkileyen faktörlerin enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri ile ilişkilendirilmesi	113
4.1.3.4.2 Etanol varlığında enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin belirlenmesi	118
4.1.3.4.2.1 Etanol varlığında enzimatik katalizi etkileyen faktörlerin enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri ile ilişkilendirilmesi	128
4.1.3.4.3 n-propanol varlığında enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin belirlenmesi	132
4.1.3.4.3.1 n-propanol varlığında enzimatik katalizi etkileyen faktörlerin enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri ile ilişkilendirilmesi	142
4.1.3.4.4 i-propanol varlığında enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin belirlenmesi	146
4.1.3.4.4.1 i-propanol varlığında enzimatik katalizi etkileyen faktörlerin enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri ile ilişkilendirilmesi	155
4.1.3.5 Organik çözücü yokluğunda alkalen proteaz enziminin Folin-Ciocalteu reaktifi içermeyen yöntem ile k_m ve v_m değerlerinin belirlenmesi.....	159
4.1.3.5.1 Alkalen proteaz enziminin k_{cat} değeri (turn-over katsayısı) ve katalitik performansının (k_{cat}/K_m) belirlenmesi.....	159
4.1.3.5.2 Alkalen proteaz enziminin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi.	160
4.1.3.6 Organik çözücü varlığında Folin-Ciocalteu reaktifi içermeyen yöntem ile alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi ve organik çözücülerin enzim üzerinde yarattıkları zorunlu olmayan aktivasyon etkilerinin belirlenmesi ..	160
4.1.3.6.1 1,4-Dioksan varlığında enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin belirlenmesi	160
4.1.3.6.1.1 1,4–Dioksan varlığında enzimatik katalizi etkileyen faktörlerin enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri ile ilişkilendirilmesi	170
4.1.3.6.2 N,N'–DMF varlığında enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin belirlenmesi	176
4.1.3.6.2.1 N,N'–DMF varlığında enzimatik katalizi etkileyen faktörlerin enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri ile ilişkilendirilmesi	186
4.1.3.5.3 Asetonitril varlığında enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin belirlenmesi	192
4.1.3.6.3.1 Asetonitril varlığında enzimatik katalizi etkileyen faktörlerin enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri ile ilişkilendirilmesi	206
4.1.3.6.4 DMSO varlığında enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin belirlenmesi	212
4.1.3.6.4.1 DMSO'nun inhibitör etki gösterdiği konsantrasyonlarda enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin belirlenmesi	212
4.1.3.6.4.1.1 DMSO'nun inhibitör etki gösterdiği konsantrasyonlar varlığında enzimatik katalizi etkileyen faktörlerin enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri ile ilişkilendirilmesi	221
4.1.3.5.6.2 DMSO'nun aktivatör etki gösterdiği konsantrasyonlarda enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin belirlenmesi	228

4.1.3.6.4.2.1 DMSO'nun aktivatör etki gösterdiği konsantrasyonlar varlığında enzimatik katalizi etkileyen faktörlerin enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri ile ilişkilendirilmesi	238
4.1.4 Organik çözücülerin solvatokromik parametrelerinin enzimin kinetik ve termodinamik özellikleri üzerine etkilerinin incelenmesi.....	244
4.2 TARTIŞMA	264
4.2.1 Alkalen proteazın kinetik özellikleri üzerine organik çözücülerin etkisi.....	264
4.2.2 Alkalen proteazın termodinamik özellikleri üzerine organik çözücülerin etkisi	273
4.2.3 Alkalen proteazın kinetik ve termodinamik özellikleri üzerine organik çözücülerin log P ve dielektrik sabiti değerlerinin etkisi	278
4.2.3.1 Log P etkisi	278
4.2.3.2 Dielektrik sabiti etkisi	283
4.2.4 Organik çözücülerin solvatokromik parametrelerinin enzimin kinetik ve termodinamik özellikleri üzerindeki etkileri.....	285
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	294
5.1 Sonuçlar	294
5.2 Öneriler	298
ÖZGEÇMİŞ	309

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1: Peptid bağıny hidrolizleyen proteazların reaksiyonu	4
Şekil 2. 2: Aktif bölgesindeki amino asit kalıntıları siyah çizgiler ile gösterilmiş tripsinin üç boyutlu konformasyonel yapısı	10
Şekil 2. 3: Kimotripsinin üç boyutlu yapısı ve serin 195, histidin 57, aspartat 102'den oluşan katalitik triadı	11
Şekil 2. 4: α -kimotripsinin peptid bağı hidrolizini gösteren mekanizma	12
Şekil 2. 5: Pepsinin üç boyutlu yapısı ve aktif merkezinde bulunan amino asitlerin konumu	13
Şekil 2. 6: Kimotripsinin α -heliks ve β - tabakalarını gösteren ikincil yapısı	17
Şekil 2. 7: Katalitik triaddaki hidrojen bağıları	18
Şekil 2. 8: Serin proteazlar için genel kabul edilen mekanizma	20
Şekil 2. 9: Subtilazların ikincil yapısının şematik gösterimi	21
Şekil 2. 10: Subtilisinin protein hidrolizine ilişkin katalitik ve kinetik etki mekanizması	22
Şekil 2. 11: Aspartik proteazlar için öngörülen katalitik mekanizma. D, T ve G farklı pozisyonlarda bulunan aspartat kalıntılarını ifade etmektedir	23
Şekil 2. 12: Sistein proteazlar için öngörülen katalitik mekanizma	24
Şekil 2. 13: <i>Aeromonas proteoltica</i> amino peptidazının iki tane çinko içeren aktif bölge yapısı	25
Şekil 2. 14: Termolizinin alternatif reaksiyon mekanizması	26
Şekil 2. 15: Enzimin aktif bölgesinin ligand ile doyurulmasının şematik gösterimi. Enzimin aktif bölgesi su içinde ligand ile bağılandığında, konformasyonel değişikliğe uğrar. Bu değişiklik liyofilizasyondan sonra ve organik çözücü içinde de sürekliliğini korur. Fakat protein molekülünün esnek olduğu sulu ortama alındığında bu etki kaybolur.....	43
Şekil 2. 16: Reaksiyon başlangıç hızının (v) substrat başlangıç konsantrasyonuna $[S]$ bağılı olarak değişimi	51
Şekil 2. 17: Michaelis-Menten kinetiğine uyan enzimatik kataliz için Lineweaver–Burk diyagramı.....	52
Şekil 2. 18: Gerçek non–kompetitif inhibisyon için Lineweaver–Burk diyagramı ...	57
Şekil 2. 19: Kısmi non–kompetitif inhibisyon için Lineweaver–Burk diyagramı	59
Şekil 2. 20: Non–kompetitif inhibisyon için ikincil çizimler.....	60
Şekil 2. 21: Non–kompetitif inhibisyon için hiperbollerin oluştđu ikincil çizim	60
Şekil 2. 22: Kısmi non–kompetitif inhibisyon için üçüncül çizim	61
Şekil 2. 23: Un–kompetitif inhibisyon için Lineweaver–Burk diyagramı	63
Şekil 2. 24: Un–kompetitif inhibisyon için ikincil çizimler.....	64
Şekil 2. 25: Zorunlu olmayan aktivatör durumunda v' ye karşı $[S]$ diyagramı	66
Şekil 2. 26: Zorunlu olmayan aktivasyon için Lineweaver–Burk diyagramı	67
Şekil 2. 27: Zorunlu olmayan aktivasyon için ikincil çizim	68
Şekil 2. 28: Zorunlu olmayan aktivasyon için üçüncül çizim.....	69
Şekil 2. 29: Alkalen proteaz ile kazein hidrolizi reaksiyonunda serbest enerji düzeyi diyagramı.....	70
Şekil 2. 30: Metanolün değişen konsantrasyonları için $\log \epsilon$ – T grafiği.....	72

Şekil 2. 31: Etanolün değişen konsantrasyonları için log ϵ -T grafiği	73
Şekil 2. 32: n-propanolün değişen konsantrasyonları için log ϵ -T grafiği	74
Şekil 2. 33: i-propanolün değişen konsantrasyonları için log ϵ -T grafiği	75
Şekil 3. 1:Tirozinin Folin reaktifi varlığındaki standart grafiği (r= 0.9986).....	81
Şekil 3. 2:Tirozinin Folin reaktifi yokluğundaki standart grafiği (r= 0.9960).....	82
Şekil 3. 3: Coomassie Blue 250 bağlama yöntemi ile protein belirlenmesinde kullanılan protein standart grafiği	84
Şekil 4. 1: 50 mM NaOH-Glisin tamponu içinde değişik yüzdelerde hazırlanan organik çözücülerin pH profili	91
Şekil 4. 2: % 10-%30 Metanol konsantrasyonlarında alkalen proteaz enziminin 30°C ve pH 10.5'da 120 dakika ön inkübasyonu sonucunda tersinir inhibisyonunun belirlenmesi	93
Şekil 4. 3: % 10-%50 etanol konsantrasyonlarında alkalen proteaz enziminin 30°C ve pH 10.5'da 120 dakika ön inkübasyonu sonucunda tersinir inhibisyonunun belirlenmesi	93
Şekil 4. 4: % 10-%30 n-propanol konsantrasyonlarında alkalen proteaz enziminin 30°C ve pH 10.5'da 120 dakika ön inkübasyonu sonucunda tersinir inhibisyonunun belirlenmesi	94
Şekil 4. 5: % 10-%35 i-propanol konsantrasyonlarında alkalen proteaz enziminin 30°C ve pH 10.5'da 120 dakika ön inkübasyonu sonucunda tersinir inhibisyonunun belirlenmesi	94
Şekil 4. 6: Artan 1,4-dioksan konsantrasyonlarında alkalen proteaz enziminin 30°C ve pH 10.5'da 120 dakika ön inkübasyon sonunda zorunlu olmayan aktivasyonunun belirlenmesi	95
Şekil 4. 7: Artan asetonitiril konsantrasyonları varlığında alkalen proteaz enziminin 30°C ve pH 10.5'da 120 dakika ön inkübasyon sonunda zorunlu olmayan aktivasyonunun belirlenmesi.....	96
Şekil 4. 8: Artan N,N'-DMF konsantrasyonları varlığında alkalen proteaz enziminin 30°C ve pH 10.5'da 120 dakika ön inkübasyon sonunda zorunlu olmayan aktivasyonunun belirlenmesi.....	96
Şekil 4. 9: Artan DMSO konsantrasyonları varlığında alkalen proteaz enziminin 30°C ve pH 10.5'da 120 dakika ön inkübasyon sonunda zorunlu olmayan aktivasyonunun belirlenmesi	97
Şekil 4. 10: Organik çözücü içermeyen (nativ) enzimin K_m ve V_m değerlerinin hesaplamak üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı	100
Şekil 4. 11: %2.5 Metanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı	103
Şekil 4. 12: %5 Metanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı	104
Şekil 4. 13: % 10 Metanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı	105
Şekil 4. 14: %20 Metanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı	106
Şekil 4. 15: %25 Metanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı	107
Şekil 4. 16: %30 Metanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı	108

Şekil 4. 17: Metanolün artan konsantrasyonları varlığında oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramı.....	109
Şekil 4. 18: Artan metanol konsantrasyonları varlığında Şekil 4.17’deki doğruların eğim ve interseptlerinin metanol konsantrasyonuna karşı işaretlenmesiyle oluşturulan ikincil çizim.....	110
Şekil 4. 19: Artan metanol konsantrasyonları varlığında oluşturulan üçüncül çizim	110
Şekil 4. 20: Alkalen proteazın k_{cat} değerinin artan metanol konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= -0.9632$).....	112
Şekil 4. 21: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerinin artan metanol konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= -0.9585$).....	112
Şekil 4. 22: Alkalen proteazın aktivasyon serbest enerjisinin (ΔG^\ddagger) artan metanol konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= -0.9686$)	113
Şekil 4. 23: Alkalen proteazın geçiş hali serbest enerjisinin (ΔG_{E-T}^\ddagger) artan metanol konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= -0.9621$)	113
Şekil 4. 24: Alkalen proteazın k_{cat} değerinin artan metanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9585$).....	114
Şekil 4. 25: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerinin artan metanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9584$).....	115
Şekil 4. 26: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger değerleri ile artan metanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9663$)	115
Şekil 4. 27: Alkalen proteazın ΔG_{E-T}^\ddagger değerleri ile artan metanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9663$)	115
Şekil 4. 28: Alkalen proteazın k_{cat} değerleri ile artan metanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9816$).....	117
Şekil 4. 29: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerleri ile artan metanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9755$).....	117
Şekil 4. 30: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger değerleriyle artan metanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9794$)	117
Şekil 4. 31: Alkalen proteazın ΔG_{E-T}^\ddagger değerleriyle artan metanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9709$)	118
Şekil 4. 32: %10 Etanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	119
Şekil 4. 33: %15 Etanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı.....	120
Şekil 4. 34: %20 Etanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	121
Şekil 4. 35: %25 Etanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	122
Şekil 4. 36: %30 Etanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	123
Şekil 4. 37: Etanolün artan konsantrasyonları varlığında oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramı.....	124
Şekil 4. 38: Artan etanol konsantrasyonları varlığında Şekil 4.37’deki doğruların eğim ve interseptlerinin etanol konsantrasyonuna karşı işaretlenmesiyle oluşturulan ikincil çizim.....	125
Şekil 4. 39: Alkalen proteazın k_{cat} değerinin artan etanol konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= -0.9943$)	126

Şekil 4. 40: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerinin artan etanol konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= -0.9934$).....	127
Şekil 4. 41: Alkalen proteazın $\Delta G^\#$ değerinin artan etanol konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= 0.9942$).....	127
Şekil 4. 42: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-T}^\#$ değerinin artan etanol konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= 0.9943$).....	127
Şekil 4. 43: Alkalen proteazın k_{cat} değerinin artan etanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9952$).....	129
Şekil 4. 44: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerlerinin artan etanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9949$).....	129
Şekil 4. 45: Alkalen proteazın $\Delta G^\#$ değerlerinin artan etanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9923$).....	129
Şekil 4. 46: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-T}^\#$ değerleri ile artan etanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9923$).....	130
Şekil 4. 47: Alkalen proteazın k_{cat} değerleri ile artan etanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9982$).....	131
Şekil 4. 48: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerleri ile artan etanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9971$).....	131
Şekil 4. 49: Alkalen proteazın $\Delta G^\#$ değerleri ile artan etanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9964$).....	131
Şekil 4. 50: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-T}^\#$ değerleri ile artan etanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9963$).....	132
Şekil 4. 51: %5 n-propanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı.....	133
Şekil 4. 52: %10 n-propanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı.....	134
Şekil 4. 53: %12.5 n-propanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı.....	135
Şekil 4. 54: %15 n-propanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı.....	136
Şekil 4. 55: %20 n-propanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı.....	137
Şekil 4. 56: n-propanolün artan konsantrasyonları varlığında oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramı.....	138
Şekil 4. 57: Artan n-propanol konsantrasyonları varlığında Şekil 4.56'daki doğruların eğim ve interseptlerinin n-propanol konsantrasyonuna karşı işaretlenmesiyle oluşturulan ikincil çizim.....	139
Şekil 4. 58: Alkalen proteazın k_{cat} değerinin artan n-propanol konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= -0.9922$).....	140
Şekil 4. 59: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerlerinin artan n-propanol konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= -0.9918$).....	141
Şekil 4. 60: Alkalen proteazın $\Delta G^\#$ değerlerinin artan n-propanol konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= 0.9876$).....	141
Şekil 4. 61: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-T}^\#$ değerlerinin artan n-propanol konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= 0.9882$).....	141
Şekil 4. 62: Alkalen proteazın k_{cat} değerinin artan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9886$).....	142

Şekil 4. 63: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerinin artan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9884$).....	143
Şekil 4. 64: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger değerinin artan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9906$)	143
Şekil 4. 65: Alkalen proteazın ΔG_{E-T}^\ddagger değerinin artan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9905$).....	143
Şekil 4. 66: Alkalen proteazın k_{cat} değerleri ile artan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9628$)	144
Şekil 4. 67: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerleri ile artan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9630$)	145
Şekil 4. 68: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger değerleri ile artan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9393$)	145
Şekil 4. 69: Alkalen proteazın ΔG_{E-T}^\ddagger değerleri ile artan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9407$)	145
Şekil 4. 70: % 10 i-propanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	146
Şekil 4. 71: % 15 i-propanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	147
Şekil 4. 72: % 20 i-propanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	148
Şekil 4. 73: % 25 i-propanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	149
Şekil 4. 74: % 30 i-propanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	150
Şekil 4. 75: i-propanolün artan konsantrasyonları varlığında oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramı.....	152
Şekil 4. 76: Artan i-propanol konsantrasyonları varlığında Şekil 4.75’teki doğruların eğim ve interseptlerinin i-propanol konsantrasyonuna karşı işaretlenmesiyle oluşturulan ikincil çizim.....	152
Şekil 4. 77: Alkalen proteazın k_{cat} değerinin artan i-propanol konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= -0.9653$).....	154
Şekil 4. 78: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerinin artan i-propanol konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= -0.9618$).....	154
Şekil 4. 79: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger değerinin artan i-propanol konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= 0.9720$).....	154
Şekil 4. 80: Alkalen proteazın ΔG_{E-T}^\ddagger değerinin artan i-propanol konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= 0.9722$)	155
Şekil 4. 81: Alkalen proteazın k_{cat} değerinin artan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9678$).....	156
Şekil 4. 82: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerinin artan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9634$).....	156
Şekil 4. 83: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger değerinin artan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9788$)	156
Şekil 4. 84: Alkalen proteazın ΔG_{E-T}^\ddagger değerinin artan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9757$)	157

Şekil 4. 85: Alkalen proteazın k_{cat} değerleri ile artan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9678$).....	158
Şekil 4. 86: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerleri ile artan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9640$).....	158
Şekil 4. 87: Alkalen proteazın $\Delta G^\#$ değerleri ile artan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9678$)	158
Şekil 4. 88: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-T}^\#$ değerleri ile artan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9688$)	159
Şekil 4. 89: %2.5 1,4–dioksan varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	161
Şekil 4. 90: %5 1,4–dioksan varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	162
Şekil 4. 91: %10 1,4–dioksan varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	163
Şekil 4. 92: %15 1,4–dioksan varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	164
Şekil 4. 93: 1,4–dioksanın artan konsantrasyonları varlığında oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramı.....	165
Şekil 4. 94: 1,4–dioksanın artan konsantrasyonları varlığında Şekil 4.93’teki doğruların eğim ve interseptlerinin 1,4-dioksan konsantrasyonuna karşı işaretlenmesiyle oluşturulan ikincil çizim.....	166
Şekil 4. 95: 1,4–dioksanın artan konsantrasyonları varlığında oluşturulan üçüncül çizim.....	166
Şekil 4. 96: Alkalen proteazın k_{cat} değerinin artan 1,4-dioksan konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= -0.9602$).....	168
Şekil 4. 97: Alkalen proteazın K_m değerinin artan 1,4-dioksan konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= -0.9229$).....	168
Şekil 4. 98: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerinin artan 1,4-dioksan konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= 0.9500$)	168
Şekil 4. 99: Alkalen proteazın $\Delta G^\#$ değerinin artan 1,4-dioksan konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= -0.9646$).....	169
Şekil 4. 100: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-T}^\#$ değerinin artan 1,4-dioksan konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= -0.9646$).....	169
Şekil 4. 101: Alkalen proteazın ΔG_{E-S} değerinin artan 1,4-dioksan konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= -0.9343$).....	169
Şekil 4. 102: Artan 1,4–dioksan konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin k_{cat} değerlerinin değişimi ($r= 0.9586$)	171
Şekil 4. 103: Artan 1,4–dioksan konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin K_m değerlerinin değişimi ($r= -0.9263$)	171
Şekil 4. 104: Artan 1,4–dioksan konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin k_{cat}/K_m değerlerinin değişimi ($r= 0.9517$)	171
Şekil 4. 105: Artan 1,4–dioksan konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin $\Delta G^\#$ değerlerinin değişimi ($r= -0.9649$)	172
Şekil 4. 106: Artan 1,4–dioksan konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin $\Delta G_{E-T}^\#$ değerlerinin değişimi ($r= 0.9649$).....	172
Şekil 4. 107: Artan 1,4–dioksan konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin $\Delta G_{E-S}^\#$ değerlerinin değişimi ($r= -0.9389$).....	172

Şekil 4. 108: Alkalen proteazın k_{cat} değeri ile artan 1,4-dioksan konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9601$)	174
Şekil 4. 109: Alkalen proteazın K_m değerleri ile artan 1,4-dioksan konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9227$).....	174
Şekil 4. 110: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerleri ile artan 1,4-dioksan konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9499$)	174
Şekil 4. 111: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger değerleriyle artan 1,4-dioksan konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9499$)	175
Şekil 4. 112: Alkalen proteazın ΔG_{E-T}^\ddagger değerleriyle artan 1,4-dioksan konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9499$)	175
Şekil 4. 113: Alkalen proteazın ΔG_{E-S} değerleriyle artan 1,4-dioksan konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9499$)	175
Şekil 4. 114: %2.5 N,N'-DMF varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı.....	176
Şekil 4. 115: %5 N,N'-DMF varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı	177
Şekil 4. 116: %7.5 N,N'-DMF varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı	178
Şekil 4. 117: %10 N,N'-DMF varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı.....	179
Şekil 4. 118: %15 N,N'-DMF varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı	180
Şekil 4. 119: N,N'-DMF'nin artan konsantrasyonları varlığında oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramı.....	181
Şekil 4. 120: N,N'-DMF'nin artan konsantrasyonları varlığında Şekil 4.20'deki doğruların eğim ve interseptlerinin N,N'-DMF'nin konsantrasyonuna karşı işaretlemeyle oluşturulan ikincil çizim.....	182
Şekil 4. 121: N,N'-DMF'nin artan konsantrasyonları varlığında oluşturulan üçüncül çizim.....	182
Şekil 4. 122: Alkalen proteazın k_{cat} değerinin artan N,N'-DMF konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= 0.9695$)	184
Şekil 4. 123: Alkalen proteazın K_m değerinin artan N,N'-DMF konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= -0.9179$).....	184
Şekil 4. 124: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerinin artan N,N'-DMF konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= 0.9753$)	184
Şekil 4. 125: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger değerinin artan N,N'-DMF konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= -0.9712$).....	185
Şekil 4. 126: Alkalen proteazın ΔG_{E-T}^\ddagger değerinin artan N,N'-DMF konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= -0.9645$).....	185
Şekil 4. 127: Alkalen proteazın ΔG_{E-S} değerinin artan N,N'-DMF konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= -0.9260$).....	185
Şekil 4. 128: Artan N,N'-DMF konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin k_{cat} değerlerinin değişimi ($r= 0.9914$)	187
Şekil 4. 129: Artan N,N'-DMF konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin K_m değerlerinin değişimi ($r= -0.8527$)	187

Şekil 4. 130: Artan N,N'-DMF konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin k_{cat}/K_m değerlerinin değişimi ($r= 0.9373$)	187
Şekil 4. 131: Artan N,N'-DMF konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin ΔG^\ddagger değerlerinin değişimi ($r= -0.9933$)	188
Şekil 4. 132: Artan N,N'-DMF konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin ΔG_{E-T}^\ddagger değerlerinin değişimi ($r= -0.9913$)	188
Şekil 4. 133: Artan N,N'-DMF konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin ΔG_{E-S}^\ddagger değerlerinin değişimi ($r= -0.8638$).....	188
Şekil 4. 134: Alkalen proteazın k_{cat} değerleri ile artan N,N'-DMF konsantrasyonlarıyla ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9692$)	190
Şekil 4. 135: Alkalen proteazın K_m değerleri ile artan N,N'-DMF konsantrasyonlarıyla ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9185$)	190
Şekil 4. 136: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerleri ile artan N,N'-DMF konsantrasyonlarıyla ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9756$)	190
Şekil 4. 137: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger değerleri ile artan N,N'-DMF konsantrasyonlarıyla ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9709$)	191
Şekil 4. 138: Alkalen proteazın ΔG_{E-T}^\ddagger değerleri ile artan N,N'-DMF konsantrasyonlarıyla ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9649$)	191
Şekil 4. 139: Alkalen proteazın ΔG_{E-S} değerleri ile artan N,N'-DMF konsantrasyonlarıyla ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9267$)	191
Şekil 4. 140: %32.5 Asetonitril varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı	193
Şekil 4. 141: %35 Asetonitril varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı	194
Şekil 4. 142: %37.5 Asetonitril varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı	195
Şekil 4. 143: %40 Asetonitril varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı	196
Şekil 4. 144: %42.5 Asetonitril varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı	197
Şekil 4. 145: %45 Asetonitril varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı	198
Şekil 4. 146: Asetonitrilin artan konsantrasyonları varlığında oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramı.....	200
Şekil 4. 147: Asetonitrilin artan konsantrasyonları varlığında Şekil 4.146'daki doğruların eğim ve interseptlerinin asetonitril konsantrasyonuna karşı işaretlenmesiyle oluşturulan ikincil çizim.....	200
Şekil 4. 148: Asetonitrilin artan konsantrasyonları varlığında tekrarlanan ikincil çizim.....	201
Şekil 4. 149: Asetonitrilin artan konsantrasyonları varlığında üçüncül çizim.....	201
Şekil 4. 150: Artan asetonitril konsantrasyonunun hesap ile bulunan α değerleri ile değişimi	202

Şekil 4. 151: Artan asetonitril konsantrasyonunun hesap ile bulunan β değerleri ile değişimi	202
Şekil 4. 152: Artan asetonitril konsantrasyonunun hesap ile bulunan K_A değerleri ile değişimi ($r= 8414$).....	202
Şekil 4. 153: Alkalen proteazın k_{cat} değerinin artan asetonitril konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= 0.9941$)	204
Şekil 4. 154: Alkalen proteazın K_m değerinin artan asetonitril konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= -0.9997$).....	204
Şekil 4. 155: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerinin artan asetonitril konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= 0.9989$)	205
Şekil 4. 156: Alkalen proteazın $\Delta G^\#$ değerinin artan asetonitril konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= -0.9912$).....	205
Şekil 4. 157: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-T}^\#$ değerinin artan asetonitril konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= -0.9906$)	205
Şekil 4. 158: Alkalen proteazın ΔG_{E-S} değerinin artan asetonitril konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= -0.9996$)	206
Şekil 4. 159: Artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin k_{cat} değerlerinin değişimi ($r= 0.9788$)	207
Şekil 4. 160: Artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin K_m değerlerinin değişimi ($r= -0.9890$)	207
Şekil 4. 161: Artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin k_{cat}/K_m değerlerinin değişimi ($r= 0.9914$)	208
Şekil 4. 162: Artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin $\Delta G^\#$ değerlerinin değişimi ($r= 0.9856$).....	208
Şekil 4. 163: Artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin $\Delta G_{E-T}^\#$ değerlerinin değişimi ($r= -0.9849$)	208
Şekil 4. 164: Artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin ΔG_{E-S} değerlerinin değişimi ($r= -0.9905$)	209
Şekil 4. 165: Alkalen proteazın k_{cat} değerleri ile artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9941$)	210
Şekil 4. 166: Alkalen proteazın K_m değerleri ile artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9997$).....	210
Şekil 4. 167: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerleri ile artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9989$)	211
Şekil 4. 168: Alkalen proteazın $\Delta G^\#$ değerleri ile artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9912$).....	211
Şekil 4. 169: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-T}^\#$ değerleri ile artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9979$).....	211
Şekil 4. 170: Alkalen proteazın ΔG_{E-S} değerleri ile artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9996$)	212
Şekil 4. 171: %30 DMSO varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	213
Şekil 4. 172: %35 DMSO varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	214
Şekil 4. 173: %40 DMSO varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	215

Şekil 4. 174: %45 DMSO varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	216
Şekil 4. 175: DMSO'nun artan inhibisyon konsantrasyonları varlığında oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramı.....	217
Şekil 4. 176: DMSO'nun artan inhibisyon konsantrasyonları varlığında Şekil 4.175'teki doğruların interseptlerinin ve görünen K_m 'lerinin resiprokalarının DMSO konsantrasyonuna karşı işaretlenmesiyle oluşturulan ikincil çizimi.....	218
Şekil 4. 177: Alkalen proteazın k_{cat} değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= -0.9832$).....	219
Şekil 4. 178: Alkalen proteazın K_m değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= -0.9569$).....	220
Şekil 4. 179: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= -0.8469$).....	220
Şekil 4. 180: Alkalen proteazın aktivasyon serbest enerjisinin ($\Delta G^\#$) artan DMSO inhibisyon konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= 0.9885$).....	220
Şekil 4. 181: Alkalen proteazın geçiş hali serbest enerjisinin ($\Delta G_{E-T}^\#$) artan DMSO inhibisyon konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= 0.8451$).....	221
Şekil 4. 182: Alkalen proteazın substrat bağlama serbest enerjisinin (ΔG_{E-S}) artan DMSO inhibisyon konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= -0.9658$).....	221
Şekil 4. 183: Alkalen proteazın k_{cat} değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r= -0.9832$)222	222
Şekil 4. 184: Alkalen proteazın K_m değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r= -0.9569$)223	223
Şekil 4. 185: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r= -0.8496$)223	223
Şekil 4. 186: Alkalen proteazın $\Delta G^\#$ değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r= 0.9885$) 223	223
Şekil 4. 187: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-T}^\#$ değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r= 0.8451$) 224	224
Şekil 4. 188: Alkalen proteazın ΔG_{E-S} değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r= -0.9658$)224	224
Şekil 4. 189: Alkalen proteazın k_{cat} değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r= 0.9832$) 226	226
Şekil 4. 190: Alkalen proteazın K_m değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r= 0.9569$) 226	226
Şekil 4. 191: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r= 0.8496$) 227	227
Şekil 4. 192: Alkalen proteazın $\Delta G^\#$ değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r= -0.9885$)227	227
Şekil 4. 193: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-T}^\#$ değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r= -0.8451$)227	227
Şekil 4. 194: Alkalen proteazın ΔG_{E-S} değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r= 0.9658$) 228	228
Şekil 4. 195: %2.5 DMSO varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	229
Şekil 4. 196: %5 DMSO varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	230

Şekil 4. 197: %10 DMSO varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	231
Şekil 4. 198: %20 DMSO varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı	232
Şekil 4. 199: DMSO'nun artan aktivasyon konsantrasyonları varlığında oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramı.....	233
Şekil 4. 200: DMSO'nun artan aktivasyon konsantrasyonları varlığında Şekil 199'daki doğruların eğim ve interseptlerinin DMSO konsantrasyonuna karşı işaretlenmesiyle oluşturulan ikincil çizimler	234
Şekil 4. 201: DMSO'nun artan aktivasyon konsantrasyonları varlığında oluşturulan üçüncül çizimi	234
Şekil 4. 202: Alkalen proteazın k_{cat} değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= 0.9646$).....	236
Şekil 4. 203: Alkalen proteazın K_m değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= -0.8441$).....	236
Şekil 4. 204: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= 0.9295$).....	236
Şekil 4. 205: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= -0.9566$).....	237
Şekil 4. 206: Alkalen proteazın ΔG_{E-T}^\ddagger değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= -0.9158$).....	237
Şekil 4. 207: Alkalen proteazın ΔG_{E-S} değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= -0.8484$).....	237
Şekil 4. 208: Alkalen proteazın k_{cat} değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonlarıyla ilişkili Log P değerleri ile lineer olarak değişimi ($r= 0.9720$).....	238
Şekil 4. 209: Alkalen proteazın K_m değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonlarıyla ilişkili Log P değerleri ile lineer olarak değişimi ($r= -0.7731$)	239
Şekil 4. 210: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonlarıyla ilişkili Log P değerleri ile lineer olarak değişimi ($r= -0.8774$)	239
Şekil 4. 211: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonlarıyla ilişkili Log P değerleri ile lineer olarak değişimi ($r= -0.9661$)	239
Şekil 4. 212: Alkalen proteazın ΔG_{E-T}^\ddagger değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonlarıyla ilişkili Log P değerleri ile lineer olarak değişimi ($r= -0.8596$)	240
Şekil 4. 213: Alkalen proteazın ΔG_{E-S} değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonlarıyla ilişkili Log P değerleri ile lineer olarak değişimi ($r= -0.7783$)	240
Şekil 4. 214: Alkalen proteazın k_{cat} değerleriyle artan DMSO aktivasyon konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9650$)	241
Şekil 4. 215: Alkalen proteazın K_m değerleriyle artan DMSO aktivasyon konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.8437$)	242

Şekil 4. 216: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerleriyle artan DMSO aktivasyon konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9292$)	242
Şekil 4. 217: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger değerleriyle artan DMSO aktivasyon konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9567$)	242
Şekil 4. 218: Alkalen proteazın ΔG_{E-T}^\ddagger değerleriyle artan DMSO aktivasyon konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9155$)	243
Şekil 4. 219: Alkalen proteazın ΔG_{E-S} değerleriyle artan DMSO aktivasyon konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.8480$)	243

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. 1: Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması	2
Tablo 2. 1: Proteolitik enzimlerin çeşitli endüstriyel kullanımları	3
Tablo 2. 2: Endüstriyel öneme sahip alkalen proteazlar	5
Tablo 2. 3: Deterjan formülasyonunda ve diğer uygulamalarda kullanılan bazı alkalen proteaz enzimleri	6
Tablo 2. 4: Hayvansal proteazların özgünlüğü	9
Tablo 2. 5: Proteazların hidrolizleme biçimlerine göre sınıflandırılmaları	27
Tablo 2. 6: Şekil 2.30'dan elde edilen doğru denklemleri	73
Tablo 2. 7: Şekil 2.31'den elde edilen doğru denklemleri	73
Tablo 2. 8 Şekil 2.32'den elde edilen doğru denklemleri	74
Tablo 2. 9: Şekil 2.33'den elde edilen doğru denklemleri	75
Tablo 4. 1: Nativ enzimin K_m ve V_m değerleri.....	100
Tablo 4. 2: Nativ enzimin K_m , V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi.....	100
Tablo 4. 3: %2.5 Metanol varlığında enzimin Şekil 4.11'deki Lineweaver-Burk diyagramından belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	103
Tablo 4. 4: %2.5 Metanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	103
Tablo 4. 5: %5 Metanol varlığında enzimin Şekil 4.12'deki Lineweaver-Burk diyagramından belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	104
Tablo 4. 6: %5 Metanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	104
Tablo 4. 7: %10 Metanol varlığında enzimin Şekil 4.13'deki Lineweaver-Burk diyagramından belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	105
Tablo 4. 8: %10 Metanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	105
Tablo 4. 9: %20 Metanol varlığında enzimin Şekil 4.14'deki Lineweaver-Burk diyagramından belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	106
Tablo 4. 10: %20 Metanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	106
Tablo 4. 11: %25 Metanol varlığında enzimin Şekil 4.15'deki Lineweaver-Burk diyagramından belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	107
Tablo 4. 12: %25 Metanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	107
Tablo 4. 13: %30 Metanol varlığında enzimin Şekil 4.16'deki Lineweaver-Burk diyagramından belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	108

Tablo 4. 14: %30 Metanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	108
Tablo 4. 15: Artan metanol konsantrasyonu varlığında üçüncül çizimlerden yararlanılarak hesaplanan α , β ve K_i değerleri	110
Tablo 4. 16: Artan metanol konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri	111
Tablo 4. 17: Artan metanol konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin termodinamik parametreleri	111
Tablo 4. 18: Farklı metanol konsantrasyonlarına ilişkin log P değerleri	114
Tablo 4. 19: Artan metanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri	116
Tablo 4. 20: %10 Etanol varlığında enzimin Şekil 4.32'deki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	119
Tablo 4. 21: %10 Etanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	119
Tablo 4. 22: %15 Etanol varlığında enzimin Şekil 4.33'deki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	120
Tablo 4. 23: %15 Etanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	120
Tablo 4. 24: %20 Etanol varlığında enzimin Şekil 4.34'teki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	121
Tablo 4. 25: %20 Etanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	121
Tablo 4. 26: %25 Etanol varlığında enzimin Şekil 4.35'teki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	122
Tablo 4. 27: %25 Etanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	122
Tablo 4. 28: %30 Etanol varlığında enzimin Şekil 4.36'daki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	123
Tablo 4. 29: %30 Etanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	123
Tablo 4. 30: Artan etanol konsantrasyonu varlığında ikincil çizimlerden yararlanılarak hesaplanan α , β ve K_i değeri	125
Tablo 4. 31: Artan etanol konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri	125
Tablo 4. 32: Artan etanol konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin termodinamik parametreleri	126
Tablo 4. 33: Artan etanol konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri	128
Tablo 4. 34: Artan etanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri.....	130
Tablo 4. 35: %5 n-propanol varlığında enzimin Şekil 4.51'deki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	133
Tablo 4. 36: %5 n-propanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	133

Tablo 4. 37: %10 n-propanol varlığında enzimin Şekil 4.52'deki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	134
Tablo 4. 38: %10 n-propanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	134
Tablo 4. 39: %12.5 n-propanol varlığında enzimin Şekil 4.53'deki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	135
Tablo 4. 40: %12.5 n-propanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	135
Tablo 4. 41: %15 n-propanol varlığında enzimin Şekil 4.54'teki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	136
Tablo 4. 42: %15 n-propanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	136
Tablo 4. 43: 20% n-propanol varlığında enzimin Şekil 4.55'teki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	137
Tablo 4. 44: 20% n-propanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	137
Tablo 4. 45: Artan n-propanol konsantrasyonu varlığında ikincil çizimlerden yararlanılarak hesaplanan α , β ve K_i değeri	139
Tablo 4. 46: Artan n-propanol konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri	139
Tablo 4. 47: Artan n-propanol konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin termodinamik parametreleri	140
Tablo 4. 48: Artan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri	142
Tablo 4. 49: Artan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri.....	144
Tablo 4. 50: %10 i-propanol varlığında enzimin Şekil 4.70'teki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	147
Tablo 4. 51: %10 i-propanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	147
Tablo 4. 52: %15 i-propanol varlığında enzimin Şekil 4.71'deki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	148
Tablo 4. 53: %15 i-propanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	148
Tablo 4. 54: %20 i-propanol varlığında enzimin Şekil 4.72'deki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	149
Tablo 4. 55: %20 i-propanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	149
Tablo 4. 56: %25 i-propanol varlığında enzimin Şekil 4.73'teki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	150
Tablo 4. 57: 25% i-propanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	150

Tablo 4. 58: %30 i-propanol varlığında enzimin Şekil 4.74'teki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	151
Tablo 4. 59: %30 i-propanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	151
Tablo 4. 60: Artan i-propanol konsantrasyonu varlığında ikincil çizimlerden yararlanılarak hesaplanan α , β ve K_i değeri	152
Tablo 4. 61: Artan i-propanol konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri	153
Tablo 4. 62: Artan i-propanol konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin termodinamik parametreleri	153
Tablo 4. 63: Artan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri	155
Tablo 4. 64: Artan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri.....	157
Tablo 4. 65: %2.5 1,4–dioksan varlığında enzimin Şekil 4.89'daki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	161
Tablo 4. 66: %2.5 1,4–dioksan varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	161
Tablo 4. 67: %5 1,4–dioksan varlığında enzimin Şekil 4.90'daki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	162
Tablo 4. 68: %5 1,4–dioksan varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	162
Tablo 4. 69: 10% 1,4–dioksan varlığında enzimin Şekil 4.91'deki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	163
Tablo 4. 70: %10 1,4–dioksan varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	163
Tablo 4. 71: %15 1,4–dioksan varlığında enzimin Şekil 4.92'deki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	164
Tablo 4. 72: %15 1,4–dioksan varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	164
Tablo 4. 73: 1,4–dioksanın artan konsantrasyonları varlığında üçüncül çizimlerden yararlanılarak hesaplanan α , β ve K_A değerleri.....	166
Tablo 4. 74: Artan 1,4–dioksan konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri	167
Tablo 4. 75: Artan 1,4–dioksan konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin termodinamik parametreleri	167
Tablo 4. 76: Artan 1,4–dioksan konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri	170
Tablo 4. 77: Artan 1,4–dioksan konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri....	173
Tablo 4. 78: %2.5 N,N'–DMF varlığında enzimin Şekil 4.114'deki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	176
Tablo 4. 79: %2.5 N,N'–DMF varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	177
Tablo 4. 80: %5 N,N'–DMF varlığında enzimin Şekil 4.115'teki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri	177

Tablo 4. 81: %5 N,N'-DMF varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	177
Tablo 4. 82: %7.5 N,N'-DMF varlığında enzimin Şekil 4.116'daki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	178
Tablo 4. 83: %7.5 N,N'-DMF varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	178
Tablo 4. 84: %10 N,N'-DMF varlığında enzimin 4.117'deki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	179
Tablo 4. 85: %10 N,N'-DMF varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	179
Tablo 4. 86: %15 N,N'-DMF varlığında enzimin 4.118'deki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	180
Tablo 4. 87: %15 N,N'-DMF varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	180
Tablo 4. 88: N,N'-DMF'nin artan konsantrasyonları varlığında üçüncül çizimlerden yararlanılarak hesaplanan α , β ve K_A değerleri.....	182
Tablo 4. 89: Artan N,N'-DMF konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri	183
Tablo 4. 90: Artan N,N'-DMF konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin termodinamik parametreleri	183
Tablo 4. 91: Artan N,N'-DMF konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri.....	186
Tablo 4. 92: Artan N,N'-DMF konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri	189
Tablo 4. 93: %32.5 Asetonitril varlığında enzimin Şekil 4.140'teki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	193
Tablo 4. 94: %32.5 Asetonitril varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapmalarını içerecek şekilde ifadesi.....	193
Tablo 4. 95: %35 Asetonitril varlığında enzimin 4.141'deki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	194
Tablo 4. 96: %35 Asetonitril varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapmalarını içerecek şekilde ifadesi.....	194
Tablo 4. 97: %37.5 Asetonitril varlığında enzimin 4.142'deki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	195
Tablo 4. 98: %37.5 Asetonitril varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapmalarını içerecek şekilde ifadesi.....	195
Tablo 4. 99: %40 Asetonitril varlığında enzimin 4.143'teki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	196
Tablo 4. 100: %40 Asetonitril varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapmalarını içerecek şekilde ifadesi.....	196
Tablo 4. 101: %42.5 Asetonitril varlığında enzimin Şekil 4.144'teki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	197

Tablo 4. 102: %42.5 Asetonitril varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapmalarını içerecek şekilde ifadesi.....	197
Tablo 4. 103: %45 Asetonitril varlığında enzimin Şekil 4.145'teki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	198
Tablo 4. 104: 45% Asetonitril varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapmalarını içerecek şekilde ifadesi.....	198
Tablo 4. 105: Artan asetonitril konsantrasyonu varlığında hesap ile bulunan α , β , ve K_A parametreleri.....	201
Tablo 4. 106: Artan asetonitril konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri	203
Tablo 4. 107: Artan asetonitril konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin termodinamik parametreleri	203
Tablo 4. 108: Artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri	206
Tablo 4. 109: Asetonitrilin artan konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri ..	210
Tablo 4. 110: %30 DMSO varlığında enzimin Şekil 4.171'deki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	213
Tablo 4. 111: %30 DMSO varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	213
Tablo 4. 112: %35 DMSO varlığında enzimin Şekil 4.172'deki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	214
Tablo 4. 113: %35 DMSO varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	214
Tablo 4. 114: %40 DMSO varlığında enzimin Şekil 4.173'teki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	215
Tablo 4. 115: %40 DMSO varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	215
Tablo 4. 116: %45 DMSO varlığında enzimin Şekil 4.174'teki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri.....	216
Tablo 4. 117: %45 DMSO varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	216
Tablo 4. 118: Artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları varlığında ikincil çizimlerden yararlanılarak hesaplanan K_i değeri	218
Tablo 4. 119: Artan DMSO konsantrasyonu varlığında inhibisyon olması halinde alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri	218
Tablo 4. 120: Artan DMSO konsantrasyonu varlığında inhibisyon olması halinde alkalen proteaz enziminin termodinamik parametreleri.....	219
Tablo 4. 121: Artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri	222
Tablo 4. 122: DMSO'nun artan inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri.....	225
Tablo 4. 123: %2.5 DMSO varlığında enzimin Şekil 4.195'teki Lineweaver-Burk diyagramlarıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri	229

Tablo 4. 124: %2.5 DMSO varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	229
Tablo 4. 125: %5 DMSO varlığında enzimin Şekil 4.196'deki Lineweaver–Burk diyagramlarıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri	230
Tablo 4. 126: %5 DMSO varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	230
Tablo 4. 127: %10 DMSO varlığında enzimin Şekil 4.197'deki Lineweaver–Burk diyagramlarıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri	231
Tablo 4. 128: %10 DMSO varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	231
Tablo 4. 129: %20 DMSO varlığında enzimin Şekil 4.198'deki Lineweaver–Burk diyagramlarıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri	232
Tablo 4. 130: %20 DMSO varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi	232
Tablo 4. 131: Artan DMSO konsantrasyonu varlığında üçüncül çizimlerden yararlanılarak hesaplanan α , β ve K_A değeri	234
Tablo 4. 132: Artan DMSO konsantrasyonu varlığında aktivasyon olması halinde alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri	235
Tablo 4. 133: Artan DMSO konsantrasyonu varlığında aktivasyon olması halinde alkalen proteaz enziminin termodinamik parametreleri.....	235
Tablo 4. 134: Artan DMSO aktivasyon konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri	238
Tablo 4. 135: DMSO'nun artan konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri....	241
Tablo 4. 136: Monoalkollerin farklı konsantrasyonları için hesaplanan solvatokromik parametre değerleri.....	245
Tablo 4. 137: Aprotik çözücülerin ve asetonitrilin farklı konsantrasyonları için hesaplanan solvatokromik parametre değerleri.....	246
Tablo 4. 138: Monoalkollerin α ve β parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} ve V_m) ve termodinamik (ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)	248
Tablo 4. 139: Monoalkollerin α ve E_T^N parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} ve V_m) ve termodinamik (ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)	249
Tablo 4. 140: Monoalkollerin α ve π^* parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} ve V_m) ve termodinamik (ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)	250
Tablo 4. 141: Monoalkollerin β ve E_T^N parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} ve V_m) ve termodinamik (ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)	251

Tablo 4. 142: Monoalkollerin β ve π^* parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} ve V_m) ve termodinamik (ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)	252
Tablo 4. 143: Monoalkollerin π^* ve E_T^N parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} ve V_m) ve termodinamik (ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)	253
Tablo 4. 144: Aprotik çözücülerin β ve E_T^N parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} , K_m , V_m) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)	254
Tablo 4. 145: Aprotik çözücülerin β ve E_T^N parametrelerinin enzimin termodinamik (ΔG^\ddagger , ΔG_{E-S} , ΔG_{E-T}^\ddagger) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)	255
Tablo 4. 146: Aprotik çözücülerin β ve π^* parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} , K_m , V_m) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)	256
Tablo 4. 147: Aprotik çözücülerin β ve π^* parametrelerinin enzimin termodinamik (ΔG^\ddagger , ΔG_{E-S} , ΔG_{E-T}^\ddagger) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)	257
Tablo 4. 148: Aprotik çözücülerin π^* ve E_T^N parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} , K_m , V_m) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)	258
Tablo 4. 149: Aprotik çözücülerin π^* ve E_T^N parametrelerinin enzimin termodinamik (ΔG^\ddagger , ΔG_{E-S} , ΔG_{E-T}^\ddagger) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)	259
Tablo 4. 150: Asetonitrilin solvatokromik parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} , K_m , V_m) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)	260
Tablo 4. 151: Asetonitrilin solvatokromik parametrelerinin enzimin termodinamik (ΔG^\ddagger , ΔG_{E-S} , ΔG_{E-T}^\ddagger) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)	262
Tablo 4. 152: Organik çözücülerin alkalen proteaz üzerindeki solvatokromik parametrelerinin etkinlik sırası	292

***Bacillus clausii* Alkalen Proteazının Su İle Karışabilen Organik Çözücüler Varlığında Kinetik Ve Termodinamik Özelliklerinin İncelenmesi**

Yonca (AVCI) DUMAN

Anahtar Sözcükler: *B.clausii*, serin alkalen proteaz, su ile karışabilen organik çözücüler, kinetik parametreler, termodinamik parametreler, log P, dielektrik sabiti, solvatokromik parametreler, çoklu lineer regresyon.

Özet: Tez çalışmamızda su ile karışabilen sekiz farklı organik çözücünün *Bacillus clausii*'den saflaştırılan alkalen proteaz enziminin kazein hidrolizinin kinetik ve termodinamik özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Başlangıç hızı koşullarında organik çözücüler varlığında ve yokluğunda alkalen proteazın Michaelis-Menten parametreleri (K_m , V_m , k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri) belirlendiğinde metanolün enzim üzerinde kısmi non-kompetitif inhibisyon; etanol, n-propanol ve i-propanolün ise gerçek non-kompetitif inhibisyon etkisi yaptığı görülmüştür. N,N'-DMF, 1,4-dioksanın artan konsantrasyonları ve DMSO'nun %20 konsantrasyonuna kadar enzim üzerinde zorunlu olmayan aktivasyon etkisi oluşurken DMSO'nun daha yüksek konsantrasyonlarında enzim üzerinde gerçek un-kompetitif inhibisyon etkisi gözlenmiştir. Asetonitrilin artan konsantrasyonları varlığında enzim üzerinde aktivasyon etkisi görülmüş ancak Lineweaver-Burk diyagramından yararlanılarak oluşturulan ileri çizimlerden anlamlı doğrular elde edilemediğinden zorunlu olmayan aktivasyon modeline oturtulamamıştır. Organik çözücülerin artan konsantrasyonlarda varlığında enzimle kazein hidrolizine ilişkin termodinamik değerler olan ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger , ΔG_{E-S} değerleri Michaelis-Menten parametrelerinden yararlanılarak hesaplanmış ve kinetik ve termodinamik parametreler ile çözücü konsantrasyonları arasında lineer ilişkiler belirlenmiştir. Her bir organik çözücünün farklı konsantrasyonlardaki log P değerleri ve dielektrik sabitleri hesaplanarak enzimle kazein hidrolizinin kinetik ve termodinamik parametreleri ile log P değerleri ve dielektrik sabitleri arasında oluşturulan grafiklerden bu parametrelerin birbirleri ile de lineer olarak değiştiği görülmüştür. Tez çalışmasında kullanılan organik çözücülerin çalışılan konsantrasyonlardaki solvatokromik parametreleri hesaplanmış ve çoklu lineer regresyon yöntemi ile hangi solvatokromik parametrenin enzimin kinetik ve termodinamik özellikleri üzerinde daha fazla etkisinin olduğu belirlenmiştir.

The Investigation of Kinetic and Thermodynamic Properties of *Bacillus clausii* Alkaline Protease in the Presence of Water Miscible Organic Solvents

Yonca (AVCI) DUMAN

Key words: *B. clausii*, serine alkaline protease, water miscible organic solvents, kinetic parameters, thermodynamic parameters, log P, dielectric constant, solvatochromic parameters, multiple linear regression.

Abstract: In this study the effect of 8 different water miscible organic solvents on kinetic and thermodynamic properties for the casein hydrolysis by *Bacillus clausii* alkaline protease were examined. Effects of organic solvents on the Michaelis-Menten parameters (K_m , V_m , k_{cat} and k_{cat}/K_m) were determined at the initial reaction rate conditions. Methanol caused to the partial competitive inhibition of enzyme whereas ethanol, n-propanole and i-propanole showed pure non-competitive inhibition. Increasing concentrations of N,N'-DMF and 1,4-dioxane and concentration of DMSO until 20% caused to the activation of enzyme, whereas DMSO at concentrations higher than 20% showed un-competitive inhibition. The increasing concentrations of acetonitrile caused to the activation of enzyme, but secondary and tertiary plots derived from Lineweaver-Burk diagrams showed that the activation of enzyme with acetonitrile isn't compatible with non-essential activation kinetic model. Thermodynamic values of enzyme for casein hydrolysis were calculated by using Michaelis-Menten parameters. The linear relations were found between the kinetic and thermodynamic values of enzyme and increasing organic solvent concentrations. Dielectric constants and log P values at different organic solvent concentrations were calculated and linear relations were found between kinetic and thermodynamic properties of enzyme and dielectric constants and log P values of organic solvents. The solvatochromic parameters of different organic solvent concentrations. The relations between solvatochromic parameters and kinetic and thermodynamic properties of enzyme were estimated by using multiple linear regression calculations. The multiple linear regression calculations showed that there are linear relations between solvatochromic parameters of organic solvents and the kinetic and thermodynamic properties of enzyme. The most effective solvatochromic parameter of each organic solvent was determined by this method.

1. GİRİŞ

1.1 Enzimler

Enzimler (biyokatalizörler) katalitik özelliğe sahip protein molekülleridir. Biyokimya tarihinin çoğu enzim araştırmalarına dayanır. Biyolojik kataliz; ilk olarak mide salgılarıyla etin sindirimi üzerine yapılan çalışmalarda 1700'lü yıllarda keşfedilmiş, 1800'lerde tükürük ve çeşitli bitki ekstraktlarıyla nişastanın şekere dönüşümü çalışılmıştır. Aynı yüzyıl içinde Louis Pasteur şekerin maya ile alkole fermentasyonunu, Eduard Buchner fermentasyonun hücre özütlerinde işlevine devam eden moleküller tarafından sağlandığını keşfetmiş, Frederic W. Kühne bu molekülleri enzim olarak adlandırmıştır.

James Sumner tarafından 1962 yılında izole edilen kristallendirilen üreazın proteinlerden oluştuğu bulunmuş; bunu pepsin, tripsin ve diğer enzimlerin kristallendirilmesi ile protein olduklarının bulunması izlemiştir. J.B.S. Haldane enzim ve substratı arasındaki zayıf bağlı etkileşimlerin substratın yapısını değiştirdiğini ve enzimin bir tepkimeyi katalizlemekte kullanılabileceğini önermiştir. Bu öngörü bugünkü enzimatik katalizin anlaşılmasının temelini oluşturmaktadır.

Yirminci yüzyılın sonlarında hücre sel metabolizmadaki tepkimeleri katalizleyen enzimler üzerinde araştırmalar yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalar binlerce enzimin saflaştırılmasına, yapılarının aydınlatılmasına ve katalitik mekanizmaları ile enzimlerin nasıl çalıştığının anlaşılmasına yol açmıştır [1].

1.2 Enzimlerin Çalışma İlkesi

Canlı sistemlerde tepkimeler enzimatik kataliz ile gerçekleşir. Pek çok biyolojik molekül nötral pH, vücut sıcaklığı ve hücre içi sıvı ortamında kararlıdır. Bu koşullar altında katalizlenmeyen tepkimeler oldukça yavaş gerçekleşir. Yiyeceklerin sindirimi, sinir uyarılarının gönderilmesi ya da kas kasılması gibi tepkimeler enzimatik kataliz olmadan gerçekleşemez.

Enzimatik tepkimeler enerjetik olarak uygun ortamlar oluşturularak gerçekleşir. Enzim ile katalizlenen tepkimeler; substratın bağlandığı enzimin aktif bölgesinde gerçekleşir. Substratın bağlandığı enzim-substrat kompleksi enzim aktivitesinde önemli bir rol oynar. Oluşan kompleks aynı zamanda enzimatik kataliz ile oluşan tepkimenin kinetik davranışlarını açıklayan matematiksel işlemlerin başlangıç noktasını oluşturmaktadır [1, 2].

1.3 Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler katalizledikleri tepkimelere göre altı temel sınıfa ayrılmışlardır. Her enzime, katalizlediği tepkimeye göre dört sayıdan oluşan sınıflandırma numarası verilmiştir (Tablo 1.1.) [1].

Tablo 1. 1: Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması [1]

No.	Sınıf	Katalizlediği tepkime türü
1	Oksidoredüktazlar	Elektron transferi tepkimeleri (hidrit iyonları ve H atomları ile)
2	Transferazlar	Grup-transfer tepkimeleri
3	Hidrolazlar	Hidroliz tepkimeleri (işlevsel grupların suya transferi)
4	Liyazlar	Çift bağlara grupların ilavesi ve grupların yer değiştirmesi ile çift bağların oluşumu tepkimeleri
5	İzomerazlar	İzomerik yapıları oluşturmak üzere molekül içerisinde grup transferi tepkimeleri
6	Ligazlar	ATP'nin harcanması ile eşleşmiş C-C, C-S, C-O, C-N bağlarının oluşumuna yol açan kondanzasyon tepkimeleri

2. PROTEOLİTİK ENZİMLER

2.1 Proteolitik Enzimlerin Enzim Teknolojisindeki Yeri

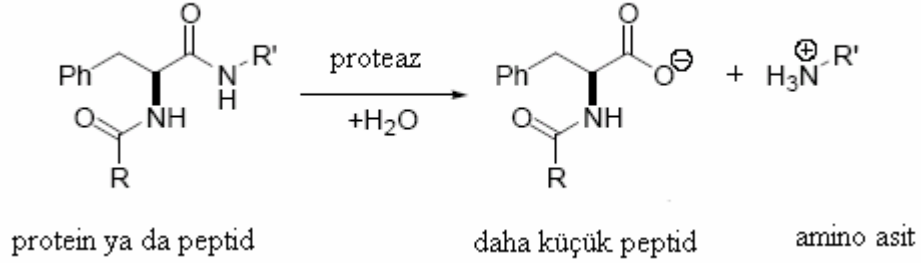
Fonksiyonları ve nitelikleri göz önüne alındığında protein yıkımını sağlayan proteolitik enzimler (proteazlar) endüstriyel enzimlerin en önemli sınıfını oluşturmaktadır [2]. Endüstride kullanılan enzimlerin % 75'ini hidrolitik enzimler oluştururken, proteazlar % 75'lik grubun % 50'sini oluşturmaktadır [3,4,9]. Proteazlar hedefledikleri peptid bağlarını hidrolizleyen hidrolazlar sınıfına ait enzimlerdir. Bu enzimlerin değişik kaynaklardan izole edilen bazı sınıfları nötral pH'nın üstündeki aşırı uçtaki pH'larda yüksek kataliz yeteneğine sahip olmaları nedeni ile endüstriyel kullanımda oldukça önem kazanmışlardır. 1994 yılında 400 milyon \$ olan toplam endüstriyel pazarın 112 milyon dolarlık kısmını deterjan katkı maddesi olarak proteazlar oluşturmuştur [5]. Proteazların deterjan deri, et, süt, fırıncılık endüstrisinde kullanılmasının yanı sıra rasemik karışımların ayrılması, peptid sentezi, X-ışınlar (röntgen) filmlerinden jelatin tabakasının hidrolizi ile gümüşün geri kazanımı gibi birçok kullanım alanı oluşmuştur [6-9]. Tablo 2.1'de proteolitik enzimlerin endüstriyel kullanımları özetlenmiştir [4].

Tablo 2. 1: Proteolitik enzimlerin çeşitli endüstriyel kullanımları [4]

Endüstri	Kullanım alanı
Meşrubat	Granül proteinlerin çözünmesi, biranın stabilizasyonu
Deterjan	Protein kaynaklı kirlerin katalitik olarak yıkımı
Ekmek/Pasta	Gluten elastikliğinin modifikasyonu
Peynir üretimi	Kazeinin kesilmesi, lor oluşumu, peynir üretimi
Derinin işlenmesi	Tüy giderme, deri yumuşatma
Et	Etin yumuşatılması

2.2 Proteazlar

Proteazlar proteinlerdeki peptid bağının hidrolitik bölünmesini katalizler (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1: Peptid bağını hidrolizleyen proteazların reaksiyonu

Proteazlar, hidrolazlar sınıfına ait (no: 3) enzimlerdir. Peptidaz ya da peptid hidrolazlar olarak da isimlendirilirler. Proteazlar; bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı olabilirler. Proteaz kaynağı olarak bitkilerin kullanılmasını etkileyen çeşitli faktörler vardır. Yetiştirilmeleri için toprağın uygunluğu, iklim koşullarının elvermesi ve bitkilerden proteaz eldesinin zaman isteyen işlem olması bunlardan en önemlileridir. Papain, bromolein ve keratinaz yaygın olarak bilinen bitkisel kaynaklı proteazlardır.

Hayvansal kaynaklı olarak en iyi bilinen proteazlar; pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve rennindir. Bu proteazlar oldukça fazla miktarda elde edilmelerine karşın hayvan stoklarının oluşturulması ve bunların kesim işlemleri hükümet ve tarım politikalarına bağlıdır.

Mikrobiyal proteazlar enzimolojide; geniş çalışma alanından ve çok ucuz ve kolay ulaşılabilir ve kolay çoğaltılabilir mikroorganizmalardan elde edildiğinden dolayı en önemli hidrolitik enzim sınıfını oluşturmaktadır. Mikroorganizmalar proteazı hücre içi ya da hücre dışı olarak üretebilmektedirler. Hücre içi proteazlar enzimlerin ve hormonların mutarotasyonu, hücresel protein miktarının sabitlenmesi gibi çeşitli hücresel ve metabolik süreçler için önem taşımaktadır. Hücre dışı proteazlar proteinlerin hidrolizi ve hidrolitik ürünlerin kullanılması ve aynı zamanda çeşitli endüstriyel işlemlerde protein yıkımına yardımcı olması açısından önemlidir. Bakteri kaynaklı proteazlar özellikle *Bacillus* cinsine ait nötral ve alkalin proteazlar ticari

olarak en çok kullanılan proteazlardır. [6,10-12]. Tablo 2.2’de bazı endüstriyel öneme sahip alkalen proteaz enzimleri verilmiştir [6].

Tablo 2. 2: Endüstriyel öneme sahip alkalen proteazlar [6]

Üreten mikroorganizma	Mikroorganizma kökeni	Optimum pH	Endüstriyel uygulamaları
<i>Streptococcus</i> sp.	Bakteri	8.0	Süt/peynir üretimi
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Bakteri	9.5	Deterjan ve deterjan tozları
<i>Tritriachium album</i> (Proteinaz T)	Fungus	9.0-12.0	Çamaşır deterjanları formülasyonu
<i>Tritriachium album</i> (Proteinaz T)	Fungus	7.0-10.0	Çamaşır deterjanları formülasyonu
<i>Conidiobolus coronatus</i> (alkali proteinaz B)	Fungus	9.7	D,L fenilalanin ve glisinin rasemik karışımlarının ayrılması
<i>Bacillus</i> sp. Y. (BYA)	Bakteri	10.0-12.5	Çamaşır deterjanları formülasyonu
<i>Bacillus firmus</i>	Bakteri	8.0	Deterjan endüstrisi
<i>Bacillus</i> sp.	Bakteri	8.5-9.5	Doğal atıklardan biyokütle üretimi
<i>Bacillus</i> sp	Bakteri	8.5	Tüy giderme/deri endüstrisi
<i>Bacillus</i> sp (Savinaz/Durazim)	Bakteri	9.0-11.0	Deterjan formülasyonları
<i>Bacillus licheniformis</i> (Alkalaz)	Bakteri	8.2	Biyolojik olarak aktif peptidlerin sentezi

Proteaz enzimi *Bacillus* cinsine ait alkalifilik mikroorganizmalar tarafından bol miktarda üretilir. Bu yüzden alkalifilik *Bacillus* suşları hem endüstriyel uygulamaları hem de akademik çalışmalar açısından oldukça önem taşımaktadır [6,12]. *Bacillus* cinsi tarafından hücre dışı olarak üretilen proteaz enzimi çeşitli mikroorganizmalar arasında ticari olarak en uygun olanıdır [9]. Bazı *Bacillus* suşları tarafından oldukça fazla miktarlarda sentezlenen alkalen proteazlar yüksek pH ve sıcaklıktaki kararlılıklarından dolayı deterjan endüstrisinde katkı maddesi olarak tercih edilmektedirler [6,13-20]. Tablo 2.3’de deterjan endüstrisinde kullanılan bazı alkalen proteaz enzimleri verilmiştir.

Tablo 2. 3: Deterjan formülasyonunda ve diğer uygulamalarda kullanılan bazı alkale proteaz enzimleri [15,18]

Ticari isim	Kaynak mikroorganizma	Optimum pH	Optimum sıcaklık (oC)	Üretici Firma
Alkalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	8-9	60	Novo Nordisk
Savinase	Alkalophilic B. Clausii	9-11	55	Genencor
Esperase	Alkalophilic B. Clausii	9-11	60	Novo Nordisk
Opticlean	Alkalophilic B. Clausii	10-11	50-60	Solvay
Optimase	Alkalophilic B. Clausii	9-10	60-65	Solvay
Alkaline protease	<i>B. clausii</i>	10-11	40-50	Wuxi Synder Bioproducers
Proleather	Alkalophilic B. Clausii	10-11	60	Amano Pharmaceuticals
Protease P	<i>Asprcillus sp</i>	8	40	Amano
Purafect	<i>B. lentus</i>	10	40-65	Genencor

Deterjan endüstrisinde kullanılan *Bacillus* türüne ait alkale proteazların saflaştırması ve karakterizasyonuna ilişkin literatürde birçok çalışma bulunmaktadır [21-25].

2.2.1 Proteazların sınıflandırılması

Proteazların sınıflandırılması; kaynaklarına, aktif bölgelerindeki fonksiyonel gruplarına ve proteinleri hidrolizleme biçimlerine göre yapılabilir.

I Kaynağına Göre Proteazlar

I.1. Bitkisel Proteazlar

I.2. Hayvansal Proteazlar

I.3. Mikrobiyal Proteazlar

II. Aktif Bölgelerindeki Fonksiyonel Gruplarına Göre Proteazlar

- II.1. Serin Proteazlar
- II.2. Sistein Proteazlar
- II.3. Aspartil Proteazlar
- II.4. Metalo Proteazlar
- III. Proteinleri Hidrolizleme Biçimlerine Göre Proteazlar
 - III.1. Ekzopeptidazlar
 - III.1.1. Aminopeptidazlar
 - III.1.2. Karboksipeptidazlar
 - III.2. Endopeptidazlar
 - III.2.1. Serin Proteazlar
 - III.2.2 Sistein Proteazlar
 - III.2.3. Aspartil Proteazlar
 - III.2.4. Metalo Proteazlar.

2.2.1.1 Kaynağına göre proteazlar

Proteazların canlı organizmalarda fizyolojik olarak bulunma zorunlulukları vardır. Bu nedenle proteaz kaynakları bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal olarak geniş bir yelpazeye yayılmışlardır.

Bitkisel kaynaklı proteazlardan en yaygın olarak bilinenleri papain, bromolein ve keratinazdır. Papain Afrika ve Hindistan'da yetişen *Carica papaya* meyvesinden izole edilmiştir. Üç tane disülfid köprüsü ile stabilize olmuş 212 adet amino asitten oluşmuştur. Katalitik triadını sistein 25, histidin 159, asparajin 158 oluşturmaktadır. Molekül ağırlığı 23 kDa'dur. pH 5-9 arasında aktiftir, 80-90 °C sıcaklıkta kararlılığını koruyabilmektedir. Endüstride hayvan derisinin işlenmesi, meşrubatların berraklaştırılması, sindirim amaçlı ilaç üretimi, yüksek çözünürlüğe sahip protein hidrolizatlarının oluşumu ve acılığın giderilmesi gibi yaygın kullanım alanı olması ile birlikte en çok et endüstrisinde etin yumuşatılmasında kullanılmaktadır [4,10,26-28].

Bromolein, ananas bitkisinden (*Ananas comosus*) elde edilen sülfidril içeren proteolitik enzimlere verilen genel bir addır. Bromolein; ananas suyundan elde edilir. Sistein proteaz olarak da karakterize edilebilir. pH 5-9 arasında stabildir ancak 70 °C sıcaklıkta inaktive olur. Bromoleinin primer bileşeni bir sülfidril proteolitik fraksiyonudur. Bromolein ayrıca, peroksidaz, asit fosfataz, çeşitli proteaz inhibitörleri ve organik bağlı kalsiyumu da içerir. Bromolein vücuttaki proteinleri degrade eden bir enzimdir. Dolayısıyla onun ilk fark edilen özelliği sindirimi kolaylaştıran bir madde olmasıdır. Bu yüzden gıda sanayisinde et yumuşatıcı olarak kullanılmaktadır. Bu enzim sadece mide asidine yardımcı olmakla kalmayıp, aynı zamanda bağırsaklardaki alkalen ortama da olumlu tesirler yapmaktadır. Bu nedenle sindirim sistemi enzimlerinden pepsin ve tripsin gibi düşünülür. Bromolein kullanımı sadece sindirim sistemini desteklemekle sınırlı değildir. İltihap giderici etkisi sayesinde romatoid artrit ve sinüzit tedavisinde yardımcı olduğu da klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bromolein, aşırı trombosit yapışkanlığını önlediği için doğal bir kan incelticidir [4,10,29-31].

Bitkisel kaynaklı bir diğer proteaz kıl ve tüy yıkımını sağlayan keratinazdır. Bu tür protein yapılarının yıkımı ve sindirimi lizin gibi zaruri (essential) amino asitlerin sentezi ve atık su sistemlerinde bulunan doğal atıkların parçalanması için önemlidir. Keratin hidrolizatlarından sistein eldesi de önem taşımaktadır. Kozmetik endüstrisinde çözülmüş keratin ürünleri kullanılmaktadır. Keratin yapısal yoğunluğundan ve içerdiği çok sayıdaki disülfid bağlarından dolayı enzim ile muamele edilmeden önce öğütülmeli ve sodyum disülfid, sodyum hiposülfid tiyoglikolik asit ya da merkaptolanol gibi indirgen ajanlar ile ön işleme tutulmalıdır. Disülfid köprülerinin redüklenmesinden sonra keratin keratinaz varlığında hidrolizlenmektedir [3,10].

Hayvansal kaynaklı protein hidrolizleyen enzimler enzimolojinin başlangıcından beri bilinmekte ve kullanılmaktadır. Hayvansal kaynaklı proteazlardan en bilinenler pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve rennindir. Tablo 2.4'te bu enzimlerin özgünlük gösterdiği peptid bağları gösterilmiştir. Bu enzimler oldukça fazla hacimlerde saflaştırılabilirler. Ancak üretimleri hayvansal kaynaklara ve ülke politikalarına bağlıdır. Hayvansal kaynaklı proteazlar gıda endüstrisinde protein

hidrolizatlarının üretiminde, et ve balık ürünlerinin işlenmesinde kullanılmaktadırlar. Pankreatik proteazların büyük bir çoğunluğu deri endüstrisinde kullanılmaktadır. İlaç endüstrisinde sindirim amaçlı ilaçların üretiminde kullanılmaktadırlar [3,10].

Tablo 2. 4: Hayvansal proteazların özgünlüğü [10]

Enzim	Spesifik olduğu bağ
Tripsin	-Lys (ya da Arg)--- [∇]
Kimotripsin, subtilisin	-Trp (ya da Try, Phe, Leu)--- [∇]
Pepsin	-Phe(ya da Tyr, Leu) [∇] - Trp (ya da Phe,Tyr)
Termolizin	--- [∇] Leu (ya da Phe)
Rennin	-Phe [∇] -Met-

Tripsin (EC 3.4.21.4) molekül ağırlığı 23.3 kDa olan ve gıda proteinlerinin sindirimi için kullanılan pankreas kaynaklı, ince bağırsakta proteinleri parçalayan; temel hayvansal proteazdır. Katalitik triadını serin, histidin ve aspartat oluşturur. Bu yüzden serin proteaz sınıfına dahildir. Optimum pH'sı 8 ve optimum sıcaklığı da 37 °C'dir. Tripsin istenmeyen hücrel protein yıkımını önlemek için pankreastan ince bağırsağa inaktif zimojen (tripsinojen) olarak salgılanır ve orada enterokinaz proteazları ile aktif formunu oluşturur. Oluşan aktif form lizin ve arjinin kalıntıları tarafından oluşturulan peptid bağlarına karşı özgünlük gösterir. Pankreatik tripsinojen katyonik (tripsinojen-1), anyonik (tripsinojen-2) ve mezotripsinojen (tripsinojen-3) olmak üzere 3 izoyapıdan oluşur. Katyonik ve anyonik tripsinler sindirim amaçlı protein yıkım enzimlerinin ana izo yapılarıdır ve 2:1 oranında salgılanırken mezo yapısı % 5 oranında salgılanır. Mezotripsin ise; tripsin inhibitörlerine karşı direnç gösteren özelleştirilmiş proteazdır. Tripsin inhibitörlerinin yıkımında özel rol oynamaktadır.

Tripsin pankreastan çok miktarlarda izole edilebilmektedir ve biyoteknolojik proseslerde geniş yelpazede kullanım alanı bulunmaktadır. Süt tozu solüsyonuna tripsin ilave edildiğinde kazeinin hidrolizlenmesini sağlar. Bebek gıdalarında ön hidroliz işleminde kullanılmaktadır. Böylelikle protein molekülleri arasındaki bağları kırarak bebekler için sindirim işlemini kolaylaştırmaktadır [4,10,32-35]. Tripsinin

katalitik bölgesindeki amino asitler ile üç boyutlu konformasyonel yapısı şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. 2: Aktif bölgesindeki amino asit kalıntıları siyah çizgiler ile gösterilmiş tripsinin üç boyutlu konformasyonel yapısı [35]

Kimotripsin (EC 3.4.21.1) 23.8 kDa molekül ağırlığına sahiptir, hayvansal pankreatik özütlerinde bulunur. Pankreatik özüt zimojen kimotripsinojenin eşit miktarda iki formunu içermektedir. Molekül ağırlığı 25 kDa, izoelektrik noktası 9.1 olan kimotripsinojen A ve izoelektrik noktası 5.2 olan kimotripsinojen B (E.C.3.4.4.6). Her iki zimojen de toplam pankreatik ekstraktlarının %32’sini oluşturmaktadır. Tripsine benzer olarak ilk etapta inaktif formda sentezlenen kimotripsinojen; tripsin ile birkaç adımlı proses ile aktif formu kimotripsine dönüşür. Kimotripsinin optimum pH’sı 8-9; optimum sıcaklığı 40-45 °C’dir. Kimotripsinin substratları triptofan, tirozin ve fenil alanin gibi aromatik amino asitlerin yaptığı

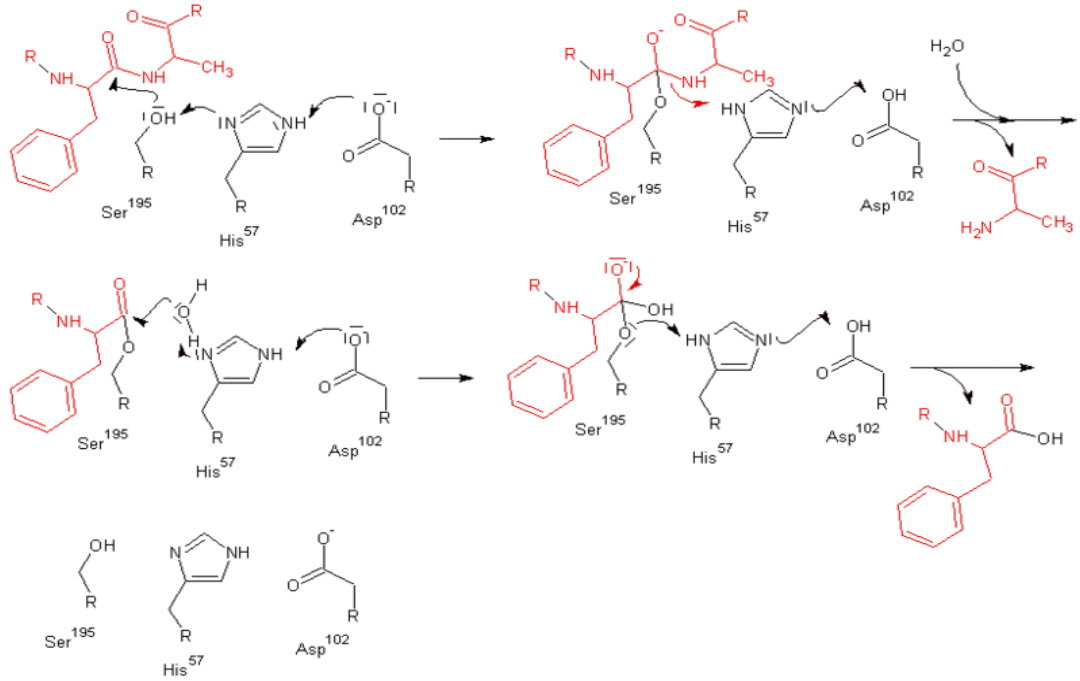
peptid bağlarını içerir. Ancak lösin, metiyonin, asparajin ve glutamin gibi kalıntıların oluşturduğu peptid bağlarını da hidrolizleyebilmektedir. Kimotripsinin katalitik triadını serin 195, histidin 57 ve aspartat 102 kalıntıları oluşturmaktadır. Şekil 2.3’de kimotripsinin katalitik triadı ile birlikte üç boyutlu yapısı verilmiştir. Kataliz; güçlü nükleofil olan serin 195 kalıntısı ile gerçekleşmektedir [4,10,36,37,38].



Şekil 2. 3: Kimotripsinin üç boyutlu yapısı ve serin 195, histidin 57, aspartat 102’den oluşan katalitik triadı [37]

Enzim substrat ara ürününün oluşumunu histidin 57 ve aspartat 102 kalıntıları desteklemektedir. Şekil 2.4’de α -kimotripsinin peptid bağ degradasyonunu gösteren mekanizma verilmiştir. Asidik ortamda kimotripsinin kararlılığı tripsinden daha düşüktür. Saf kimotripsin pahalı bir enzimdir ve sadece diagnostik ve analitik amaçlı kullanılır. Sık kullanılan bir diğer alanı da süt protein hidrolizatlarının allerjenliğinin

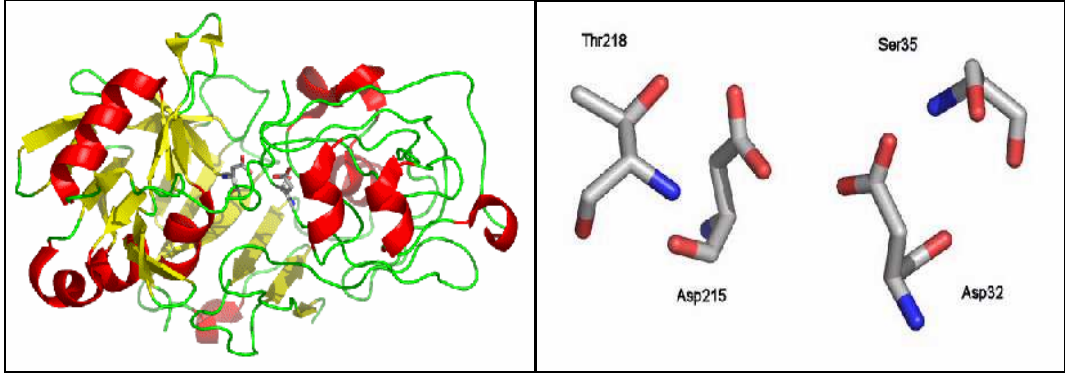
giderilmesidir. Ağır metaller, polifosfatlar, güçlü oksidasyon ajanları ve PMSF (para fenil metil sülfonil florür) inhibitörleri arasında yer almaktadır [10,38].



Şekil 2. 4: α-kimotripsinin peptid bağı hidrolizini gösteren mekanizma [38]

Pepsin (3.4.23.1) tüm omurgalı hayvanların midesinde bulunan 34.5 kDa molekül ağırlığına sahip asidik proteazdır. Pepsin gastrik mukoz membran tarafından nonaktif proenzim olan pepsinojen (molekül ağırlığı 41 kDa) olarak salgılanmaktadır. Pepsinojen; mide asitleri (HCl) ile aktif proteaz yapısına dönüşmektedir. Bu otokatalitik dönüşüm pH 6 civarında gerçekleşip, maksimum dönüşüm hızına pH 2 civarında ulaşmaktadır. Alkalin pH'larda pepsinojen kararlılığını koruyabilirken pepsin hızla inaktif olmaktadır. Pepsinin izoelektrik noktası 1'dir. Ancak 1.7-3.0 değerlerine de rastlanmaktadır. Polipeptid zinciri 321 adet amino asit içermektedir. Aktif bölgesinde katalizden sorumlu iki adet aspartil kalıntısı bulunmaktadır ve aspartil proteaz sınıfına dahildir. Şekil 2.5'te pepsinin üç boyulu yapısı ve aktif bölgesinde bulunan amino asitlerin konumlanması verilmiştir [44]. pH 1.0-2.5 aralığında keratinin de dahil olduğu pek çok protein yapısını hidrolizleyebilmektedir. Gliserol içerisinde oldukça stabil iken; pH 5-5.5 civarındaki sulu çözeltilerde de kararlılığını koruyabilmektedir. Ancak alkalin pH'larda tersinmez olarak inaktif olmaktadır. Aromatik amino asitlere özgünlük gösterir. Fakat glutamik asit, sistein, sistin peptidlerini de hidrolizleyebilmektedir. Endüstride sindirim amaçlı ilaçların

sentezinde protein hidrolizatlarının oluşumunda ve kimosin ve rennin varlığında biranın stabilize edilmesinde kullanılmaktadır [4,10,39,40,41].



Şekil 2. 5: Pepsinin üç boyulu yapısı ve aktif merkezinde bulunan amino asitlerin konumu [41]

Rennin (rennet, lösin amidopeptidaz ya da kimozen) (EC 3.4.23.4) mide hücrelerinden salgılanan proteolitik (protein sindirici) bir enzimdir. Bebeklerin ve yavru hayvanların midelerinden salgılanan bu enzimin rolü, süt kazeinini para-kazein haline çevirerek pıhtılaşmasını sağlamaktır. Doğumu izleyen ilk birkaç gün içinde en yüksek seviyede olan rennin salgısı, zamanla azalarak, sütün pıhtılaştırılması görevini pepsin enzimine devretmekte, bir süre sonra da yerini tamamen pepsine bırakmaktadır [42]. Rennin pepsin benzeri proteazdır. Memeli hayvanların midesinden ilk çıkış şekli inaktif formu prorennin şeklindedir. Sonrasında pepsin tarafından ya da kendiliğinden otokatalitik olarak molekül ağırlığı 30.7 kDa olan aktif rennin formuna dönüşmektedir [10]. Rennin fenilalanin ve metiyonin arasındaki peptid bağına özgünlük gösterir. Bu reaksiyon süte uygulandığında kazeinin hidrofobik (para kazein) ve hidrofilik (asidik glikopeptid) grupları arasındaki bağı sağlayan fenilalanin ve metiyonin bağı kırılır. Ürün olarak çözünmeyen para kazein ve C-terminal glikopeptid oluşur. Bu reaksiyonu ile rennin süt endüstrisinde ve peynir üretiminde kullanılır [10,43].

Proteaz kaynaklarının üçüncü grubunu mikrobiyal proteazlar oluşturmaktadır. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteaz eldesinde karşılaşılan uygun iklim koşullarının sağlanması ve ülkelerin hayvancılık ile ilgili politikalarına bağlılığı gibi dezavantajlar mikrobiyal kaynaklı proteaz eldesine ilgiyi arttırmıştır. Dünya çapındaki enzim satışının yaklaşık %40'ını mikrobiyal proteazlar sağlamaktadır. Bu

enzimler deterjan, gıda, ilaç, deri, atıkların geri kazanımı ve gümüş geri dönüşümü gibi alanlarda kullanılmaktadır. Mikrobiyal kaynaklı proteazlar sahip oldukları karakteristik özelliklerinden dolayı biyoteknolojik uygulamalarda bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteazlara tercih edilmektedirler. Mikrobiyal proteazlar; bakteriyel, fungal ve viral proteazlar olarak üç grupta incelenebilirler [10,11].

Bakteriyel proteazlar ticari olarak en çok kullanılan proteaz sınıfını oluşturmaktadır. *Bacillus* cinsine ait organizmalar tarafından üretilirler. Bakteriyel nötral proteazlar pH 5-8 gibi dar bir aralıkta aktiftirler ve termotoleransları düşüktür. Reaksiyonlarındaki ara ürünlerinden dolayı gıda protein hidrolizatları hayvansal proteazlarınkine oranla daha az acıdır. Bu yüzden gıda endüstrisinde kullanım alanları oldukça geniştir. Nötraz yani nötral proteaz doğal proteinaz inhibitörlerine karşı hassas değildir. Bu yüzden bira endüstrisi için oldukça kullanışlıdır. Bakteriyel nötral proteazlar hidrofobik amino asit çiftlerine karşı yüksek afiniteleri ile karakterize edilirler. Düşük termotoleransları düşük dereceli hidroliz ile gıda hidrolizatlarının oluşturulmasında reaktivitelerinin kontrolü için avantaj sayılabilir. Bazı nötral proteazlar aktivite gösterebilmeleri için divalent metal iyonuna ihtiyaç duyarken; serin proteazlar şelatlayıcı ajanlardan etkilenmemektedirler. Bakteriyel alkalin proteazlar pH 10 gibi yüksek pH'larda gösterdikleri aktiviteleri ile karakterize edilirler. Optimal sıcaklıkları 60 °C civarındadır. Bu özellikleri bakteriyel alkalin proteazları deterjan endüstrisi için oldukça çekici kılmaktadır [10].

Fungal proteazlar bakteriyel proteazlardan daha karmaşık proteaz üreten enzimlerdir. Örneğin *Aspergillus oryzae* asidik, nötral ve alkalin proteaz üretir. Asidik proteazla daha çok fungal kaynaklıdır [44]. Fungal proteazlar pH 4-10 gibi geniş bir spektrumda aktiftir ve geniş bir substrat özgünlüğü sergilemektedir. Ancak sıcaklığa karşı toleransları bakteriyel enzimlerden daha düşüktür. Fungal enzimler katı hal fermentasyon prosesi ile üretilirler. Fungal asidik proteazların optimum pH'sı 4-4.5 arasında olup; pH 2.5-6 arasında kararlılığını koruyabilmektedir. Özellikle dar pH ve sıcaklık özgünlüklerinden dolayı peynir üretiminde kullanışlıdır. Fungal nötral proteazlar pH 7'de aktif olan metaloproteazlar olduklarından şelatlayıcı ajanlar varlığında inhibe olurlar. Bu enzimler protein hidrolizatlarının acılığının

giderilmesinde kullanılırlar. Fungal alkalen proteaz aynı zamanda gıda protein modifikasyonunda da kullanılabilir [10].

Viral proteazlar AIDS ve kanser gibi ölümcül hastalıklara yol açan virüs proteinlerinin üzerindeki etkilerinden dolayı önem taşımaktadırlar. Çeşitli virüslerde serin, aspartik ve sistein peptidazlar bulunmaktadır. Tüm bu virütik peptidazlar endopeptidazlardır, metaloproteaz değildirler. Araştırmalar daha çok viral proteazların üç boyutlu yapıları ve sentetik inhibitörleri ile etkileşimleri üzerine odaklanmıştır [10,45].

Proteazlar doğada geniş bir yelpazede bulunmalarına rağmen mikrobiyal kaynaklı olanlar mikroorganizmaların hızlı üremelerinden, kültürasyon ortamları için ortam koşullarının kontrol edilebilmesinden ve genetik olarak manipüle edilebilirliğinden dolayı enzim üretiminde daha yoğun kullanılmaktadırlar.

2.2.1.2 Aktif bölgelerindeki fonksiyonel gruplarına göre proteazlar

Proteazlar aktif bölgelerindeki fonksiyonel gruplara bağlı olarak serin proteaz, aspartil proteaz, sistein proteaz ve metaloproteaz olmak üzere dört gruba ayrılır. Aktivitesi için ATP ihtiyacı olan ATP-bağımlı proteaz gibi çok az proteazlar standart sınıflandırmaya dahil olmazlar. Bu tür proteazlar farklı bir aile olarak sınıflandırılırlar [10].

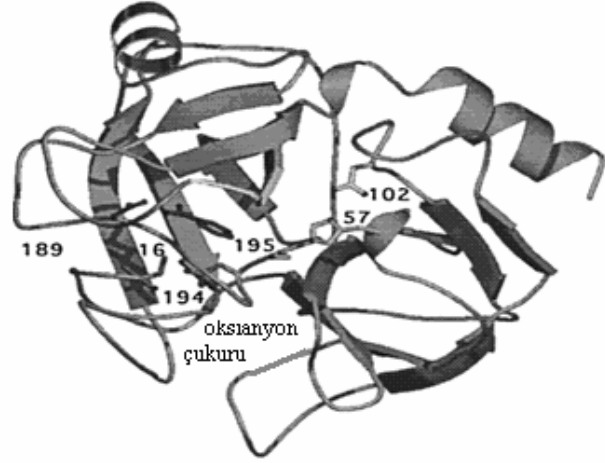
Geniş çaplı çalışılan ilk enzimler serin proteazlar (EC 3.4.21) grubuna dahil olan enzimlerdir. Serin proteazlar aktif bölgelerindeki serin grubu ile karakterize edilirler. Tripsin gibi; bu grup enzimler sindirim enzimleri olarak rol oynar. Öncül proteinlerin proteolitik aktivasyonu için regülatör rol oynaması gibi önemli fonksiyonları da vardır. Regülasyona örnek olarak tripsinojenin enteropeptidazlar ile aktif tripsine dönüşümü verilebilir [46]. Serin proteazlar virüsler, bakteriler ve ökaryotlarda bulunur ve bunların yaşamsal faaliyetleri için büyük önem taşır. Serin proteazlar; endopeptidazlar, ekzopeptidazlar, oligopeptidaz ve omegapeptidaz gruplarında bulunur. Serin proteazların en tipik inhibitörü PMSF'dir (fenilmetilsülfonilflorür). Ancak DFP (di-izopropilflorofosfat), TLCK (tosil-L-lizinkloro metil keton) 3,4-DCI

(3,4-dikloroizokumarin) gibi inhibitörler varlığında da tersinmez olarak inhibisyona uğrarlar. Genelde nötral ve alkalin pH değerlerinde aktiftirler ve pH 7-11 aralığında optimum aktivite gösterirler. Geniş bir substrat özgünlüğüne sahiptirler. Molekül ağırlıkları 18-35 kD, izoelektrik noktaları pH 4-7 arasındadır.

Serin alkalin proteazlar serin proteazların en geniş alt grubunu temsil ederler. Yüksek alkalin pH'da aktivite gösterirler. Bakteri, maya, mantar ve küflerden elde edilirler. DFP ya da patates proteaz inhibitörü tarafından inhibe olurken, TPCK (tosil-L-fenilalaninkloro metil keton) ve TLCK tarafından inhibe olmazlar. Substrat özgünlükleri diğer serin proteazlar ile aynıdır. Peptid bağını tirozin, fenilalanin ya da lösinin karbonil karbonu tarafından hidrolizlerler. Molekül ağırlıkları 15-30 kDa olup, izoelektrik noktaları pH 9 civarındadır [10].

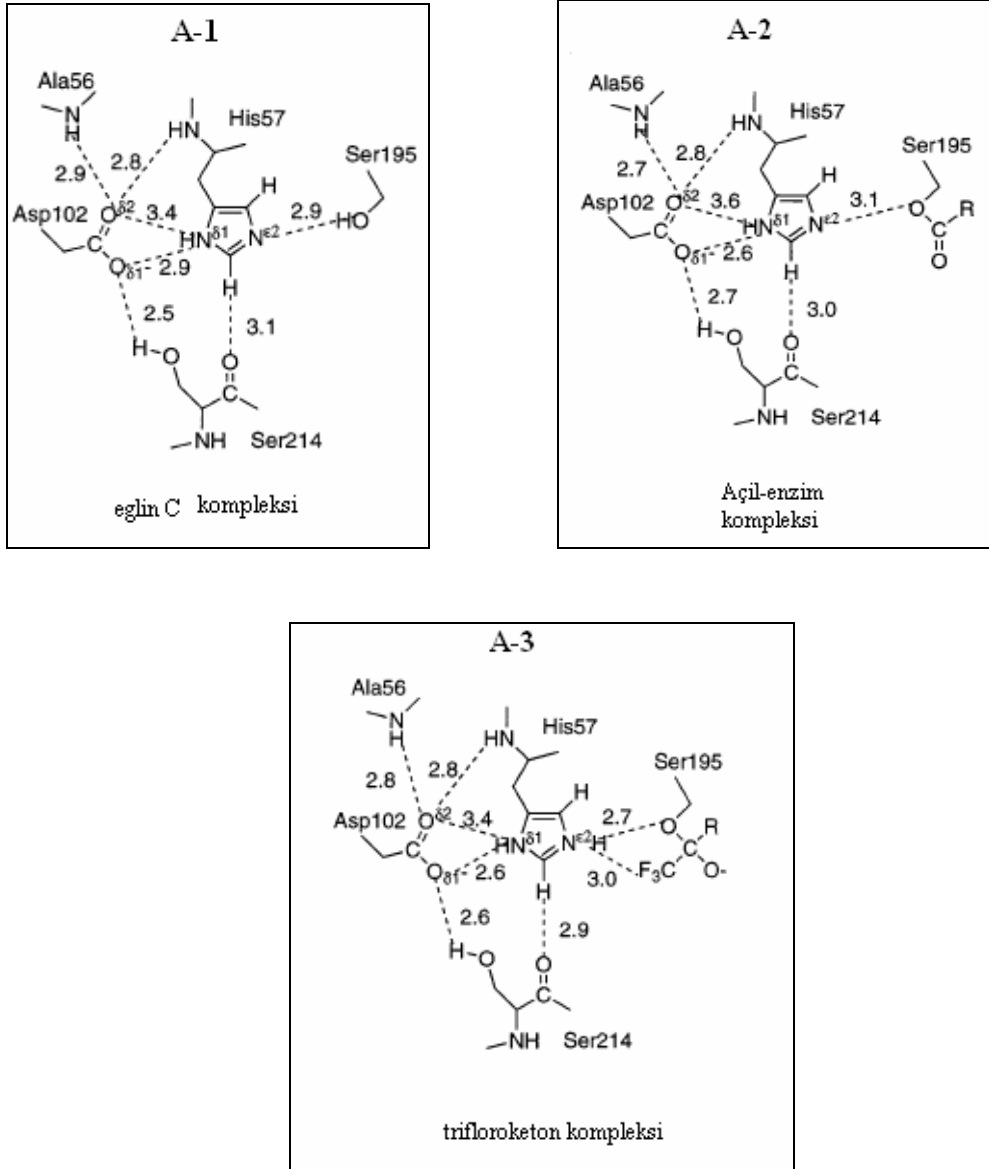
Serin proteazların katalitik triadını üç amino asit kalıntısı oluşturur. Serin (nükleofil), aspartat (elektrofil) ve histidin (baz). Bu kalıntıların geometrik oryantasyonu birbirine benzer olsa da proteinlerin katlanmaları birbirinden farklı olduğu için farklı enzimlerde tamamen farklı yerlerde konumlanmışlardır. Bu katalitik triada sahip dört farklı serin proteaz grubu tanımlanmıştır: kimotripsin benzeri proteazlar, subtilisin benzeri proteazlar, karboksipeptidaz Y ve Clp proteaz. Son yıllarda Ser-His-Glu, Ser-Lys-His, His-Ser-His katalitik triadına sahip serin proteazlar da keşfedilmiştir [46-48].

Kimotripsin benzeri proteazlar 240'ın üzerinde bilinen proteaz sayısı ile doğada en fazla miktarda bulunan serin proteaz sınıfını oluşturmaktadır [47]. Kimotripsin ailesine üye olan proteazlar (tripsin, kimotripsin ve elastaz); her biri altı antiparalel β -zincirinden oluşmuş birbirine dikey iki β -plakasından ve C-terminal α -heliks yapısından oluşmuştur. Katalitik bölge ve substrat bağlama bölgeleri ile enzim substrat etkileşimleri β -plakaları arasında yer almaktadır. Fonksiyonel kalıntılar daha çok β zincirleri ile bağlantılı ilmeklerde (loop) konumlanmışlardır [47,49]. Şekil 2.6'da kimotripsinin sekonder yapılarını gösteren konformasyonel yapısı verilmektedir.

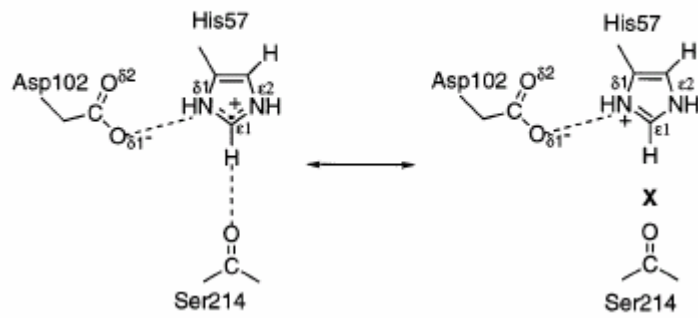


Şekil 2. 6: Kimotripsinin α -heliks ve β - tabakalarını gösteren ikincil yapısı [47]

Kimotripsinin ve kimotripsin benzeri enzimlerin Ser 195, Asp 102 ve His 57'den oluşan katalitik triadı geniş bir hidrojen bağı ağının bir parçasıdır. Şekil 2.7'de katalitik triaddaki hidrojen bağları verilmiştir. A-1, A-2 ve A-3 kimotripsinin katalitik triadını göstermektedir. Katalitik triaddaki hidrojen bağı ağı protein inhibitörü eglin C (A-1), açıl enzim ara ürünü (A-2) ve geçiş halinde oluşan trifloroketon kompleksi (A-3) ile gösterilmiştir. Noktalı çizgiler oluşan hidrojen bağlarını göstermektedir. His 57 ve Asp 102 pozisyonundaki hidrojen bağları karboksilat grubunun oluşturduğu hidrojen bağına göre syn oryantasyonunda bulunur ki bu durumda hidrojen bağları daha bazik elektron çiftleri ile oluşur. Hemen hemen tüm kimotripsin benzeri proteazlarda Ser 214 kalıntısının $-OH$ grubu Asp 102 kalıntısının O δ 1 atomu ile hidrojen bağı oluşturur. Literatürde geçen birtakım yayınlarda göz ardı edilse bile Ser 214 kalıntısı katalitik triadın dördüncü elemanı olarak düşünülebilir. Şekil 2. 7 B His 57 kalıntısı üzerindeki yük dağılımında C ϵ 1-H bağının etkisini göstermektedir. Hidrojen bağı yokluğunda pozitif yük N δ 1 üzerinde yer alacaktır ki bu durumda stabilizasyon Asp 102 tarafından gerçekleştirilmektedir.



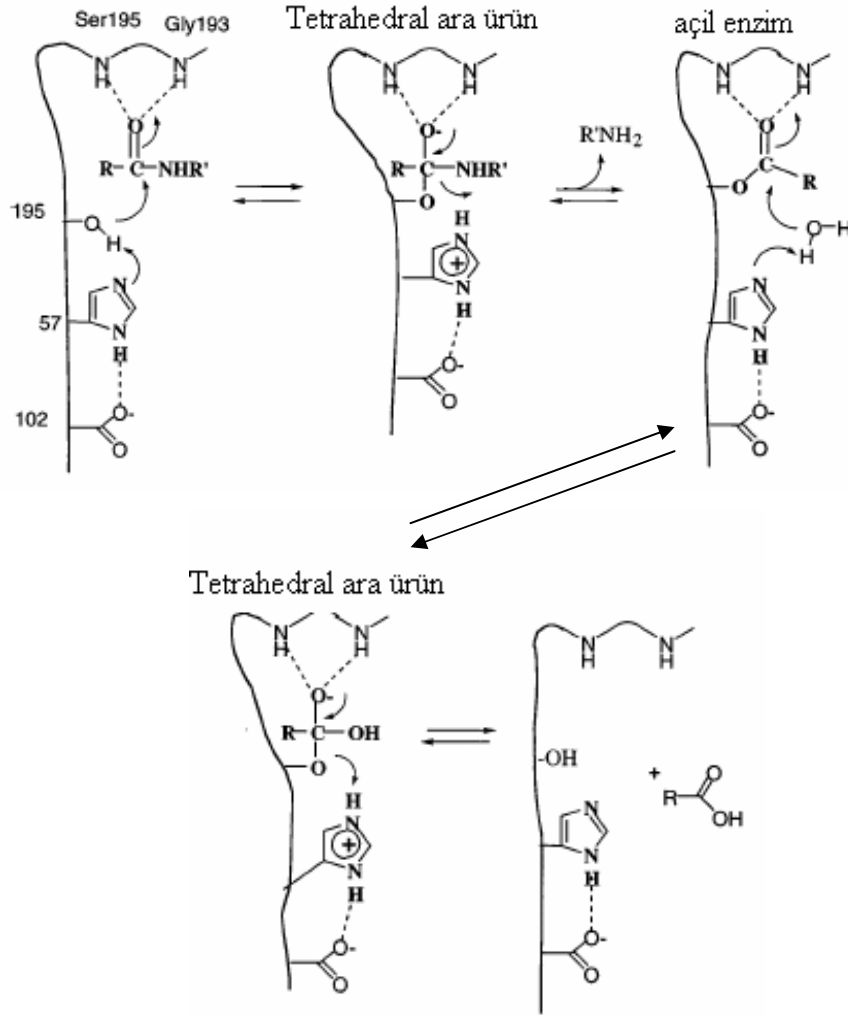
B



Şekil 2. 7: Katalitik triaddaki hidrojen bağları [47]

Şekil 2.6'da görülen oksianyon çukuru; Gly 193 ve Ser 195 kalıntıları arasında oluşmaktadır. Bu atomlar pozitif yük cebi oluşturarak peptid bağındaki karbonil grubunu aktive ederler ve tetrahedral ara ürününün negatif yüklü oksianyonunu stabilize ederler [47].

Proteazlar peptid bağını hidrolizlerken üç sorunu başarı ile çözebilmektedirler: a) amid nitrojeninin karbonil grubuna elektron transferi ile çok stabil amid bağı oluşmaktadır. Proteazlar genellikle genel asit-baz mekanizması ile peptid bağının rezonans stabilizasyonunu bozarak katalitik etki gösterirler, b) Su zayıf bir nükleofildir, proteazlar genel baz mekanizması ile suyu aktive ederler, c) Aminler zayıf çıkıcı gruplardır, proteazlar amin grubunu yapıdan ayrılmadan önce protonize ederler. Bu üç başlık için proteazlar oldukça başarılı bir performans sergilerler. Serin proteazlar ile peptid bağının hidroliz hızı katalizlenmemiş bir reaksiyonunkinden 10^{10} kat daha hızlı gerçekleşir. Kataliz mekanizması peptid hidrolizi ile sınırlandırılmamalıdır. Serin proteazlar aynı zamanda anilid, amid, ester ve tiyoester içeren başka bileşikler de hidrolizleyebilmektedirler. Şekil 2.8 kimotripsin benzeri serin proteazlar için genel kabul edilen mekanizmayı göstermektedir. Reaksiyonun yarı açılasyon kısmında Ser 195; His 57'nin genel baz gibi davranması ve Ser 195'nin nükleofil gücünü arttırmasına yardımcı olması ile birlikte peptid substratının karbonil grubuna saldırır. Oluşan His 57- H^+ Asp 102 ile hidrojen bağı oluşturarak stabilize olur. Tetrahedral ara ürünü ile oluşan oksianyon; oksianyon çukurundaki ana zincirin NH_5 grupları ile etkileşerek stabilize olur. His 57- H^+ 'nın genel asit gibi davranması sonucu çıkıcı grup yapıdan ayrılır, tetrahedral ara ürünü yıkılır ve açıl-enzim ara ürünü oluşur. Bu aşamadan sonraki deaçilasyon yarı reaksiyonu şu şekilde tekrarlanır: His 57'nin yardımı ile su açıl enzime saldırır, ikinci tetrahedral ara ürünü oluşur. Oluşan ara ürün Ser 195 ve karboksilik asite yıkılır. Yapı; serbest enzim ve ürün olarak ayrılır. Gerçekleşen reaksiyonda bağların ve yük dağılımlarının değişmesi enzim-substrat etkileşimini güçlendirmektedir [47].

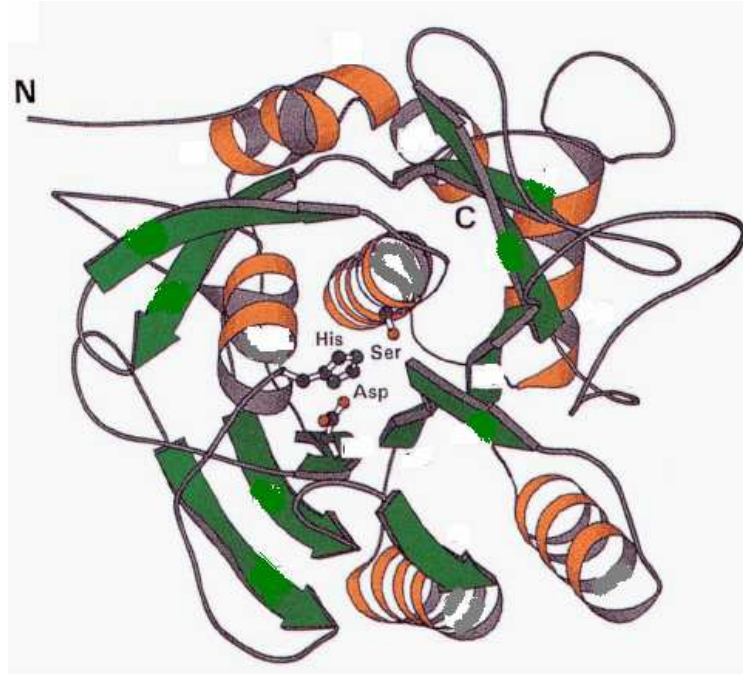


Şekil 2. 8: Serin proteazlar için genel kabul edilen mekanizma [47]

Subtilizin benzeri proteazlar (subtilazlar) büyük ölçüde *Bacillus* türleri tarafından üretilirler. Birçok *Bacillus* subtilazının gen yapıları ve dizilimleri ve üç boyutlu yapıları çalışılmış olmasına rağmen hücre dışı subtilisin benzer proteazların fonksiyonel rolü ve biyosentezdeki regülasyon mekanizması ucu açık sorulardandır [50].

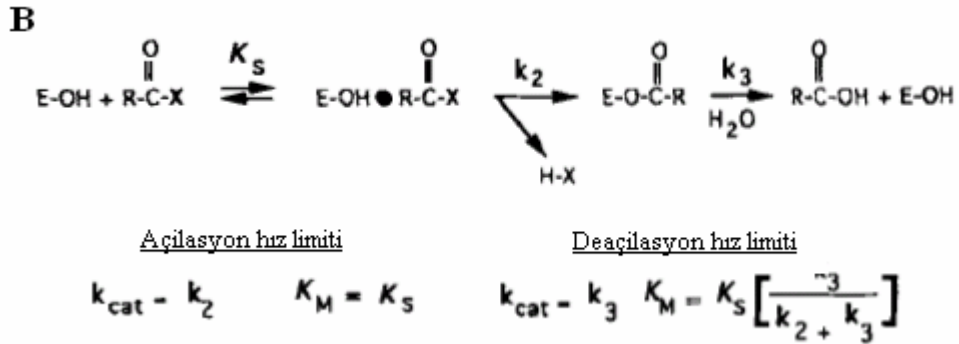
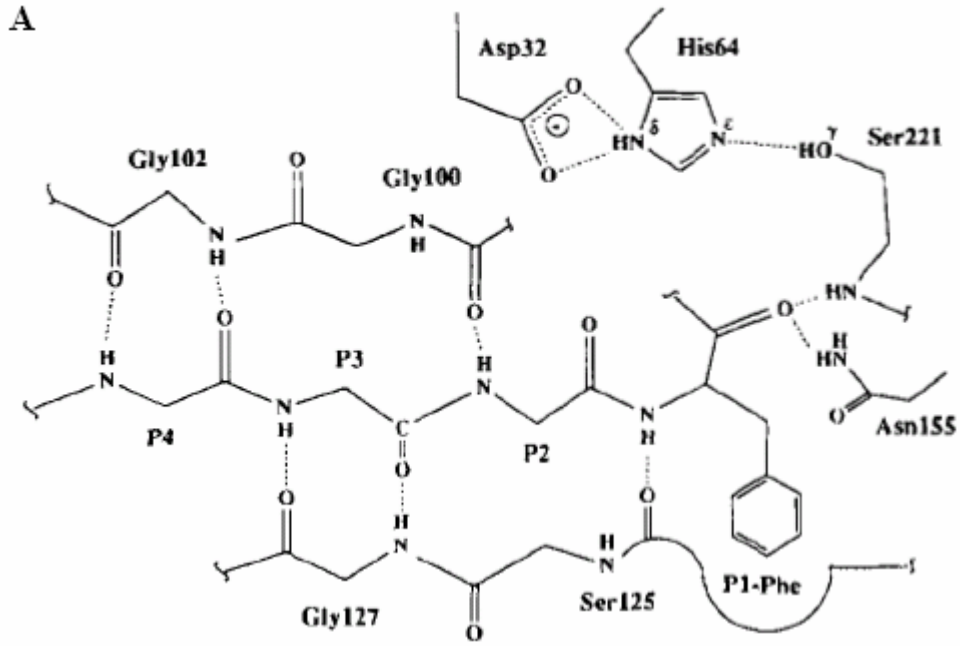
Subtilizin benzeri proteazlar ile kimotripsin benzeri proteazların katalitik histidin, serin ve aspartat kalıntılarının düzenlenmesi birbirine çok benzer olmasına rağmen β/β (kimotripsin) α/β (subtilisin) katlanmalarında ciddi farklılıklar bulunmaktadır. Şekil 2.9'da subtilazların katalitik triadları ile ve N-terminal ve C-terminal uçları ile birlikte ikincil yapısının şematik gösterimi verilmiştir. Gösterimde α -heliks yapıları

spiral şekli ile, β -plakaları ise oklar ile gösterilmiştir. Subtilazların büyük bir çoğunluğu pre-pro-enzim olarak sentezlenmektedir. Pro-peptid bağının kırılması ile aktif hale gelmektedirler [51].



Şekil 2. 9: Subtilazların ikincil yapısının şematik gösterimi [51]

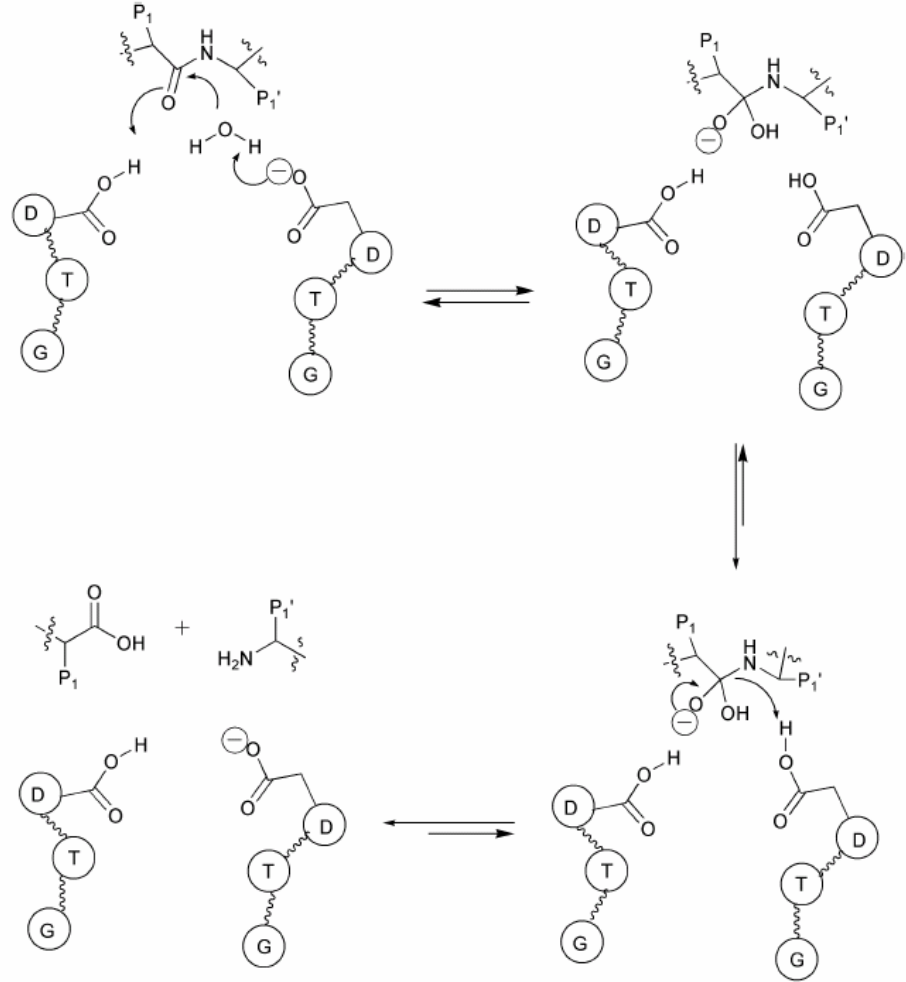
Subtilazların katalitik triadını Ser 221 (nükleofil), His 64 (baz), Asp 32 (elektrofil) oluşturmaktadır. Şekil 2.10.A subtilisinin katalitik bölgesinin oligopeptid substratı ile etkileşimini göstermektedir. Kalıntıların birbirine olan mesafesi oksianyon çukurunu oluşturmaktadır. Subtilisindeki oksianyon çukuru enzimin yan zinciri ile oluşmaktadır. Şekil 2.10.B ise serin proteazların Michael Menten kinetik parametreleri ile birlikte genel kinetik kataliz mekanizmasını göstermektedir. Kinetik parametreler farklı proteazlar ve substratlarla farklı değerler almaktadır. Ser 221 ve His 64 kalıntılarının alanin kalıntısı ile değiştirilmesi ile k_{cat} değeri 10^4 – 10^6 kat azalmaktadır. Her iki kalıntısının aynı anda değişmesi ile görülen 10^6 kat azalma; iki katalitik üyenin katalizin gerçekleşmesi hususunda birbiri ile ileri derecede işbirliği içinde olduğunu göstermektedir. Her iki komponentin mutasyonu ile aktivitede büyük oranlarda azalma görülmüştür [46].



Şekil 2. 10: Subtilisinin protein hidrolizine ilişkin katalitik ve kinetik etki mekanizması [46]

Aspartil proteazlar (EC 3 4 23) asidik proteazlar olarak da bilinen, endoproteaz ailesine ait, hedef substrattaki spesifik peptid bağımlı katalizleme yeteneğine sahip proteolitik enzimlerdir [52]. Bitki, bitki virüsleri ve retrovirüslerde bulunurlar. Asidik proteazların doğada bulunabilirliği serin proteazlardan daha azdır. Aspartil proteazlar katalitik bölgesinde bulunan ve katalizi gerçekleştiren iki adet aspartil kalıntısı ile karakterize edilirler. Bu proteazlar katalitik aktivitelerine göre üç alt sınıfa ayrılırlar. Bunlar pepsin (A1), retropepsin (A2) ve pararetrovirüslerden (A3) elde edilen türlerdir [53]. Aspartil proteazlar pH 3–4 civarında aktivite gösterirler. Pepstatin tarafından inhibe olurlar. pH 3–4.5 arasında izoelektrik noktasına sahip olup molekül ağırlıkları 30–45 kDa arasında değişmektedir. Aspartil proteazların proteinleri hidrolizleme mekanizması için genel asit – baz mekanizması önerilmiştir.

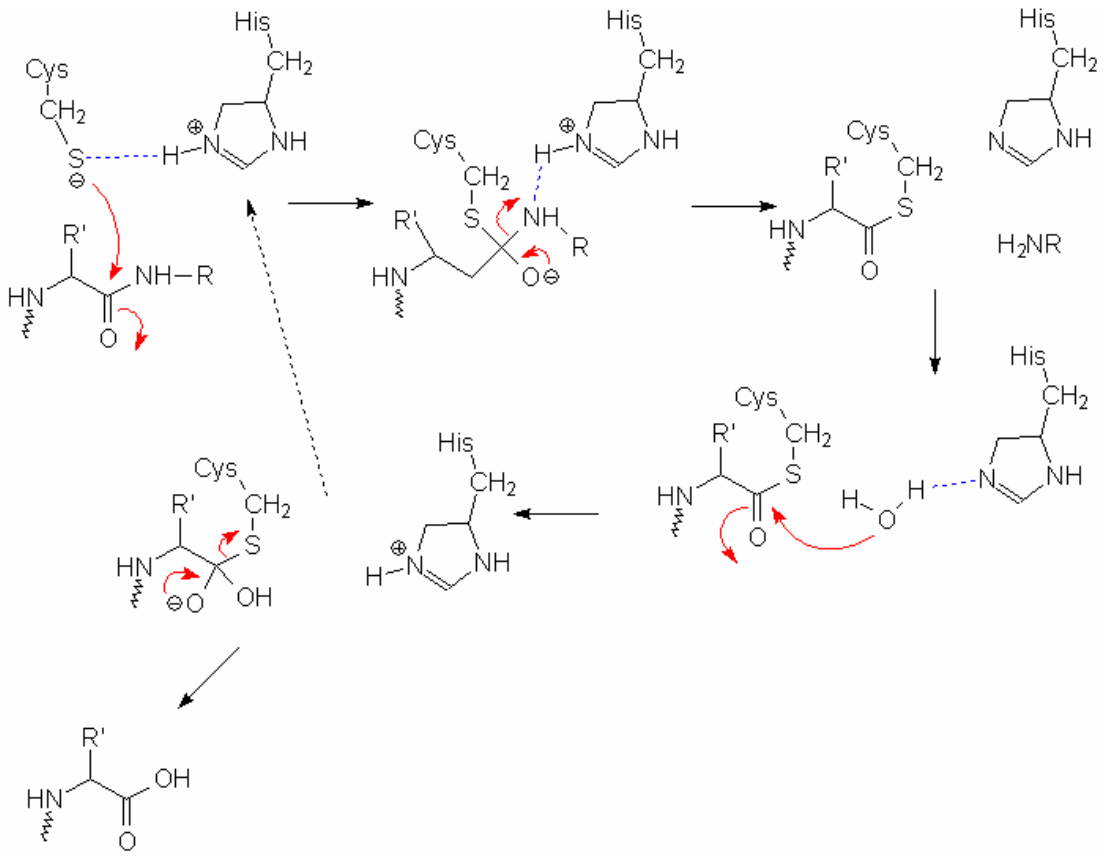
Bu mekanizmada su; reaksiyona direk katılmaktadır [10]. Şekil 2.11’de aspartil proteazlar için öngörülen katalitik etki mekanizması verilmiştir.



Şekil 2. 11: Aspartik proteazlar için öngörülen katalitik mekanizma. D, T ve G farklı pozisyonlarda bulunan aspartat kalıntılarını ifade etmektedir [54]

Sistein proteazlar (EC 3 4 22) prokaryot ve ökaryotlar tarafından üretilirler. Bu tip proteazların yaklaşık 20 alt sınıfı tanımlanmış bulunmaktadır [10]. Sistein proteazların altı ana üyesi papain ailesi, kalpainler, klostripainler, streptococcal sistein proteazlar, viral sistein proteazlar, son zamanlarda tanımlanan kakpasaslar (apopainler) olarak sınıflandırılır [55]. Papain ailesine ait sistein proteazların aktif bölgesi V-şeklinde olup, katalitik diadını Cys ve His kalıntıları oluşturmaktadır. Proteazların aktivitesi; katalitik diadın, Cys⁻...His⁺ zwitterion olması ile yürütülür [56]. Papain ailesine ait sistein proteazlar peptid, amid, ester, tiyol ve tioester bağlarını hidrolizler. Mekanizmanın temeli (Şekil 2.12); kovalent bağlı açıl-enzim

ara ürünü oluşumu ve nihayetinde aktif bölgedeki tiyol grubunun karbonil karbonuna nükleofilik atağı ile sonlanmasına dayanır. Reaksiyonun ilk adımında serbest enzim ile substrat arasında nonkovalent etkileşimlerle Michael kompleksi oluşur. Enzimin açılması enzimden ilk ürün olarak $R'NH_2$ grubunun ayrılması ile gerçekleşir. Sonraki adımda açıl enzim ara ürünü su molekülü ile etkileşerek ikinci ürünü oluşturur (deaçilasyon basamağı). Bu ürünün ayrılması ile serbest enzimin rejenerasyonu gerçekleşir [55].

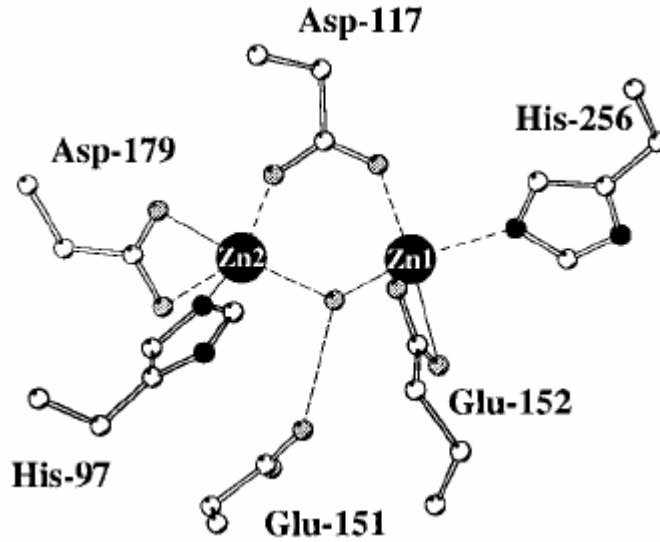


Şekil 2. 12: Sistein proteazlar için öngörülen katalitik mekanizma [57]

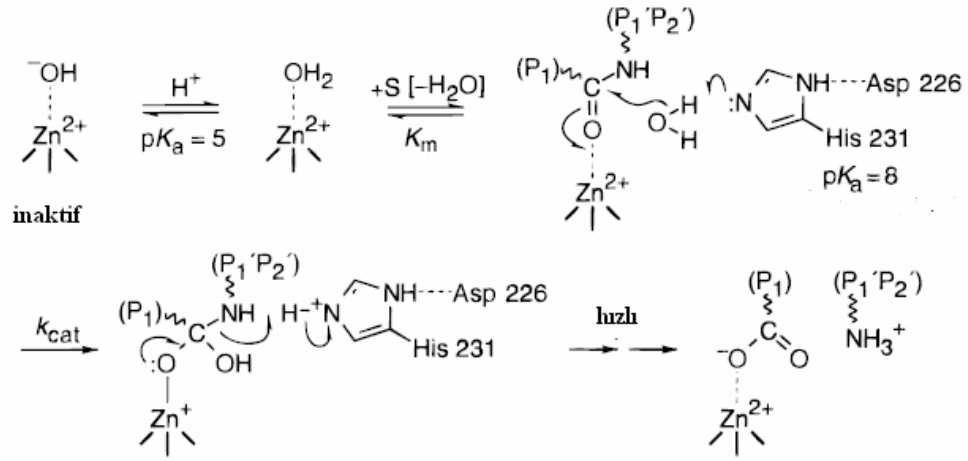
Sistein proteazların genellikle birkaçı dışında optimum pH'ları nötral pH'dır (lizozomal proteazlar asidik pH'da maksimum aktivite gösterirler). Genellikle sistein ve HCN gibi indirgeyici ajanlar varlığında aktiftirler [10]. Papain benzeri birçok sistein proteazlar molekül ağırlığı 20–35 kDa olan bağıl olarak küçük proteinlerdir. Ancak katepsin C oligomerik enzim olup molekül ağırlığı 200 kDa'nun üstündedir. Sistein proteazların inhibitörlerinden en iyi karakterize edilenleri papain ailesine ait olanlardır. Bu inhibitörler sistatin (cystatin) üst ailesine ait fitositatin (phytoctyatin)

inhibitörlerdir. Sistatin ailesine ait olan inhibitörler papain ailesine ait sistein proteazlarla sıkı ve tersinir bağ yapabilen inhibitörler içerirler [55].

Metaloproteazlar (3 4 24); aktiviteleri için iki değerlikli metal iyonuna gereksinim duyarlar. Yaklaşık 30 sınıfı tanımlanmakla beraber; bunların 17'si yalnızca endopeptidaz, 12'si yalnızca ekzopeptidaz, biri hem endopeptidaz hem de ekzopeptidaz aktivitesi içermektedir. İşlevlerine göre nötral, alkalen, *Myxobacter I* ve *Myxobacter II* olmak üzere dört gruba ayrılırlar Alkalem metaloproteazlar 34–60 kDa molekül ağırlığına sahip olup, pH 7–9 arasında aktiftirler [10]. Metaloproteazların çoğu çinko bağımlı proteinlerdir. Bu tür proteinlerde çinko integral komponent gibi konumlanmıştır. Kristal yapıları bilinen tüm çinko bağıl enzimlerde katalitik çinko atomu üç tane amino asit ve bir tane aktif su molekülüne bağlanır. His, Glu, Asp ya da Cys kalıntıları ile oluşturulan kombinasyon aktif çinko bölgesinde üç çatalı (trident) bir yapı oluşturur ve aktif su molekülü koordinasyon küresini doldurarak tamamlar [58]. Şekil 2.13'te aktif bölgesinde iki tane çinko atomu içeren metaloproteazın katalitik bölge yapısı, şekil 2.14'te metaloproteaz sınıfına dahil termolizinin alternatif reaksiyon mekanizması verilmiştir [59].



Şekil 2. 13: *Aeromonas proteoltica* amino peptidazının iki tane çinko içeren aktif bölge yapısı



Şekil 2. 14: Termolizinin alternatif reaksiyon mekanizması [59]

Metaloproteazların şelat oluşturan ajanlara karşı diyaliz edildiklerinde inaktive olurlar [10]. Metaloproteazlar; dokunun yeniden modellendirilmesi, peptid hormon sinyalinin oluşturulması ve kanser tedavisinde uygulanması gibi fizyolojik ve patolojik proseslerde anahtar rol oynarlar. Bunu yanı sıra in vivo ortamda inaktif zimojenlerin oluşturulması ve endojen proteinlerle inhibisyon gibi çeşitli translasyon sonrası formların oluşumunun regülasyonunda rol alırlar [60].

2.2.1.3 Proteinleri hidrolizleme biçimlerine göre proteazlar

Proteazlar proteinleri hidrolizleme biçimlerine göre endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar olmak üzere iki ana sınıfa ayrılırlar (tablo 2.5). Ekzopeptidazlar substratın C-terminal ya da N-terminal ucundan amino asit hidrolizini katalizlerler. Endopeptidazlar substratın iç kısmındaki peptid bağlarının hidrolizini katalizler. Ekzopeptidazlar amino ucundan ya da karbonil ucundan katalizleyen türlerine göre alt sınıflara ayrılırlar. Aminopeptidazlar (AP) amino ucundaki ilk iki kalıntıyı katalizleyen enzimler dipeptidil peptidaz, üç kalıntıyı katalizleyen enzimler tripeptidil peptidaz olarak sınıflandırılmış olup; karboksipeptidazlar (CP) kendi aralarında serin tip, metaloproteaz, sistein tip, dipeptidil dipeptidaz ve dipeptidaz olarak alt sınıflara ayrılmıştır. Omega peptidazlar ise terminal ucunda halkalı yapı ya da izopeptid bulunduran substratların hidrolizini katalizler. Substratın iç kısmındaki peptid bağlarını hidrolizleyen endopeptidazlar kendi aralarında serin, sistein aspartik ve metaloproteaz gibi alt gruplara ayrılır [10, 61].

Tablo 2. 5: Proteazların hidrolizleme biçimlerine göre sınıflandırılmaları [10]

Proteaz	Etki Biçimi	EC no
Ekzopeptidazlar		
Aminopeptidazlar (AP)	● ↓ ○ - ○ - ○ - - - -	3.4.11
Dipeptidil peptidazlar	● - ● ↓ ○ - ○ - ○ - - - -	3.4.14
Tripeptidil peptidazlar	● - ● - ● ↓ ○ - ○ - ○ - - - -	3.4.14
Karboksipeptidazlar (CP)	- - - - ○ - ○ - ○ ↓ ●	3.4.16 – 3.4.18
Serin tip proteaz		3.4.16
Metaloroteaz		3.4.17
Sistein tip proteaz		3.4.18
Dipeptidil dipeptidaz	○ - ○ - ○ ↓ ● - ●	3.4.15
Dipeptidaz	● ↓ ●	3.4.13
Omegapeptidaz	*- ● ↓ ○ - ○	3.4.19
	○ - ○ - ○ ↓ ● -*	3.4.19
Endopeptidazlar		
Serin proteaz	○ - ○ - ○ ↓ ○ - ○ - ○ -	3.4.21 – 3.4.34
Sistein proteaz		3.4.22
Aspartik proteaz		3.4.23
Metaloproteaz		3.4.24
Katalitik mekanizması bilinmeyen endopeptidazlar		3.4.99

AP'lar ve CP'lar hayvansal, bitkisel ya da mikroorganizma kaynaklı olabilirler. Buldukları kaynaklarda sinyal iletimi, peptid hormonlarının regülasyonu, protein bağlanması ve sindirim gibi fizyolojik ve patofizyolojik işlevlere sahiptirler. 100'den

fazla AP laktik asit bakterilerinden saflaştırılmıştır. Laktik asit bakterilerinden karakterize edilmiş CP bulunmamaktadır. AP ve CP'nin bir diğer önemli kaynağı memelilerdir. Ekzopeptidazlar gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılırlar. Protein hidrolizatlarının acılığının giderilmesinde ekzopeptidazlardan büyük oranda faydalanılmaktadır. Acı tat gıda endüstrisinde genel olarak istenmeyen bir durumdur. Birçok L-amino asit (Arg, Pro, Leu, Phe, Trp ve Ile) acı tada sahiptir. L-Ala ve L-Ser ve D-amino asitlerin çoğu ise tatlıdır. Peptidlerin çoğu acı tada sahiptir. Acılık; hidrofobik kalıntılardan özellikle de uzun zincirli ve aromatik amino asitlerden kaynaklanmaktadır. Acılığın giderilmesi için bu kalıntıların yapıdan uzaklaştırılması gerekmektedir. AP'lerin büyük çoğunluğunun optimum pH'sı nötral pH olup, optimal sıcaklıkları 37–50 °C civarında değişmektedir. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı bazı AP'ler 100 kD'dan daha büyük molekül ağırlıklarına sahiptirler. CP'ler optimum pH değerleri 4–8.5 arasında değişirken, optimal sıcaklıkları 25–80 °C civarındadır. AP ve bazı dipeptidazlar mikromolar ve nanomolar konsantrasyondaki bestatin ([S-R,S]-N-(3-amino-2-hidroksil-1-okzo-4-fenilbütül)-L-lösin) molekülü tarafında inhibe olmaktadır [61].

AP'ler genelde hücre içi enzimlerdir fakat *Aspergillus oryzae* tarafından üretilen hücre dışı AP ile ilgili bir çalışma bulunmaktadır [10]. Birçok AP'ler çinko metaloenzimlerdir. En çok çalışılan AP lösin aminopeptidazdır (LAP). LAP aktif bölgesinde iki tane Zn^{2+} iyonu içermektedir. Lösin gibi terminal hidrofobik amino asit kalıntısı içeren substratlara karşı geniş bir özgünlüğü olmasına rağmen Arg, Lys ya da Pro-N terminaline sahip substratlara karşı özgünlüğü oldukça düşüktür. Memeliler tarafından sentezlenen LAP ile prokaryotlardan sentezlenen LAP arasında yapısal olarak benzerlikler vardır. AP'lerin belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan iki sentetik substrat grubu bulunmaktadır. Birinci grup substratlar p-nitroanilid amino türevleridir. Bu substratların hidrolizi ile oluşan p-nitroanilin ürünü sarı renkli olup 405 nm'de kuvvetli absorpsiyon verir. İkinci grup substratlar β -naftilamid amino türevleri olup hidrolizlendiklerinde florometrik olarak ölçülen β -naftilamin oluşturmaktadırlar [61].

Karboksipeptidazlar polipeptid zincirinin C-terminal ucuna etkiyerek bir amino asit ya da dipeptid oluştururlar. CP'ler aktif bölgelerindeki amino asit kalıntılarına göre

serin CP'ler, metalo CP'ler ve sistein CP'ler olmak üzere üç ana sınıfa ayrılırlar. *Penicillium* spp., *Sacchharomyces* spp. ve *Aspergillus* spp.'lardan izole edilen serin CP'ler benzer substrat özgünlüğüne sahip olmakla birlikte optimum pH, kararlılık ve moleküler ağırlık gibi özelliklerinde farklılık gösterirler. *Saccharomyces* spp. ve *Pseudomonas* spp'den izole edilen metalo CP'ler aktiviteleri için Zn^{2+} ve Co^{2+} iyonlarına gereksinirler [10]. CP'leri belirlemek için yaygın olarak N-karbobenzoksi dipeptidleri kullanılır [61].

Endopeptidazlar polipeptid zincirinin N ve C terminal uçlarından uzak, daha iç bölgelerdeki peptid bağlarına karşı özgünlük göstermeleri ile karakterize edilirler. Serbest amino ya da karboksil uçlarının varlığı enzim aktivitesi üzerinde negatif rol oynar. Katalitik mekanizması bilinmeyen endopeptidazlara ait 21 aile belirlenmiştir. Bunlardan Endopeptidaz IV ailesi viral ve bakteriyel kaynaklı olabilir. Bakteriyel peptidazlar ökaryotik mikrozomal proteazlar ile homolog değildir, ancak ökaryotik mitokondriyel peptidazlar ile benzerlikler içermektedir. Ökaryotik mikrozomal peptidazlar çoklu alt üniteye (multisubunit) sahip proteinlerdir ve peptidaz aktivitesi için hangi komponentin doğrudan etkili olduğu bilinmemektedir. Multikatalitik endopeptidaz kompleksleri birbiri ile benzer olmayan iki ya da daha fazla alt ünite içermektedir. Bunlar, alt ünitelerine ait üç ya da daha fazla peptidaz aktivitelerine sahiptirler [62].

2.2.2 Proteazların endüstrideki uygulama alanları

Proteolitik enzimler, diğer biyoteknolojik enzimler arasında en geniş ticari uygulaması olan enzimlerdir. Deterjan, deri endüstrisi, ilaç endüstrisi, tekstil endüstrisi, süt endüstrisi uygulama alanlarının büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Protein bazlı kirlerin uzaklaştırılması amacı ile en geniş kullanım alanını deterjan endüstrisi oluşturmaktadır. Tekstil endüstrisinde kullanımı ham ipek üzerindeki sert ve yapışkan kısmın uzaklaştırılmasını kapsamakta olup daha yumuşak ipek ürünlerinin elde edilmesi sağlanmaktadır. Deri endüstrisinde ise tüy giderme proseslerinde kullanılmaktadır. X-ışını filmlerinden jelatin kaplamalarının hidrolizi ile üzerindeki gümüşün geri kazanımı proteazlar ile gerçekleştirilmektedir. Kontak-

lenslerden proteinlerin uzaklaştırılmasını sağlayan enzim temizleyiciler biyofarmatik ürünler içinde önemli bir yer tutmaktadır [5,6,10,20,63].

Günümüzde deterjan endüstrisinde kullanılan enzimlerin %89'unu subtilisinler ve/veya *Bacillus* soyundan saflaştırılan proteazlar oluşturmaktadır. Deterjan proteazı seçimin de en önemli parametre enzimin pI değeridir. Deterjan çözeltisinin pI değeri enzimin pI değerine ne kadar yakın olursa o kadar iyi performans gösterir. Özellikle yüksek sıcaklık ve pH'larda büyüyen *Bacillus* soylarından üretilen proteaz enzimleri deterjanlarda kullanılmaktadır, yüksek sıcaklıklara çıkıldıkça daha etkin yıkama elde edilebilmektedir [64].

Deri endüstrisinde kıl giderme işlemleri esnasında kullanılan sülfid atıkları doğa için oldukça zararlıdır [65]. Deri endüstrisi atıklarının % 80–90'ını bu işlemde kullanılan sülfid atıkları oluşturmaktadır [66]. Enzimlerin alternatif kimyasallara karşı kullanılması hem deri kalitesini arttırmakta hem de çevresel kirliliği azaltmaktadır. Proteazlar derideki nonkolojen bileşenleri selektif olarak hidrolizler, aynı zamanda albumin ve globin gibi globular proteinlerin de uzaklaştırılmasını sağlar. Bu adım alkali ortamda gerçekleştirilmektedir. Mikrobiyal alkalen proteazların bu adımda kullanılması ile süreden ve kimyasallardan oldukça fazla kazanımlar elde edilmektedir.

Süt endüstrisinin temel uygulamasını peynir üretimi oluşturmaktadır. Sütün pıhtılaşmasını sağlayan enzimler üç kategoride toplanmaktadır: (i) hayvansal rennetler (kimosin), (ii) mikrobiyal süt pıhtılaştırıcılar, (iii) genetik olarak değişime uğratılmış kimosin. Peynir yapımında proteazların ana fonksiyonu spesifik peptid bağlarını (Phe 105, Met 106 arasındaki bağlar) hidrolizleyerek p-kazein ve makropeptid oluşturmaktır. Kimosin bu amaçla kazeine karşı yüksek özgünlüğünden dolayı peynir yapımında oldukça iyi bir performans sergilemektedir. Günümüzde ise peynir yapımı için rekombinant kimosinler üretilmektedir [10]. Rennet aktivitesi ile kazein sütte pıhtılaşır ve süt bileşenleri katı faz ve sıvı faz olarak iki kısma ayrılır. Katı faz lor peyniri olarak ayrılır ve sonrasında olgunlaştırma enzimleri olan proteazlarla muamele edilerek olgunlaşmış peynir elde edilir. Peynir yapımında saf

kimosinin farklı karışımları ile sığır pepsini ve mikrobiyal rennin enzimleri gibi farklı rennin preparatları kullanılır[3,10].

Unlu gıdalarda proteazlar; gluten olarak adlandırılan çözünmeyen proteinleri modifiye etmek için kullanılır. *Aspergillus oryzae*'den saflaştırılan endo ve ekzo peptidazlar gluteni sınırlı proteoliz ile modifiye ederler [10]. Hamur hazırlanması sırasında gluten proteinleri su ile bağ yaparak ince kafes (lattice) yapısını oluştururlar. Proteazlar gluten proteinin bağlarını kırarak oluşan yapıyı daha ılımlaştırırlar. Böylelikle hamurun direnci azalır ve gevşer. Hamur, mayanın fermentasyonu esnasında açığa çıkan CO₂'nin geçişine izin verecek yumuşaklıkta olmalıdır. Gluten; gliadin ve glutenin olarak iki farklı protein yapısında bulunur. Farklı proteazlarla katalizlenen reaksiyonların, bu proteinlerin modifikasyonları üzerinde tamamen farklı etkileri bulunmaktadır. Fungal proteazlar nötral ya da zayıf asidik pH'da optimum aktivite gösterirler. Gluteni spesifik olarak hidrolizlerler. Hidrolizin başlangıcında seçimli olarak bağ kırılması gerçekleşir. Nötral bakteriyel proteazlar ise non-spesifik olarak bağ kırılımını gerçekleştirip, glutenin tamamen hidrolizine sebep olur. Bu yüzden enzim preparatları yapılacak uygulama tekniğine göre seçilmelidir [3].

Soya fasulyesi zengin içerikli proteinlerinden dolayı gıda endüstrisi için zengin bir kaynak oluşturmaktadır. Soya sosu ve soya ürünleri eldesinde proteazlar çok eski çağlardan beri kullanılmaktadır. Soya sosu oluşturmada fungal alkalen ve nötral proteazlar en çok kullanılan enzimlerdir. Soya proteinlerinin proteolitik modifikasyonu fonksiyonel özelliklerini arttırmaya yardımcı olmaktadır. Soya proteinlerinin pH 8'de alkalaz ile muamelesi ile daha az acı olan yüksek çözünürlüğe sahip protein hidrolizatlarının oluşumu sağlanır. Oluşan hidrolizatlar birçok amaç için gıda endüstrisinde ve sert olamayan içeceklerde kullanılmaktadırlar.

Aspartam tatlandırıcı olarak gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır. L-aspartik asit ve L-fenil alanin metil esterinin birleşimi olan bir dipeptiddir. İki amino asidin L-konfigürasyonu aspartamın tatlı tadından sorumludur. Aspartamın kimyasal metodlarla üretilmesi oldukça maliyetli bir prosestir. Bu yüzden enzimatik sentez tercih edilmektedir. Proteazlar hidrolitik enzimler olmasına rağmen kinetik kontrollü

reaksiyonlarda tersinir reaksiyonları da katalizleyebilmektedirler. *Bacillus thermoprotolyticus* tarafından üretilen termolizin aspartamın enzimatik sentezinde kullanılmaktadır.

Protein hidrolizatlarının acı tadı gıda ve sağlık bakım ürünlerinde kullanımlarına büyük bir engel oluşturmaktadır. Acılığın yoğunluğu hidrolizat içindeki hidrofobik amino asitlerin sayısıyla 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. Proteazların geniş spesifisitesi ve çeşitliliği tedavi edici ajanların gelişiminde büyük bir avantaj olarak kullanılır. Subtilisin ya da kollegenaz yanık ve yara tedavisinde antibiyotiklerle birlikte kullanılır. *E .coli*'den izole edilen Asparaginaz lenfositik lösemilerin çeşitli formlarında kan akışından asparagini elimine etmek için kullanılmaktadır [10].

Proteazların peptid sentezinde kullanımı oldukça yaygındır. Peptid sentezinde proteazların kullanımının kimyasal metotlara karşı birçok üstünlüğü bulunmaktadır. Bunlar: stereospesifik ürün oluşumu, non-polar substratların çözünürlüğünün artması, termodinamik dengenin hidrolizden sentez yönüne kayması şeklinde sıralanabilir. Bu uygulamada en büyük sınırlama enzimlerin susuz ortamda aktivitelerini kaybetmeleridir. Proteazlar dipeptid ve tripeptid sentezinde regioselektif şeker esterifikasyonunda ve peptid esterlerinin dia-steroselektif hidrolizlerinde başarı ile kullanılmaktadırlar. Peptid sentezinde ve rasemik karışımların ayrılmasında alkalen proteazların kullanıldığı çok sayıda yayın rapor edildiği bildirilmiştir [11]. Organik çözücüler proteaz aktivitelerini güçlü bir şekilde etkilemektedirler. α -kimotripsin ve subtilisin Carlsberg'in kullanıldığı peptid sentezi reaksiyonları başarı ile gerçekleştirilmiştir.

Alkalen proteazlar X-ışını ya da fotoğraf filmlerden gümüş geri kazanımında kullanılmaktadır. Atık filmlerin jelatin tabakalarının ağırlıklarının %1.5–2'sini gümüş oluşturmaktadır. Gümüş, jelatin ile bağ yapabildiğinden proteolitik

uygulamalarla geri kazanılabilmektedir. Jelatinin enzimatik hidrolizi ile sadece gümüş geri kazanılmış olmaz aynı zamanda polyester filmlerin de geri dönüşümü sağlanmış olur.

Proteazların bir başka uygulama alanı ipek endüstrisidir. Serisin; ham ipeğin toplam ağırlığının % 25'ini oluşturan, ham ipek iplikleri kaplayan ve ipliklerin pürüzlü bir yapıya sahip olmalarına sebep olan yapışkan bir maddedir. Serisin ipliklerden konvensiyonel olarak nişasta kullanılarak uzaklaştırılır. Ancak bu yöntem oldukça maliyetlidir. Bu işleme alternatif yöntem proteazların uygulanmasıdır. Proteazlar ile serisinin uzaklaştırılması maliyeti ve işlem süresi azaltmaktadır [11].

Alkalen proteazlar D ve L-amino asitlerin sentezinde ve ayrılmasında da kullanılmaktadırlar. Amino asitler insanlar ve evcil hayvanlar için temel beslenme ögesidir. Canlılar sadece L-amino asitleri sindirebilmektedirler ve amino asitlerin kimyasal sentezi ile de rasemik karışımlar oluştuğu için ticari olarak bu rasemik karışımların ayrılması büyük önem taşımaktadır. Düşük molekül ağırlıklı (6.8 kDa) *C. coronatus*'dan saflaştırılan alkalen proteaz D,L-fenil alanin ve D,L-fenil glisin rasemik karışımlarını başarı ile ayırabilmektedir. Subtilisin carlsberg ile de aynı uygulama gerçekleştirilebilmektedir. N-korunmuş amino asit esterlerinin organik çözücü içinde kinetik olarak ayrılması organik çözücü varlığında stabil olan endüstriyel alkalen proteaz 'Alkalaz' ile sağlanmıştır. Bu enzim *B. licheniformis*'de izole edilmiş olup, subtilisin carlsberg sınıfının ana üyesidir. Endüstriyel ve medikal uygulamalarının yanı sıra proteazlar temel araştırmalarda da önemli rol oynamaktadırlar. Peptid bağ yıkımına karşı özgünlüklerinden dolayı yapı-fonksiyon ilişkisi ve proteinlerin amino asit dizilişleri ile ilgili çalışmalarda da kullanılmaktadırlar [10].

2.2.3 Proteazların fizyolojik işlevleri

Proteazların çok geniş karmaşık fizyolojik fonksiyonları bulunmaktadır. Buldukları organizmada üstlendikleri regülatör görevi ile hayati önem taşırlar. Protein katabolizması, kanın pıhtılaştırılması, hücre büyümesi ve göçü, doku

düzenlenmesi ve zimojenlerin aktivasyonu, öncül proteinlerden hormonların ve farmakolojik olarak aktif peptidlerin ayrılması proteinlerin membranlardan geçişini sağlamak gibi bir çok fizyolojik ve patolojik proseslerde çok önemli rolleri bulunmaktadır. Genelde; hücre dışı proteazlar hücre absorpsiyonunu sağlamak amacı ile büyük protein moleküllerinin hidrolizini sağlarlar. Hücre içi proteazlar metabolizmanın düzenlenmesinde rol alırlar. Tüm bu reaksiyonları yanında proteazların mekanizması ile ilgili çok sınırlı bilgiler bulunmaktadır. Araştırmalar daha çok proteazların metabolik yönüne doğru yönelmiş durumdadır. Proteazların rol aldığı ana aktiviteler aşağıda tanımlanmıştır [10].

Tüm canlı hücrelerde önemli reaksiyonlardan biri reaksiyon sırasındaki dengeye rağmen proteinlerin sentez ve yıkımının sürekliliğidir. Proteinlerin katabolizması ile oluşan amino asitler protein sentezi için öncül molekülleri oluşturmaktadır [10].

Bakterilerde spor, mayalarda askospor ve funguslarda konidial boşalım güçlü protein yıkımlarını (protein turnover) içerir. Sporlaşma için bir proteazın gerekliliği proteaz inhibitörleri kullanılarak kanıtlanmıştır. Maya diploidlerinde askospor oluşumunun proteaz A aktivitesinin artması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [10].

Tohumlaşma için cansız sporların oluşmaması gerekmektedir. Cansız spordaki proteinlerin serin endopeptidazlar ile yıkımı ile yeni proteinlerin ve nükleotidlerin biyosentezi için yeni amino asit türevlerinin oluşumunu sağlamaktadır. Bu proteazlar sadece depolanmış proteinlere karşı spesifik olup, diğer spor proteinlerini etkilememektedir. Bu enzimlerin aktiviteleri sporların oluşumu ile hızlı bir şekilde yok olur. Hücre dışı asit proteazların tohumlanma esnasında hücre duvarındaki polipeptid zincirlerini kırdığı düşünülmektedir [10].

Protein hormonlarının oluşumu ve kanın pıhtılaştırılması gibi fizyolojik regülasyonlarda enzimlerin zimojenik formlarının aktive edilmesi önemli bir adımı oluşturmaktadır. Pepsin, tripsin ve kimotripsin inaktif zimojenik formları ile sentezlenirken; proteazlar ile aktive olmaktadır. Enzimlerin proteolitik inaktivasyonları in vivo ortamda katalitik aktivitelerini ve fizyolojik önemini

tersinmez olarak kaybetmelerine neden olmaktadır. Fizyolojik koşulların değişmesi ile inaktive olan enzimler bilinmektedir [10].

Proteazlar polipeptidleri daha küçük peptidlere ve amino asitlere parçalayarak hücre tarafından absorpsiyonunu kolaylaştırmaktadırlar. Hücre dışı enzimler depolimerizasyon aktiviteleri ile hücre beslenmesi için temel rolü üstlenmektedir. Memelilerde bu enzimler pankreas tarafından salgılanmakta ve yaşamsal etkinlik için gerekli amino asit ve besin oluşumunu sağlamaktadır [10].

Proteazlar ile gen ekspresyonunun modülasyonu da gerçekleştirilmektedir. *Bacillus thuringiensis* RNA polimerazın B alt ünitesinin transkripsiyonel özgünlüklerindeki değişim onun proteolitik modifikasyonu ile bağlantılıdır [10].

2.2.4 Alkalen Proteazlar

Alkalen proteazların optimum pH'sı 9–11 arasında değişmekle beraber 11.5, 11-12, 12.3 ve 12–13 gibi ekstrem pH aralığına sahip birkaç proteaz da rapor edilmiştir. Yüksek izoelektrik noktalarına sahip olup, 6–12 gibi pH aralıklarında kararlılıklarını koruyabilmektedirler. Optimum sıcaklıkları 50–70 °C arasında değişmektedir. *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. ve *Thermus* sp.'den izole edilen alkalen proteaz enzimleri yüksek sıcaklıklarda stabil olmakla beraber Ca^{2+} iyonu ısıl kararlılıklarını arttırmaktadır [5].

Alkalen proteazların molekül ağırlıkları 15–30 kDa arasında değişmektedir. Ancak 31.6, 33, 36 ve 45 kDa ağırlıklarına sahip az sayıda alkalen proteaz enzimleri rapor edilmiştir. [5].

Alkalen proteazlar maksimum aktivite için Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} gibi divalent katyonlara ihtiyaç duyar. Bu katyonlar aynı zamanda *Bacillus* alkalen proteazların termal stabilizasyonunu da sağlamaktadır. Bu katyonlarla yüksek sıcaklıklarda enzimin aktif konformasyonunun korunduğu düşünülmektedir [5].

Alkalen proteazlar sentetik substratlara karşı nativ proteinlere benzer özgünlük gösterse bile reaksiyon hızları farklılıklar göstermektedir. Alkalen proteazlar ve/veya subtilisinler kazeine karşı hemoglobin ya da sığır serum albumine olandan daha fazla aktivite göstermektedirler. Alkalen proteazlar tirozin, fenil alanin, gibi hidrofobik ya da aromatik amino asitlere özgünlük gösterdikleri gibi karboksil uçta bulunan lösin kalıntısına da özgünlük göstermektedir. İnsülinin substrat olduğu durumlarda Glu⁴-His⁵, Ser⁹-His¹⁰, Leu¹⁵-Tyr¹⁶, -Phe²⁵-Tyr²⁶, Tyr²⁶-Thr²⁷ bağları hidrolizlenmektedir [5].

Bacillus türlerinden saflaştırılan alkalen elastaz elastin ile birlikte süksinil Ala₃-p-nitroanilid gibi elastaz spesifik substratları da katalizlemektedir. Bu enzim elastinde bulunan alanin gibi alifatik amino asitlere özgünlük göstermektedir. Elastolizin elastazın pozitif yüklü kalıntıları ile elastinin negatif yüklü kalıntıları arasında elektrostatik etkileşimlerle enzim-substrat kompleksi oluşumu başladığı düşünülmektedir [5].

Keratinde bulunan disülfid bağları proteinin konformasyonel yapısının oluşumu için çok önemlidir ancak proteolitik degradasyonu önleyici bir unsurdur. Herhangi bir keratinoilik enzimin disülfid bağlarını nasıl redüklediği hala açıklanabilmiş değildir. Ancak ditiyoteritrol (DTT) ve tiyoglikolik asit gibi indirgeyen ajanların kullanımı kerrinde bulunan disülfid bağlarını redükleyerek enzimatik degradasyonu kolaylaştırmaktadır. *Bacillus* sp. no AH-101'den saflaştırılan termostabil alkalen proteaz %1'lik tiyoglikolik asit varlığında pH 12'de ve 70 °C sıcaklıkta keratinoilik aktivite göstererek insan saçında bulunan keratini hidrolizleyebilmekte ve saç 1 saat içinde çözünebilmektedir. *Streptomyces* sp.'den saflaştırılan alkalen proteaz içinde DTT varlığında benzer durum rapor edilmiştir [5].

2.2.5 Organik çözücü ortamında biyokataliz

Enzimlerin pratik katalizör olma özellikleri iyi bilinmektedir. Özellikle, enantiyosafliktaki farmasötiklere yönelik talebin artmasına bağlı olarak asimetrik sentetik dönüşümlerde enzimlerden artan şekilde faydalanılmaktadır. Fakat

enzimlerin kullanımının kendi doğal sulu reaksiyon ortamı ile sınırlı olmasına bağlı olarak, endüstriyel biyo dönüşümlerle ve özellikle de bir takım özelliklere sahip kimyasalların ve polimerlerin üretimi ile ilgili kullanımları çeşitli nedenlerle sınırlıdır. Pek çok benzer bileşik suda çözünmeyip, istenmeyen yan reaksiyonlara da neden olmaktadır. Çoğu prosesin sudaki termodinamik dengesi elverişsizdir ve bazen bu ortamdan ürün eldesi zordur. Prensipte olarak, pek çok durumda reaksiyon ortamı olarak sudan organik çözücü ortamına geçilerek bu tarz problemlerin üstesinden gelinir. İlk bakışta, bu reaksiyon ortamı değişikliği enzimlerin ve diğer proteinlerin organik çözücüler içinde denature olduklarını kabul eden geleneksel düşünceye göre imkânsız görünmektedir. Düşünülenin aksine moleküler lubrikant olarak çalışan suyun yokluğunda enzimlerin yapısı çok rijittir. Sulu organik karışımlarda protein moleküllerinin denature olma eğilimi ve bunun için yeterli esnekliğe sahip olmalarına bağlıdır. Kuru çözücülerde protein katlanmasının açılması (unfolding) eğilimi kuvvetlidir fakat bunun için gerekli esneme kabiliyeti eksiktir. Bu nedenle, kristal halindeki çeşitli enzimler esasen susuz organik çözücülerin içinde dahi doğal yapılarını korurlar [67].

Enzimlerin yüksek katalitik aktiviteye ve substrat özgünlüğüne sahip olmaları onları organik sentezde kullanım açısından çekici kılar. Fakat bu alanda enzimlerin kullanımını çok kısıtlıdır, çünkü enzimlerin sadece su açısından zengin ortamda etkin olduklarına inanılır. Oysa konvansiyonel sulu ortama karşı organik çözücü ortamı kullanımını teknolojik açıdan birçok avantaj sağlar:

- a) Nonpolar substrat çözünürlüğü artar,
- b) Termodinamik denge; hidroliz reaksiyonu yerine ester, peptid, lakton gibi moleküllerin sentezlenmesi reaksiyonlarına kayar,
- c) Kinonların polimerizasyonu ya da asit anhidritlerin hidrolizi gibi suya bağımlı bazı yan reaksiyonların oluşumu azalır,
- d) Enzimlerin çoğu organik çözücüde çözünmediğinden genellikle immobilizasyon gerekli değildir. Kullanılan enzimlerin reaksiyon ortamından basit bir filtrasyon ile alınmaları mümkün olur,

- e) Eğer immobilizasyon gerekiyor ise, immobilizasyonun cam boncuklar gibi gözeneksiz yüzeylere yapılması yeterli olur çünkü enzimler bu yüzeylerden tekrar susuz ortama desorbe olamazlar,
- f) Düşük kaynama noktalı çözücülerden ürün kazanması kolaylaşır,
- g) Mikrobiyal kirlilik azalır ya da elimine edilir,
- h) Bazı transformasyonlarda; sentezlenen ürün, sulu ortamda hidrolize uğramadığından bu tür reaksiyonlar sulu ortamda gerçekleşemez,
- i) Reaksiyonun stereoselektivitesi organik çözücülerle belirlenebilir (sentetik bakış açısı göz önüne alındığında en önemli enzimatik selektivitenin stereoselektivite olduğu görülür),
- j) Enzimlerin kimyasal proseslerde doğrudan kullanılma potansiyeli söz konusu olur [68-70].

Proteazlarla katalizlenen reaksiyonlarda, organik çözücü kullanıldığında, organik çözücü hidrofobik substratları çözer. Organik ortamdaki reaksiyonun dengesi peptid bağı oluşum yönüne doğru kayar ve ürünün hidrolizlenme riski kaybolur. [71].

Enzimlerin organik çözücü ortamında bu denli kullanım üstünlükleri olmasına rağmen sulu ortama oranla oldukça düşük aktivite gösterirler. Bunun nedenleri;

a) Difüzyon: Enzimler suda çözünürler fakat hemen hemen hiçbir organik çözücüde çözünmezler. Bu yüzden organik çözücü içinde süspansiyon halinde kalırlar ve substrat ile arasında difüzyon sınırlaması görülür ki bu sınırlı kütle transferi organik çözücü içinde enzimatik katalizin düşmesine sebep olur.

b) Geçiş Hali Stabilizasyonu: Hidrolazlar için geçiş hali oldukça polardır (geçiş halinde tetrahedral ara ürün oluşur, Şekil 2.8). Su; tetrahedral ara ürünü kendisinden daha düşük polaritedeki çözücülerden daha iyi stabilize eder. Bu tür çözücülerde enzim aktivitesi daha düşük olur.

c) Konformasyonel Hareketlilik: Proteinlerin su ile etkileşimi enzimin biyolojik fonksiyonları, özellikle aktivitesi için çok önemlidir. Su; enzim üzerinde lubrikant rolü oynayarak onun optimal kataliz için gerekli konformasyonel hareketliliğini

sağlar. Non-polar organik çözücüler genelde buna uymazlar, çünkü suyun yaptığı çoklu hidrojen bağlarının oluşumunu önlerler. Buna organik çözücülerin düşük dielektrik sabitleri sebep olur. Bu; daha güçlü elektrostatik etkileşimlere yol açar ve protein daha rijit olur. Enzimin, organik çözücü içinde suya oranla daha düşük aktivite göstermesinin sebebi katalitik bölgedeki konformasyonel hareketliliğinin sınırlandırılmış olmasıdır. Yapılan çalışmalar; enzim molekülünün biyolojik aktivitesini göstermeye başlaması için minimum tek tabaka oluşturmuş su moleküllerine ihtiyaç duyduğunu göstermiştir. Hidrolazlar söz konusu olduğunda suyun sınır konsantrasyonu aşılnca hidrolitik aktivitenin sentetik aktivite ya da transferaz aktivitesi ile ciddi bir yarışa girdiği görülmüştür.

d) pH: Sulu ortamda enzimatik kataliz pH'ya bağlıdır ve enzimin sahip olduğu optimum pH vardır. Organik çözücü ortamında pH kavramı olmadığı için enzimin iyonik gruplarının kontrol altında tutulması gerekir [72].

2.2.5.1 Organik çözücü içinde enzimatik aktivite

Susuz ortamda çalışma yeni enzimatik reaksiyonların oluşmasına sebep olmaktadır. Örneğin; çeşitli lipazlar, esterazlar ve proteazlar su içinde esterlerin asit ve alkoller ile katalizini gerçekleştirirler. Susuz çözücüler içinde bu proses gerçekleşmez. Fakat, alkol, amin ve tiol gibi alternatif nükleofillerin ilavesi ile esterfikasyon, aminolysis ve tiotransesterifikasyona yönlendirilir ki, bu reaksiyonlar sulu çözeltilerde gerçekleşmez. Üstelik asit ve alkolden ester sentezi termodinamik olarak da uygun olur [67].

Genelde, enzimlerin katalitik aktivitesi saf organik çözücü içinde suya oranla daha düşüktür. Fakat etkili önlemler ile bu azalma önlenir. Hidrofobik çözücüler hidrofilik olanlara karşı daha üstündür. Çünkü hidrofilik olanların katalitik aktivite için gerekli olan sağlam su bağlarını enzim molekülünden soyma eğilimleri daha fazladır. Proteinler hemen hemen tüm organik çözücüler içinde çözünmediğinden substratlar için kütle transfer bariyerini elimine etmek için enzim süspansiyonunu iyice karıştırmak ve çalkalamak gerekir [67].

Sulu çözeltilerde enzimatik aktiviteyi en çok etkileyen etmenlerden biri pH'dır. Fakat bu terimin organik çözücü için herhangi bir anlamı yoktur. Bunun yerine bu tür ortamlar için 'pH hafızası' denen bir kavram geliştirilmiştir: bunların katalitik aktivitesi en son işleme maruz kaldıkları sulu çözeltinin pH değerini yansıtmaktadır. Bu kavram; proteinin iyonojenik gruplarının dehidrasyonu ve bunu takiben organik çözücü içindeki son iyonizasyon halini korumalarından kaynaklanır. Sonuç itibarıyla enzim sulu çözeltideki kataliz için gerekli optimal pH ortamında liyofilize edilirse, bu tür ortamlarda enzimatik aktivite birkaç yüz kat arttırılabilir. Alternatif olarak organik çözücü içindeki iyonizasyon grubu optimize edilebilir ve böylece uygun asit ve konjuge bazını içeren tampon ilavesi ile enzimatik aktivite maksimize edilebilir. Enzim, organik çözücü içinde denatüre olabilir fakat kristalin yada liyofilize formda kullanıldığında bu gerçekleşmez. Her iki durumda da enzimin konformasyonu korunur. Fakat liyofilizasyon adımı enzimin yapısal değişikliğe uğrayabilmesi sebebi ile organik çözücü içinde enzimlik aktivitenin düşmesi gözlenebilir. Bu zararlı etki şeker ya da polietilen glikol gibi liyoprotektanların kullanılması ile büyük oranda azaltılabilir [67].

Enzimlerin organik çözücü içinde enzimlik aktivitelerini kaybetmelerinin bir sebebi de yapısal esnekliklerinin (strüktürel fleksibilitelerinin) azalmasıdır. Sulu ortamda enzimler optimal kataliz için gerekli olan konformasyonel mobilitelere sahiptirler. Organik çözücü ortamında da çok katlı hidrojen bağı oluşumu eksikliğinden enzim molekülü daha rijit bir yapıya sahip olur. Bu tür durumlarda da susuz çözücü içindeki enzim süspansiyonuna küçük miktarlarda su ilavesi ile ya da bir başka deyişle suyun termodinamik aktivitesinin arttırılması ile bu tür sistemlerde enzimlik güç birkaç kat arttırılabilir. Suyun bu aktivasyon etkisi çoklu hidrojen bağı yapabilen gliserol ya da etilen glikol gibi çözücülerle de taklit edilerek aktivite arttırılabilir [67].

Enzimlerde gözlenen iki farklı türdeki kararlılık kaybı birbirinden ayrılmalıdır: Bunlardan ilki yüksek sıcaklıklarda ortaya çıkan zamana bağımlı enzimlik aktivitenin tersinmez kaybıdır. Diğer ise; sıcaklık nedenli olarak genellikle aniden gerçekleşen ve tersinir şekilde enzim molekülünün üçüncül yada dördüncül yapısının bozulmasıdır. Su; protein molekülünün konformasyonel hareketliliğini arttırdığından ve peptid bağlarının hidrolizini sağladığından, organik çözücü içinde enzimin suya oranla daha termostabil olması beklenir [67].

Her iki termal inaktivasyonun susuz ortamdaki enzim kararlılığına bakılmıştır. Örneğin porsin pankreatik lipaz, ribonükleaz ve α -kimotripsinin 100 °C'de susuz çözücülerdeki yarı ömürleri birkaç saat iken su içinde bu sıcaklıkta birkaç dakika içinde inaktive olurlar. Su oranı arttıkça organik çözücü içinde enzimin yarı ömrü önemli ölçüde düşer. Örneğin bir alkan olan susuz nonan içinde süspansiyon halinde bulunan sığır pankreatik ribonükleazın katlanmasının bozulma sıcaklığı 124 °C iken su içinde bu 61 °C'dir [67].

2.2.5.2 Çözücünün biyokataliz üzerine etkisi

Organik çözücünün yapısı enzimatik kataliz üzerine üç farklı şekilde etki eder. a) Çözücü enzim ile doğrudan etkileşimde bulunur ve enzim üzerinde inhibisyona ya da inaktivasyona sebep olur. Bu durumda; çözücü enzimin hidrojen bağlarını kırarak ve hidrofobik etkileşimleri bozarak proteinin yapısını bozar ve aktivite ve kararlılığın düşmesine sebep olur. Bu durum, bifazik sistemde ve su ile karışabilen çözücülerde çözünebilir enzimlerin ana problemidir. Enzimin monofazik organik çözücüde çözünmemesi bu sorunun önüne geçer. Bu; enzimin termoinaktivasyona karşı immobilizasyonuna benzer. Enzimin organik çözücü içinde çözünmemesi katalitik aktivite için konum almasını kilitler, birçok enzim organik ortamda oldukça stabildir. b) Çözücünün enzimatik aktiviteyi etkilediği bir diğer etki, reaksiyon ürününe ya da substrata difüzlenererek oluşturduğu etkidir. Örneğin; kloroform peroksidaz katalizli fenollerin katalizlenmesi reaksiyonunda katalitik aktiviteyi anlamlı derecede düşürür. Reaksiyon, hidrojen peroksit varlığında enzimatik yolla fenoksi radikallerinin oluşumu ile başlar. c) Organik çözücü enzim için gerekli olan su ile etkileşebilir. Bu etkileşim enzimi doğrudan etkilemeyip kataliz gücünü etkiler. Polaritesi yüksek çözücüler su içinde çözünebilirler ve enzim için gerekli su tabakasını soyarak inaktivasyona sebep olurlar. Hidrofobik çözücülerin bu tür yeteneği olmadığı için inaktivasyona daha az sebep olurlar [67].

2.2.5.3 Çözücü Seçimi

Çalışılacak reaksiyon ortamı için hangi çözücünün en uygun olduğuna dair birçok etken vardır. Birinci ve en önemli olanı çözücünün ilgilenilen reaksiyon ile uyumluluğudur. Örneğin şekerler sadece su ile karışabilen piridin ya da dimetilformamid gibi hidrofilik çözücüler içinde çözünürler. Su ile karışamayan hidrofobik çözücülerin kullanılması çözünemeyen enzim ve substrat arasında bir etkileşim oluşturamayacağından enzim katalizli şeker modifikasyonları için uygun olmaz. Ürünün çözücü ile uyumluluğu da önemlidir. Polar ürünler enzime yakın yerde olmak isterler bu da ürün inhibisyonuna yol açar [70]. Bu durum hekzan içinde polifenol oksidaz katalizinde görülür. Polar kinon ürün hekzan içinde çözünmez ve su içinde enzim çevresinde istenmeyen polimerizasyona sebep olur. Polimerleşebilen malzeme katalitik aktivitenin düşmesine sebep olur. Daha polar kloroform içinde kinonlar çözücü kütlesi içinde ayrılırlar ve enzimi inaktive etmezler [70].

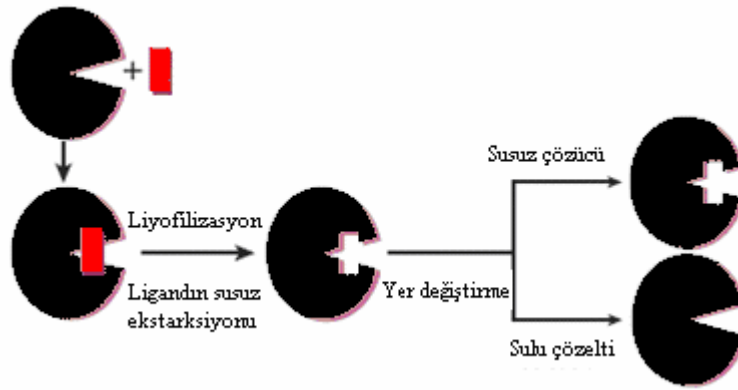
Çözücü seçiminde önemli bir diğer etken seçilen çözücünün reaksiyona karşı inert olması gerekliliğidir. Transesterifikasyon reaksiyonları alkolün ester üzerine nükleofilik atağı sonucu ikincil esterlerin oluşum reaksiyonlarıdır. Eğer bu dönüşüm için kullanılan çözücü de ester olursa çözücü kaynaklı yüksek miktarlarda istenmeyen ester dönüşümleri gerçekleşir. Benzer sonuçlar çözücünün alkol olması durumunda da gözlenir [70].

2.2.5.4 Organik çözücü içinde enzimatik katalizin diğer özellikleri

Organik çözücü içerisinde enzimin en merak uyandıran özelliklerinden biri moleküler hafıza etkisidir ki bu, enzimlerin susuz ortamlardaki yüksek konformasyonel rijiditelerinden kaynaklanır. Bunun bir sonucu olarak da su içinde enzimin davranışı enzim çözeltisinin hazırlanışına bağlı olarak değişim göstermez, organik ortamda enzimin geçmişindeki özelliklere bağlı olarak değişim gösterir. Örneğin; liyofilize α -kimotripsin önce suda çözünüp, sonradan t-amil alkol ile 100 kat seyreltildiğinde; spesifik aktivitesi aynı enzimin liyofilize edilmiş halinin %1 su içeren çözücü içindeki spesifik aktivitesinden daha büyük olur. Süspansiyona daha

fazla su ilave edildiğinde bu enzimi esnek yaparak hafızayı siler, enzimatik aktiviteler arasındaki fark düşer [67].

Subtilisin çeşitli kompetitif inhibitörler içeren sulu ortamda liyofilize edilir ise, organik çözücü içindeki aktivitesi yine liyofilize edilmiş fakat ligand içermeyen enzimin aktivitesinden 100 kat fazla olur, aynı zamanda substrat özgünlüğü ve kararlılığı da farklı olur. Ligand sebepli enzim hafızası enzim sulu ortama alındığında kaybolur (Şekil 2.15). α -kimotripsinin enantiyoselektivitesi ve lipazların substrat selektivitesine ligand ilavesi ile müdahale edilebilir. Bu bulgular ligandın enzimin aktif bölgesinde konformasyonel değişikliklere sebep olduğunu ve organik çözücü içindeki rijiditesinden dolayı ligand ortadan kaldırıldığında bile etkisinin devam ettiğini göstermiştir [67].



Şekil 2. 15: Enzimin aktif bölgesinin ligand ile doyurulmasının şematik gösterimi. Enzimin aktif bölgesi su içinde ligand ile bağlandığında, konformasyonel değişikliğe uğrar. Bu değişiklik liyofilizasyondan sonra ve organik çözücü içinde de sürekliliğini korur. Fakat protein molekülünün esnek olduğu sulu ortama alındığında bu etki kaybolur

Birtakım spesifik avantajlarından dolayı organik çözücü içindeki enzimatik transformasyonlar suya oranla daha avantajlı olur. Örneğin mandelonitril liyaz etil asetat ya da di-izopropil eter ortamında hidrojen siyanidin çeşitli aldehitlere enantiyoselektif katılmasını katalizler ve optikçe aktif R-siyanohidrinleri oluşturur. Sulu çözeltide hidrojen siyanidin non-enzimatik katılması meydana gelir, optikçe aktif ürün oluşturulamaz. Oysa reaksiyon organik çözücü içersinde gerçekleştirildiğinde hem substrat olan aldehitin çözünürlüğü artırılır hem de non-stereoselektif reaksiyonlar gerçekleşmeyip, enantiyomerik saflığı olan ürün elde edilir [67].

2.2.5.5 Organik çözücü varlığında enzimatik katalizi etkileyen faktörler

Organik çözücü seçimi için, organik çözücülerin fizikokimyasal karakteristik özelliklerine göre modeller geliştirilmiştir. Brink ve Tramper [70] tarafından geliştirilmiş modelde propenin epoksidasyonu için Hildebrant çözünürlük parametreleri kullanılmıştır. Buna göre düşük polariteli ve yüksek molekül ağırlıklı çözücülerin (>200 Da) katalitik aktiviteyi desteklediğini bulmuşlardır. Benzer şekilde Laane ve ark. [73] çözücünün hidrofobisitesi ve biyokatalizörün enzimatik aktivitesinin korunması arasında kantitatif korelasyon bulmuşlardır. Yüksek log P değerinin optimal enzimatik aktiviteyi sağladığını belirtmişler ve P'yi; verilen çözücünün su ve 1-oktanol arasındaki partitison sayısı olarak tanımlamışlardır. Buna göre;

$$P = \frac{[\text{Çözücü}]_{\text{oktanol}}}{[\text{Çözücü}]_{\text{su}}}$$

olarak hesaplanır. Burada çözücü molekül ağırlığı ile ilgili korelasyona gerek olmadığı belirtilmiştir. Log P değeri 4'ün üstünde olan çözücüler içinde (dekanol, heksadekan gibi) propen epoksidasyonu reaksiyonunda yüksek derecede aktivite elde etmişlerdir. 2'nin altında olan (düşük zincirli alkoller, su ile karışabilen çözücüler, düşük zincirli eterler ve esterler gibi) çözücülerin biyokataliz için elverişsiz olduğunu bulmuşlardır. Bu bulgular hidrofilik çözücülerin enzim için gerekli su bağlarını soyması ile tutarlıdır.

Yukarıda ifade edilen korelasyonlar katalitik aktivitenin tanımlanması ile ilgilidir. Fakat enzim kararlılığı ve gerçek aktivite arasındaki ayırım iyi yapılmalıdır. Çoğu log P verisi organik çözücü içindeki aktiviteyi belirler. Bu; kararlılıktan çok aktivitenin belirteçidir. Daha doğru bir model çözücünün k_{cat} , K_m gibi belirli kinetik değerler üzerine etkisidir. Bu durumda enzim üzerindeki çözücü etkisi başlangıçtaki enzimatik aktivite ile kantitatif olarak ilişkilendirilebilir [70,73]. Enzimolojide; hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler arasında dielektrik sabiti ile ilişkili olabilecek tek etkileşim elektrostatik etkileşim olarak görülmektedir. Bu etkileşimlerin önemini ve gücünü vurgulayabilmek için organik çözücünün dielektrik sabitinin etkisini analiz etmek gerekmektedir [74]. Geçiş (tranzisyon) halinin stabilizasyonu için çok önemli rol oynadığından elektrostatik

kuvvetler enzim katalizinde önemli bir rol üstlenmişlerdir. Geçiş halinde oluşan oksijen anyon çukurunun stabilizasyonunda çözücünün dielektrik sabiti etkili olmaktadır, bu da katalizi etkilemektedir. Bu yüzden çalışılan çözücü ortamının dielektrik sabitinin belirlenmesi çözücünün katalizi ne kadar etkilediğinin göstergesi olabilmektedir [75].

2.2.5.5.1 Solvatokromizm ve solvatokromik parametreler

Kimyacılar için kimyasal reaksiyonlarda çözücü etkisi olan ve çözücü polaritesi olarak tanımlanan terimin anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Çözücü polaritesinin anlaşılabilmesi için dielektrik sabiti, dipol moment, refraktif indeks gibi makroskobik tanımlar yapılmıştır ancak çözünen/çözücü etkileşimleri mikroskobik seviyede gerçekleşmektedir. Bu yüzden bu tanımlama solvasyon (çözebilme) yeteneği ya da solvasyon gücü olarak belirlenmiş, bu tanımlamanın spesifik-non-spesifik çözünen ve çözücü iyon ya da molekül arasındaki muhtemel tüm kimyasal etkileşimleri içerdiği öngörülmüştür. Bu yüzden çözücü polaritesi kantitatif olarak dielektrik sabiti gibi bir tek çözücü parametresi ile ifade edilmemelidir. Kimyasal reaktivite üzerinde çözücü etkisini tanımlayacak detaylı teorik açıklamalar bulunmadığından ve çözücü polaritesinin tanımının bir tek fiziksel çözücü parametresi ile yapılmasının doğru olmamasından dolayı çözücü polaritesinin deneysel parametreleri konulu çalışmalara başlanmıştır. Bu çalışmaların temelini çözücü bağımlı reaksiyonlar ya da spektral absorpsiyonlar oluşturmaktadırlar ki bu tür yöntemler çözücünün reaksiyon ortamına etkisini incelemek için oldukça elverişlidir. Çözücü polaritesi hakkında bilgi edinmek için solvatokromik boyalar – görsel belirteçler- ilk defa 1951 yılında Brooker tarafından kullanılmıştır (Eastman Kodak Firması) fakat 1958 yılında ilk güvenilir spektroskopik çözücü polaritesi skalası Kosower tarafından yapılmıştır. Bu tarihten itibaren çeşitli UV/görünür/yakın-IR temelli çözücü polaritesi çizelgeleri keşfedilmiş ve bu keşifler farklı kimyasal yapıya sahip ve farklı çözücü/çözünen etkileşimi olan solvatokromik boyalar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kimyasal bileşiklerin UV/görünür/yakın-IR absorpsiyon spektrumlarının çevrelerindeki ortamdan etkilendiği ve absorpsiyon bandının şiddetinin ve keskinliğinin değişmesine sebep olabileceği uzun zamandan beri bilinmektedir. Hantz-schlater tarafından bu olgu solvatokromizm olarak

adlandırılmıştır. Solvatokromizm kromaforun ve çözücü molekülünün kimyasal yapısına ve fiziksel özelliklerine bağlıdır. UV/görünür/yakın-IR spektroskopik ölçümlerin kolaylığından dolayı çözücü polaritesinin deneysel parametreleri solvatokromik bileşikler ile belirlenmiştir. Özellikle çözücü tarafından etkilenmiş UV/görünür/yakın-IR absorpsiyonlarının çözücü bağımlı işlemler için tipik model olacağı düşünülmektedir. Renkli belirteç olan solvatokromik bileşikler UV ve görünür bölgenin yanı sıra yakın-IR bölgesinde de absorpsiyon verdiği için çözücü polaritesinin ölçümü açısından oldukça elverişlidir [76]. Tez çalışmasında π^* , α , β ve E_T^N solvatokromik parametreleri kullanılmıştır.

π^* parametresi; çözücünün bir yükü ya da bir dipolü sahip olduğu dielektrik etkisi ile stabilize edebilme yeteneğinin ölçümü olan dipolarite/polarizlenebilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır [77].

α parametresi; hidrojen bağ donör (HBD) asiditesi olarak da isimlendirilmekle birlikte çözücünün proton verebilme yani bir elektron çiftini verebilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır [77].

β parametresi; hidrojen bağ akseptör (HBA) bazisitesi olarak da isimlendirilmekle birlikte çözücünün çözünen ile hidrojen bağı oluşturmak amacı ile proton kabul edebilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır [77].

E_T^N parametresi; çözücü polaritesi hakkında bilgi veren bir başka parametre olan $E_T(30)$ olarak da adlandırılan parametrenin normalize edilmiş halidir. $E_T(30)$ değeri 1960 yılında Dimroth ve Reichardt tarafından bulunmuş olup bir seri piridinyum betain boyar madde moleküllerinin solvatokromizmini içermektedir. Çözücü polaritesinin $E_T(30)$ skalası 2,6-difenil-4-(2,4,6-trifenil-N-piridino)fenolat'ın intramoleküler yük transfer absorpsiyonu üzerine kurulmuştur. Betainin yapısından dolayı 30 olarak numaralandırılmıştır. $E_T(30)$ farklı çözücülerin polar fragmanları çözebilme yeteneği olarak da tanımlanmaktadır [78].

E_T^N değeri;

$$E_T^N = \frac{E_{T(\text{çözücü})} - E_{T(\text{TMS})}}{E_{T(\text{su})} - E_{T(\text{TMS})}}$$

olarak hesaplanmaktadır. Burada kullanılan su ve TMS (tetrametilen silan) en polar ve non-polar çözücülerini ifade etmektedir. Bu yüzden çözücüler için E_T^N skalası TMS için 0.00 ve su için 1.00 aralığında hesaplanmaktadır. Organik çözücünün reaksiyona etkisine bakılacak ise $E_T(30)$ parametresi dikkate alınır, ancak çoklu parametre korelasyonuna bakılacak ise E_T^N değerinin kullanılması daha uygun olmaktadır [76].

2.2.5.6 Peptid sentezi ve rasemik karışımların ayrılmasında proteazlar

Proteazlar hidroliz ve peptid bağının oluşumunu sağlayan sentez reaksiyonlarını tersinir olarak gerçekleştirebilmektedirler. Enzimatik sentez ile çeşitli ebatlarda peptid oluşumu katalizlenmektedir. Proteazların bu proses için kapasitesi hakkında iki yaklaşım bulunmaktadır. İlkinde sentezin başarısı denge pozisyonunda proteolizin tersinir olmasına ve ürünün su fazından reaksiyon ortam fazına transferine bağlanmıştır. Termodinamik kontrollü sentez olan bu yaklaşımda reaksiyon dengesi su yerine organik çözücü kullanılarak; hidrolizden sentez yönüne kaydırılarak gerçekleştirilmektedir. Dengenin sentez yönüne kaydırılmasında kullanılan bir başka yaygın yöntem de başlangıç maddelerinin konsantrasyonunun artırılması ya da ürünün çökmesini sağlayacak koruyucu grupların kullanılmasıdır. İkinci yaklaşım; reaksiyon komponentlerinin ön aktivasyonu ile ilgilidir. Burada genelde karboksil grubu daha aktif olan ester türevine dönüştürülmektedir. Ester enzim ile açıl ester ara ürününü oluşturur. Oluşan bu ara ürün bir amin ile bağ yaparak amid bağını oluşturur. Bu durum reaksiyonun hidroliz yönünde yürümesini engelleyip oluşan peptid bağlarının hidrolizlenmesini engellemektedir. Bu kinetik kontrollü sentezdir ve organik çözücü ortamında karboksil komponentlerinin aktivasyonu ile termodinamik kontrollü yaklaşımdan daha yüksek oranda dönüşüm sağlanmaktadır. Kinetik kontrollü yaklaşım açıl enzim ara ürününü gerektirdiğinden sadece serin proteazlar için uygundur. Termolizin gibi metaloproteazlar ile termodinamik kontrollü sentez gerçekleştirilmektedir. Fakat kinetik kontrollü sentez daha yaygındır. Kinetik kontrollü reaksiyonlarla pepsin kataliziyle Phe-Arg, Phe-homofenilalanin, Phe- o- nitrotirozin, Phe-S-metilsistein peptid bağları ve subtilisin kataliziyle Ser-Arg, Arg-Arg peptid bağları sentezlenmiştir [80,81].

Aspartil proteazlar sınıfına dahil pepsin ile orta boyutlara sahip kontrollü peptid bağları sentezlenmektedir. Ester ya da p-nitro anilid ile amino asitlerin N- terminal ucu korunarak N- ucu korunmuş peptidler elde edilir. Kimozin de pepsin benzeri enzim olup, peptid bağ oluşumunu katalizlemektedir [81].

Metaloproteazlar sınıfına dahil termolizin ile de denge kontrollü sentezle etkin bir şekilde peptid bağı sentezlenmektedir. Bu enzimin kullanıldığı en yaygın peptid sentezi tatlandırıcı olarak kullanılan düşük kalorili aspartam sentezidir. Başka peptidlerin oluşumu da kromojenik substratlar kullanılarak takip edilebilmektedir. Termolizin ile Z-Phe-OH (Z; benziloksikarbonil grubunu simgelemektedir) ve H-Leu-NH₂ yada H-Leu-NHPh ile ya da Z-Ala-Ala-OH ve H-Leu-NHC₆H₄NO₂ ile oldukça yüksek miktarlarda dipeptidler ve türevleri oluşturulabilmektedir [81,82].

Serin proteazlar sınıfına dahil subtilisin ve diğer serin proteazlar da su-organik çözücü varlığında peptid bağı üretebilen etkili enzimlerdir. Subtilisin 72'nin kullanıldığı reaksiyon ortamında ürünün oluşup reaksiyon ortamında çökmesi ile ürünün hidrolize uğrama tehlikesi azalır. Reaksiyonun başarısının artırılması için subtilisin makroporöz yapılı silika üzerine tutturulup reaksiyon düşük su ortamında gerçekleştirildiğinde hidrolize sebep olan su aktivitesi daha fazla azaltılarak reaksiyon ürün oluşumu yönüne yönlendir. Açılasyon komponentlerinin ön aktivasyonu ile de reaksiyon kinetik kontrollü olarak yürütülür. Bu yöntem arjinin ya da lizin p-nitro anilid ya da amid türevli peptid bağı oluşumu için oldukça başarılı bir yöntemdir [81].

Subtilisin BPN^I *Bacillus amyloliquefaciens*'den izole edilen, geniş yelpazede peptid sentezi oluşumunu katalizleyen serin proteazlar sınıfına dâhil bir enzimdir. Peptid sentezi için serin proteaz kullanımı koruyucu grupların kullanım gerekliliğini azaltmakla birlikte katı faz peptid sentezi sırasında rasemizasyon problemini tamamen ortadan kaldırmaktadır. DMF (dimetilformamid); substratları çözebilme yeteneği, su aktivitesini düşürerek dengeyi proteolizden peptid oluşum yönün kaydırması, hidroliz kaynaklı amino nükleofillerinin yüklü grupların iyonizasyonunu önleyebildiği için peptid sentezi oluşumunda ideal bir çözücüdür. Fakat; yaban tip subtilisin peptid sentezi için gerekli DMF konsantrasyonlarında stabil değildir.

Yönlendirilmiş mutagenез ile mutasyona uğratan mutan subtilisinler kullanılarak bu sorun giderilmiştir [83].

Endüstriyel proteaz olarak rapor edilen alkalaz; polar alkol çözücülerin yüksek kararlılığı ve aktivitelerinden dolayı ve aynı zamanda D ve L- amino asit kalıntılarını nükleofil olarak kabul edebilme kapasitesinden dolayı peptid sentezini başarı ile gerçekleştirebilmektedir. Peptid sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için proteazların substrat özgünlüğü göstermelerinin yanı sıra kullanılan organik çözücü varlığında stabil olması ve aktivite göstermesi ve sentezin gerçekleştiği reaksiyonda her adımın optimize edilmesi gerekmektedir. Apolar organik çözücüler varlığında substratların çözünlüğü-özellikle de hidrofilik amino asitleri söz konusu olduğunda-hidrofilik peptid sentezi için önemli bir faktördür. Susuz etanol ve t-bütanol varlığında, kinetik kontrollü olarak, alkalaz katalizli, yüksek miktarda küçük peptid sentezi gerçekleştirilmiştir [7].

Enzimatik metodlarla gerçekleştirilen peptid sentezinin alternatif yöntemi kimyasal yöntemlerle peptid sentezinin gerçekleştirilmesidir. Ancak kimyasal yöntemlerle karşılaştırıldığında enzimatik peptid sentezi; (i) ılımlı reaksiyon koşullarında gerçekleştirilmesi, (ii) substrat korumasına gerek kalmadan enzimin yüksek regioözgünlük göstermesi, (iii) razemizasyona gerek kalmadan reaksiyonun stereospesifik olarak gerçekleşmesi gibi nedenlerle kimyasal yöntemlere karşı üstünlük göstermektedir [84].

Rasemik karışımlardan enantiyomerik saflıkta ürün elde edilmesinde enzimlerden yararlanılmaktadır. Bu ürünler özellikle eczacılık alanında yüksek talep görmektedirler. Kimyasal yöntemlerle ayrılamayan rasemik karışımların ayrılmasında ve enantiyo saflıkta ürün elde edilmesinde proteazların kullanıldığı yayınlar literatürde bulunmaktadır [85].

2.3 *Bacillus clausii* GMBAE 42 Serin Alkalen Proteaz Enziminin Genel Özellikleri

Çalışmada kullanılan alkalen proteaz *Bacillus clausii* GMBAE 42 soyundan saflaştırılmıştır [9]. Bu mikroorganizma; gram-pozitif, spor oluşturabilen, aerobik,

katalaz ve oksidaz pozitif ve alkalifik bir bakteridir. pH 10'da büyür ve pH 11'de oldukça aktif alkalen proteaz üretir [12]. Enzimin molekül ağırlığı 26.5 kDa olarak bulunmuştur. Enzimin aktivite göstermesi için optimum sıcaklık 60 °C'dir fakat 5mM Ca⁺² ilavesinden sonra bu değerin 70 °C'ye kaydığı gözlenmiştir. Enzim; pH 10.5'de 30 ve 40 °C'de 2 saat stabil kalabilmektedir fakat sıcaklık 50 °C'ye çıktığında % 14 aktivite kaybı gözlenmiştir. Enzim için optimal pH 11.3'tür. pH 9-12.2 aralığında 30 °C'de 24 saat stabildir fakat pH 12.7 ve 13'e çıktığında %38 ve %76 aktivite kaybı oluşmuştur. Enzim kimotripsine benzer serin alkalen proteazdır ve PMSF ile şiddetle inhibe olmaktadır [9].

2.4 Tez Çalışmasında Kullanılan Kinetik ve Termodinamik Bağlılar

2.4.1 K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi için Michaelis–Menten denklemi

Organik çözücü varlığında ve yokluğunda *Bacillus clausii* GMBAE 42 serin alkalen proteaz enziminin kazein hidrolizinin K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesinde yataşkın hal (steady state) yaklaşımına göre türetilmiş ve başlangıç hızı koşullarında geçerli aşağıda yazılı Michaelis–Menten denklemi ve onun resiprokal formu kullanılmıştır [86].

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

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

Denklemlerde;

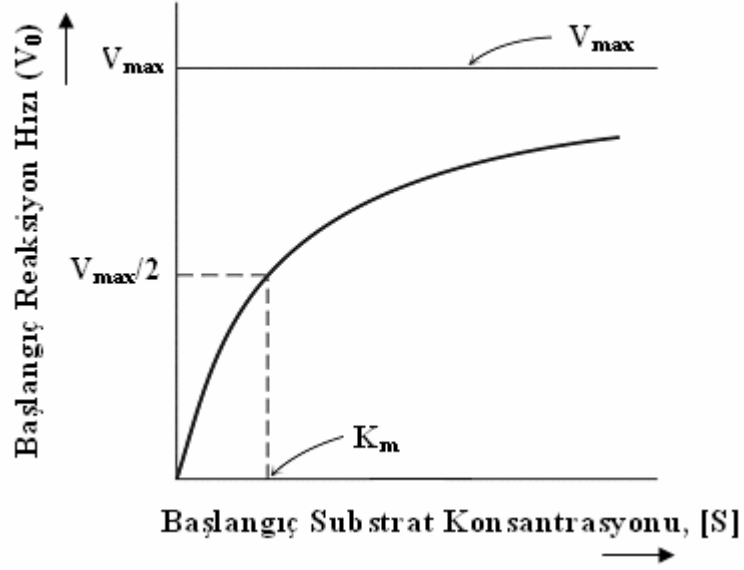
v: 30 °C ve pH 10.5'de ölçülen kazein hidrolizinin reaksiyonunun başlangıç hızını (U mL⁻¹ dak⁻¹),

[S]: 50 mM pH 10.5 NaOH – Glisin – NaCl tampon çözeltisinde çözülmüş kazeinin başlangıç konsantrasyonunu (mg mL⁻¹),

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

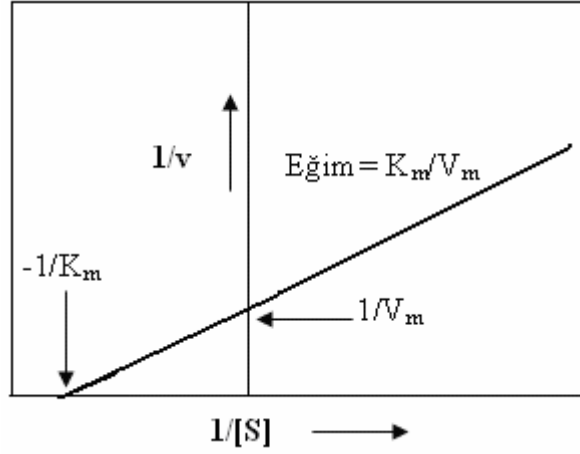
V_m : Kazein hidrolizi için ulaşılabilecek maksimal başlangıç hızını ($\text{U mL}^{-1} \text{ dak}^{-1}$) göstermektedir.

(2.1) no'lu denklem v 'ye karşı $[S]$ gelecek şekilde işaretlendiğinde şekil (2.16)'da görülen hiperbol elde edilir.



Şekil 2. 16: Reaksiyon başlangıç hızının (v) substrat başlangıç konsantrasyonuna $[S]$ bağlı olarak değişimi

(2.1) no'lu denklem $1/v$ 'ye karşı $1/[S]$ gelecek şekilde işaretlendiğinde şekil (2.17)'de gösterilen Lineweaver–Burk diyagramı elde edilir. Bu diyagramdan elde edilen doğrunun eğiminden, $1/v$ ve $1/[S]$ eksenini kestiği noktalardan K_m ve V_m değerleri hesaplanır.



Şekil 2. 17: Michaelis-Menten kinetiğine uyan enzimatik kataliz için Lineweaver–Burk diyagramı

Enzimin V_m değeri ile reaksiyon ortamındaki toplam enzim konsantrasyonu arasında;

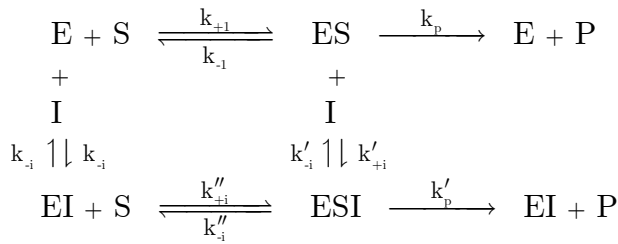
$$V_m = k_{cat} \cdot [E]_t \quad (2.3)$$

bağıntısı vardır.

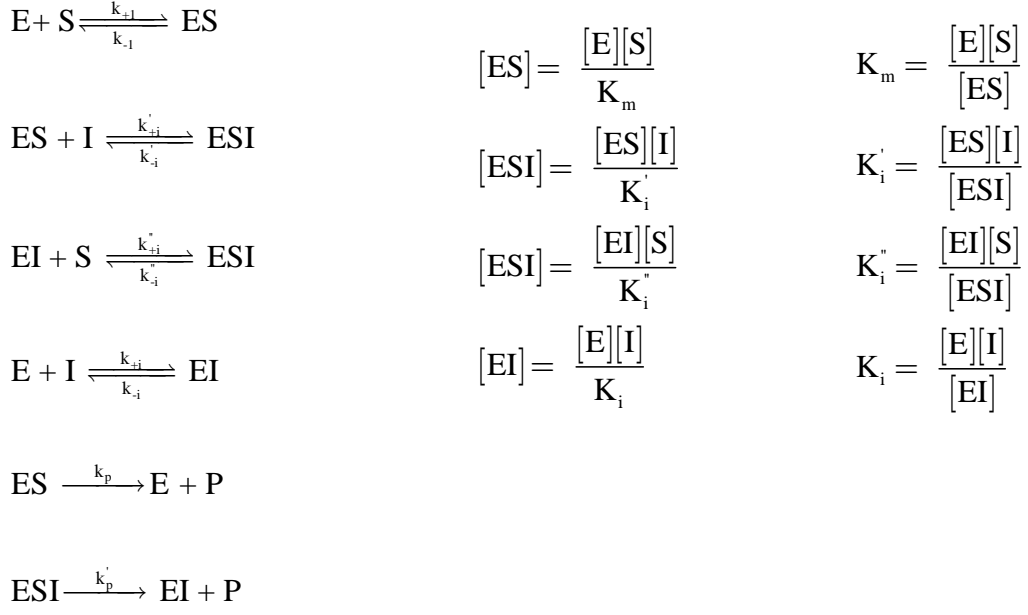
$[E]_t$: Toplam enzim konsantrasyonunu ($\mu\text{mol/mL}$),

k_{cat} : Enzim için katalitik hız sabitini (turn – over sayısını) (dak^{-1}) göstermektedir.

Organik çözücüler varlığında tersinir inhibisyonlar için geçerli genel mekanizma, kinetik bağıntılar ve görünen K_m ve V_m değerlerine ait bağıntılar aşağıda verilmiştir.



Tersinir enzim inhibisyonunun genel mekanizması göz önüne alınarak aşağıdaki reaksiyonlar yazılabilir.



$$K_m = \frac{k_{-1} + k_p}{k_{+1}} \quad K_i = \frac{k_{-i}}{k_{+i}} \quad K'_i = \frac{k'_{-i}}{k'_{+i}} \quad K''_i = \frac{k''_{-i}}{k''_{+i}}$$

$$K'_i = \alpha K_i \quad K''_i = \alpha K_m \quad k'_p = \beta k_p$$

Burada k_{-1} , k_{+1} , k_{-i} , k_{+i} , k'_{-i} , k'_{+i} , k''_{-i} , k''_{+i} hız sabitlerini, K_i , K'_i , K''_i inhibitöre ait ayrışma sabitlerini, K_m Michaelis-Menten sabitini, k_p katalitik hız sabitini, α ve β parametreleri göstermektedir.

$v_i = k_p [ES] + k'_p [ESI]$ ve $V_m = k_p [E]_t$ olması durumunda tersinir inhibisyon için yazılan genel reaksiyon başlangıç hız denklemi aşağıda gösterildiği gibi olur.

$$v_i = \frac{V_m \left(1 + \frac{\beta[I]}{\alpha K_i}\right) [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (2.4)$$

$$V_{m, \text{gör}} = V_m \frac{\left(1 + \frac{\beta[I]}{\alpha K_i}\right)}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)} \quad (2.5)$$

$$K_{m, \text{gör}} = K_m \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)} \quad (2.6)$$

(2.4) no'lu denklemin resiprokali;

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{\beta[I]}{\alpha K_i}\right)} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \cdot \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{\beta[I]}{\alpha K_i}\right)} \quad (2.7)$$

(2.7) no'lu denklemi vermektedir. Bu denklemin eğimi ve intersepti (2.8) ve (2.9) no'lu denklemleri oluşturmaktadır.

$$\text{Eğim} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{\beta[I]}{\alpha K_i}\right)} \quad (2.8)$$

$$\text{intersept} = \frac{1}{V_m} \cdot \frac{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)}{\left(1 + \frac{\beta[I]}{\alpha K_i}\right)} \quad (2.9)$$

(2.4), (2.5), (2.6), (2.7), (2.8) ve (2.9) no'lu denklemlerde;

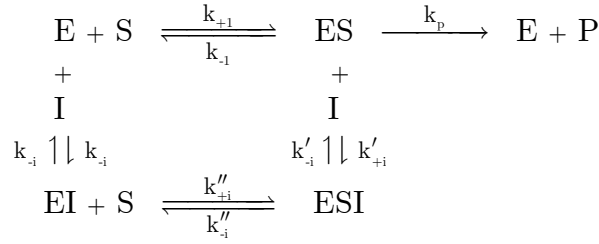
$\alpha = 1, \beta = 0$ ise gerçek non – kompetitif inhibisyon,

$\alpha = 1, 0 < \beta < 1$ ise kısmi non – kompetitif inhibisyon,

$1 < \alpha < \text{sonsuz}, \beta = 1$ ise kısmi kompetitif inhibisyon,

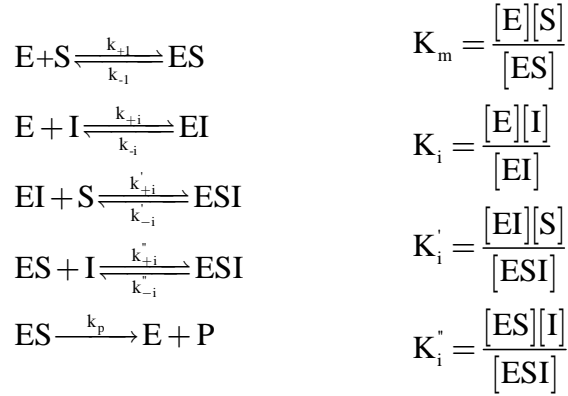
$1 < \alpha < \infty$, $\beta = 0$ ise kısmi kompetitif – gerçek non – kompetitif inhibisyon,
 $0 < \alpha < \infty$, $\beta = 0$ ise kısmi un – kompetitif – gerçek non – kompetitif inhibisyon,
 $0 < \alpha < 1$, $0 < \beta < 1$, $\alpha = \beta$ ise kısmi un – kompetitif inhibisyon söz konusu olur.

Gerçek non–kompetitif inhibisyon söz konusu olduğunda; $\alpha=1$, $\beta=0$, $K_i=K'_i$, $K''_i=K_m$ olur. Gerçek non–kompetitif inhibisyonun mekanizması aşağıda verilmiştir.



Gerçek non–kompetitif inhibitör varlığında oluşan [ESI] katalitik olarak inaktiftir.

Yukarıdaki mekanizma göz önüne alınarak aşağıdaki reaksiyonlar yazılabilir.



(2.4) no'lu eşitlikte verilen genel tersinir inhibisyonun başlangıç hız denkleminde $\alpha=1$ ve $\beta=0$ yerine yazıldığı zaman gerçek non–kompetitif inhibisyon varlığındaki başlangıç hız denklemi (2.10) no'lu eşitlikteki şekline indirgenir.

$$v_i = \frac{\frac{V_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (2.10)$$

(2.10) no'lu denklemden yararlanılarak gerçek non – kompetitif inhibitör varlığında görünen K_m ve V_m için (2.11) ve (2.12) eşitlikleri yazılır.

$$V_{m, \text{gör}} = \frac{V_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (2.11)$$

$$K_{m, \text{gör}} = K_m \quad (2.12)$$

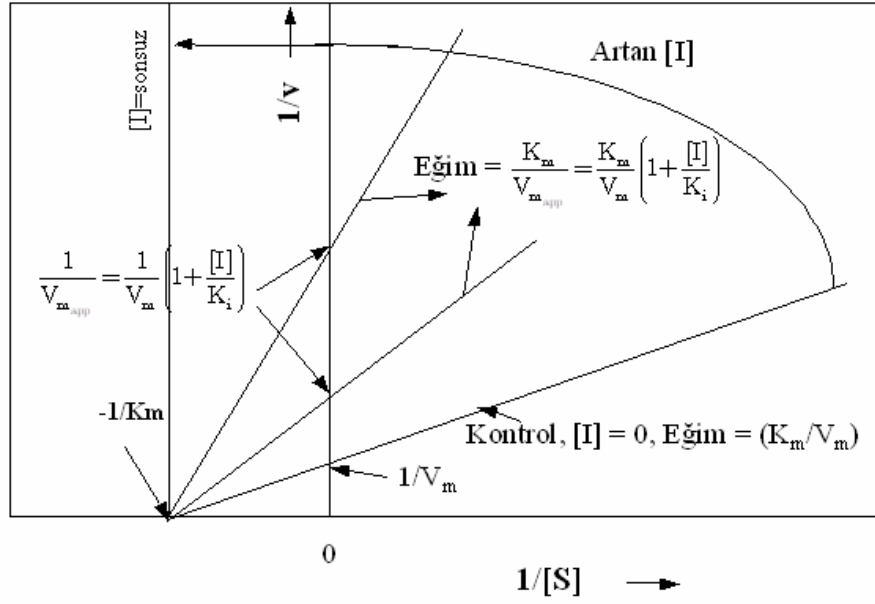
(2.10) no'lu denklemin Lineweaver–Burk diyagramı çizilmek üzere resiprokali alındığında (2.13) no'lu denklem elde edilir. Bu denklemin intersept ve eğimleri (2.14) ve (2.15) bağıntıları ile ifade edilir.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad (2.13)$$

$$\text{intersept} = \frac{1}{V_{m, \text{app}}} = \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad (2.14)$$

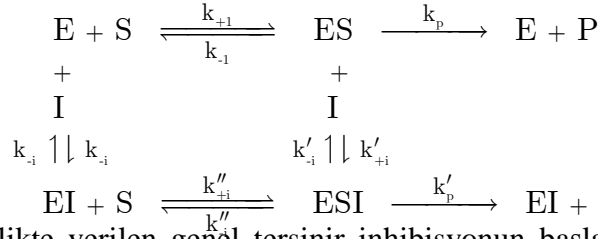
$$\text{Eğim} = \frac{K_m}{V_{m, \text{gör}}} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad (2.15)$$

(2.13)no'lu denklem $1/v$ 'ye karşı $1/[S]$ gelecek şekilde işaretlendiğinde gerçek non–kompetitif inhibisyon için Lineweaver–Burk diyagramı şekil 2.18'deki gibi çizilir.



Şekil 2. 18: Gerçek non-kompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk diyagramı

$\alpha = 1$, $0 < \beta < 1$ olan durumda ise inhibisyon kısmi non-kompetitif inhibisyon olur. Bu durumda $K_i = K_i'$ ve $K''_i = K_m$ olur. Kısmi non-kompetitif inhibisyon için genel mekanizma aşağıdaki gibidir.



(2.4) no'lu eşitlikte verilen genel tersinir inhibisyonun başlangıç hız denkleminde $\alpha=1$ ve $0 < \beta < 1$ yerine yazıldığı zaman kısmi non-kompetitif inhibisyon varlığındaki başlangıç hız denklemi (2.16) no'lu eşitlikteki şekline indirgenir.

$$v_i = \frac{V_m \left(1 + \frac{\beta[I]}{K_i}\right)}{K_m + [S]} \cdot [S] \quad (2.16)$$

(2.16) no'lu denklemden yararlanılarak kısmi non-kompetitif inhibitör varlığında görünen K_m ve V_m değerleri (2.17) ve (2.18) eşitlikleri ile ifade edilir.

$$V_{m,gör} = V_m \frac{1 + \frac{\beta[I]}{K_i}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad (2.17)$$

$$K_{m,gör} = K_m \quad (2.18)$$

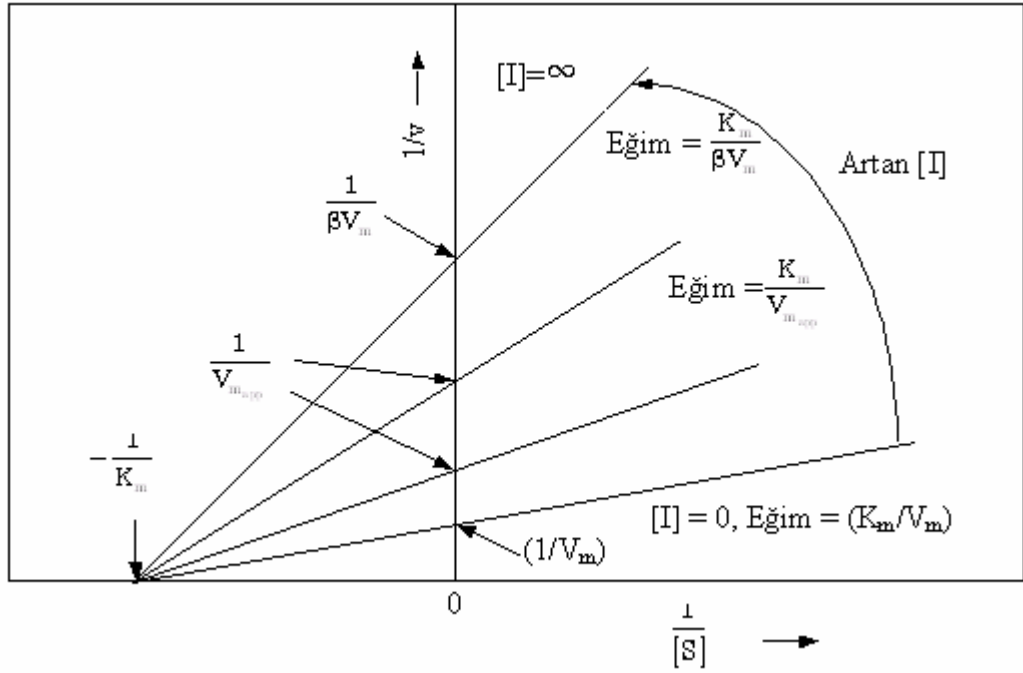
(2.16) no'lu denklemin Lineweaver–Burk diyagramı çizilmek üzere resiprokali alındığında (2.19) no'lu denklem elde edilir. Bu denklemin intersept ve eğimi (2.20) ve (2.21) bağıntısıyla ifade edilir.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{\beta[I]}{K_i}\right)} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{\beta[I]}{K_i}\right)} \quad (2.19)$$

$$\text{intersept} = \frac{1}{V_{m,app}} = \frac{1}{V_m} \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{\beta[I]}{K_i}\right)} \quad (2.20)$$

$$\text{Eğim} = \frac{K_m}{V_{m,gör}} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{\beta[I]}{K_i}\right)} \quad (2.21)$$

(2.19) no'lu denklem $1/v$ 'ye karşı $1/[S]$ gelecek şekilde işaretlendiğinde kısmi non–kompetitif inhibisyon için Lineweaver–Burk diyagramı şekil 2.19'daki gibi çizilir.



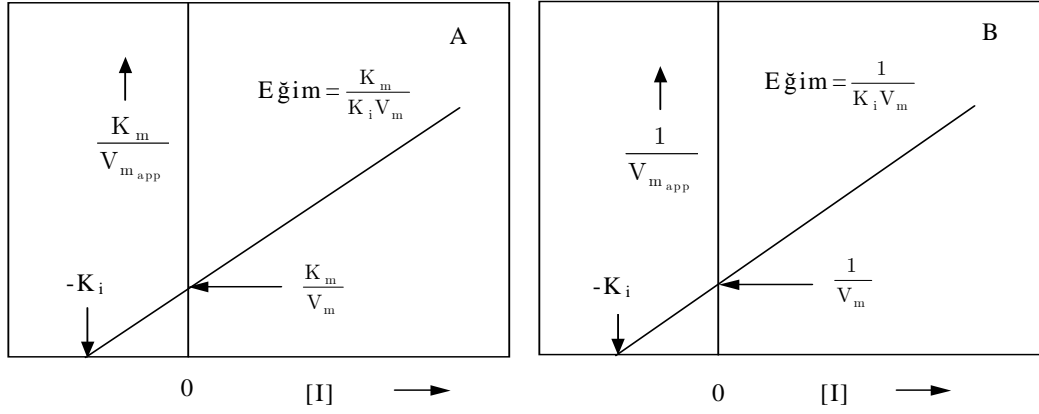
Şekil 2. 19: Kısmi non-kompetitif inhibisyon için Lineweaver–Burk diyagramı

Şekil 2.19'daki Lineweaver–Burk diyagramı ile inhibisyonun non-kompetitif tipte olduğu belirlenebilir. Ancak gerçek ya da kısmi non-kompetitif inhibisyon olduğunu belirleyebilmek ve K_i inhibisyon sabitini hesaplayabilmek için aşağıda ifade edildiği şekilde ileri aşamalı çizimler yapmak gerekmektedir. Pratik olarak inhibitör konsantrasyonunun sonsuz olduğu konsantrasyonlara gidilememektedir.

Lineweaver–Burk diyagramından yararlanılarak; yani (2.20) ve (2.21) denklemlerinin $[I]$ 'ye karşı işaretlendiğinde lineer doğrular verecek şekilde düzenlenmesiyle ikincil çizimler elde edilir. Non-kompetitif inhibisyon için ikincil çizimleri veren doğru denklemleri (2.22) ve (2.23) no'lu denklemlerdir.

$$\frac{K_m}{V_{m_{app}}} = \frac{K_m}{V_m K_i} [I] + \frac{K_m}{V_m} \quad (2.22)$$

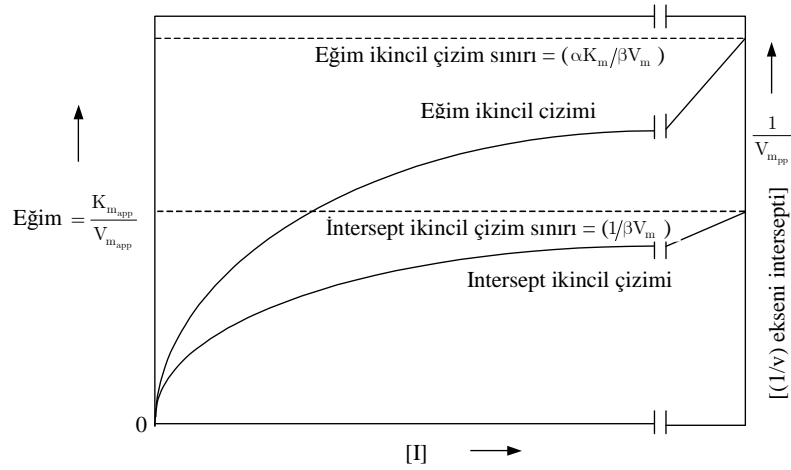
$$\frac{1}{V_{m_{app}}} = \frac{1}{V_m K_i} [I] + \frac{1}{V_m} \quad (2.23)$$



Şekil 2. 20: Non-kompetitif inhibisyon için ikincil çizimler

(2.22) ve (2.23) no'lu denklemlerden türetilen ikincil çizimler Şekil 2.20'de gösterilmiştir. Şekil 2.20'deki doğruların eğiminden, interseptinden ve x eksenini kestiği noktalardan K_m , V_m ve K_i değerleri hesaplanır. İkincil çizimin doğrusal grafik oluşturması inhibisyonun gerçek (basit) inhibisyon olduğunu göstermektedir.

Ancak ikincil çizimlerden her zaman doğrusal grafik elde edilemeyebilir.



Şekil 2. 21: Non-kompetitif inhibisyon için hiperbollerin oluştuğu ikincil çizim

Şekil 2.21'de görülen hiperbollerin oluşması durumunda inhibisyon kısmi (hiperbolik) non-kompetitif inhibisyon olur. Oluşan hiperbollerin doğrusallaştırılması için üçüncül çizimlere gidilir. Üçüncül çizimler $\frac{1}{\Delta_{\text{eğim}}}$ 'e

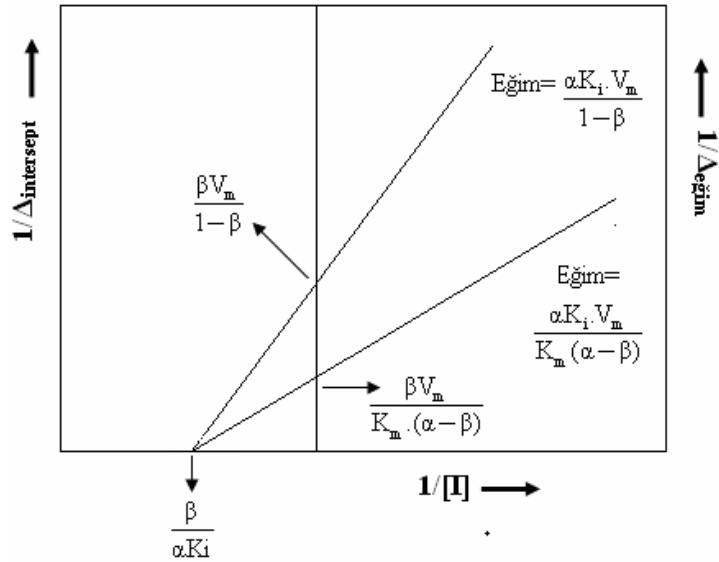
karşı $\frac{1}{[I]}$ ve $\frac{1}{\Delta_{\text{intersept}}}$ 'e karşı $\frac{1}{[I]}$ değerleri işaretlendiğinde lineer doğrular verecek şekilde elde edilir.

$\Delta_{\text{eğim}}$ ve $\Delta_{\text{intersept}}$ görünen eğimin ve görünen inteseptin gerçek eğim ve inteseptten farkı alınarak elde edilir. Buna göre (2.24) ve (2.25) denklemleri türetilir.

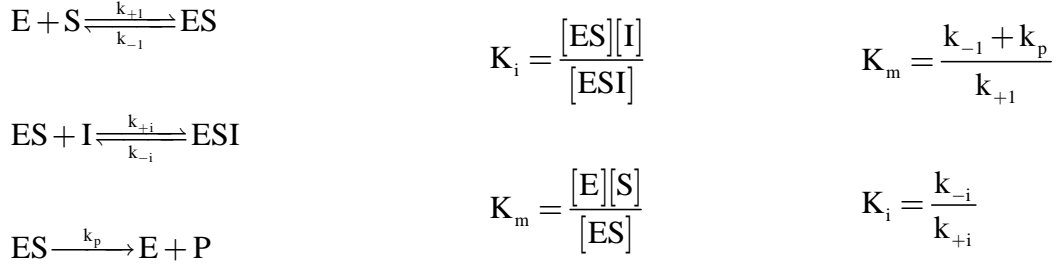
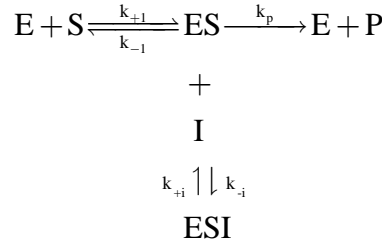
$$\frac{1}{\Delta_{\text{eğim}}} = \frac{\alpha K_i \cdot V_m}{K_m \cdot (\alpha - \beta)} \cdot \frac{1}{[I]} + \frac{\beta V_m}{K_m \cdot (\alpha - \beta)} \quad (2.24)$$

$$\frac{1}{\Delta_{\text{intersept}}} = \frac{\alpha K_i V_m}{(1 - \beta)} \frac{1}{[I]} + \frac{\beta V_m}{(1 - \beta)} \quad (2.25)$$

(2.24) ve (2.25) denklemleri kullanılarak elde edilen üçüncül çizimler Şekil 2.22'de gösterilmiştir. Elde edilen doğruların eğiminden, interseptinden ve x eksenini kestiği noktalardan α , β ve K_i değerleri hesaplanır.



Şekil 2. 22: Kısmi non-kompetitif inhibisyon için üçüncül çizim
Un-kompetitif inhibisyon için genel mekanizma ve reaksiyonlar aşağıdaki gibidir:



Yukarıdaki eşitlikler ışığında un-kompetitif inhibisyon için başlangıç hız denklemi;

$$v_i = \frac{\frac{V_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \cdot [S]}{\frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} + [S]} \quad (2.26)$$

şeklini alır. (2.26) no'lu denklemden yararlanılarak un-kompetitif inhibitör varlığında görünen K_m ve V_m değerleri (2.27) ve (2.28) eşitlikleri ile ifade edilir.

$$V_{m,gör} = \frac{V_m}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad (2.27)$$

$$K_{m,gör} = \frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad (2.28)$$

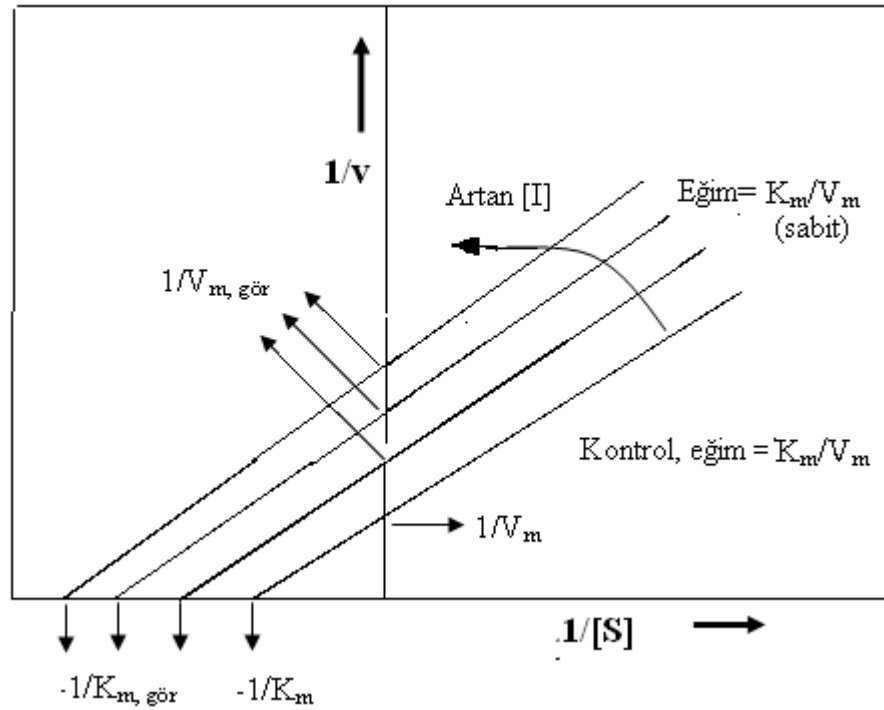
(2.26) no'lu denklemin Lineweaver-Burk diyagramı çizilmek üzere resiprokali alındığında (2.29) no'lu denklem elde edilir.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad (2.29)$$

$$\text{Eğim} = \frac{K_m}{V_m} \quad (2.30)$$

$$\text{intersept} = \frac{1}{V_{m,\text{gör}}} = \frac{1}{V_m} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad (2.31)$$

(2.29) no'lu denklem $1/v$ 'ye karşı $1/[S]$ gelecek şekilde işaretlendiğinde un-kompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk diyagramı şekil 2.23'teki gibi çizilir.

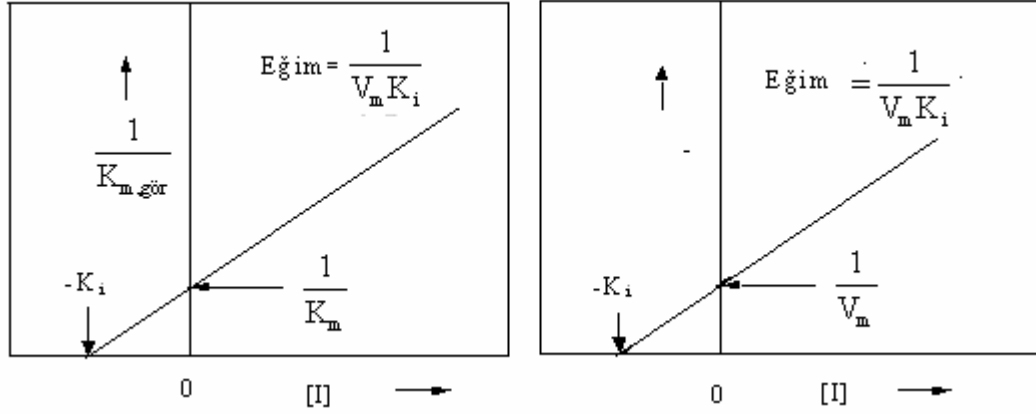


Şekil 2. 23: Un-kompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk diyagramı

Lineweaver-Burk diyagramından yararlanılarak un-kompetitif inhibisyon için ikincil çizimler (2.32) ve (2.33) no'lu denklemlerden yararlanılarak Şekil 2.24'deki gibi çizilir. Grafiklerden elde edilen doğruların eğimlerinden, interseplerinden ve x eksenlerini kestikleri K_m , V_m ve K_i değerleri hesaplanır.

$$\frac{1}{K_{m,gör}} = \frac{1}{K_m \cdot K_i} [I] + \frac{1}{K_m} \quad (2.32)$$

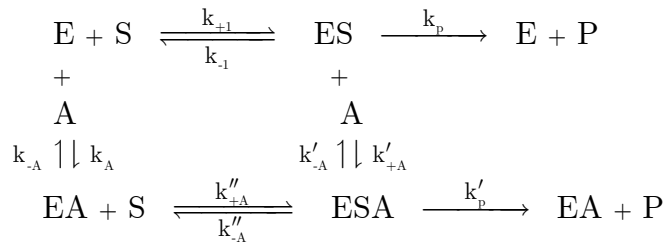
$$\frac{1}{V_{m,gör}} = \frac{1}{V_m \cdot K_i} \cdot [I] + \frac{1}{V_m} \quad (2.33)$$

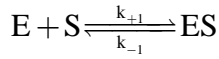


Şekil 2. 24: Un–kompetitif inhibisyon için ikincil çizimler

2.4.2 Enzim aktivasyonu söz konusu olduğu durumda kullanılan kinetik bağıntılar

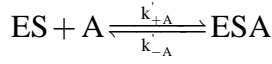
Enzimin katalitik hızını arttıran maddelere aktivatör denir. Aktivatörler etkileyiş biçimlerine göre ikiye ayrılırlar: zorunlu (essential) aktivatörlerde enzim için gerçek substrat aktivatör ile substratın oluşturduğu substrat aktivatör kompleksidir. Bu kompleks oluşmadığı sürece enzim substratına bağlanamaz. Enzimin gösterdiği bu durumdaki davranış Lineweaver–Burk davranışına uymayıp, allosterik davranış gösterir. Zorunlu olmayan (non-essential) aktivasyon söz konusu olduğunda aktivatör reaksiyon hızını arttırmakla birlikte; aktivatör yokluğunda da reaksiyon gerçekleşebilmektedir. Zorunlu olmayan aktivasyonun mekanizması ve denklemleri aşağıda verilmiştir.





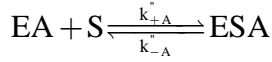
$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m}$$

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}$$



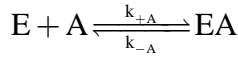
$$[ESA] = \frac{[ES][A]}{K'_A}$$

$$K'_A = \frac{[ES][A]}{[ESA]}$$



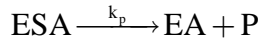
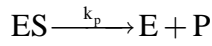
$$[ESA] = \frac{[EA][S]}{K''_A}$$

$$K''_A = \frac{[E][A]}{[EA]}$$



$$[EA] = \frac{[E][A]}{K_A}$$

$$K''_A = \frac{[EA][S]}{[ESA]}$$



$$K_m = \frac{k_{-1} + k_p}{k_{+1}}, \quad K_A = \frac{k_{-A}}{k_{+A}}, \quad K'_A = \frac{k'_{-A}}{k'_{+A}}, \quad K''_A = \frac{k''_{-A}}{k''_{+A}}$$

$$K'_A = \alpha K_A, \quad K''_A = \alpha K_m, \quad k'_p = \beta k_p$$

Burada k_{-A} , k_{+A} , k'_{-A} , k'_{+A} , k''_{-A} , k''_{+A} değerleri hız sabitlerini; K_A , K'_A , K''_A aktivatöre ait ayrışma sabitlerini, K_m Michaelis-Menten sabitini, k_p hız sabitini, α ve β parametreleri göstermektedir.

$$v_A = k_p [ES] + k'_p [ESA]$$

$$V_m = k_p [E]_t$$

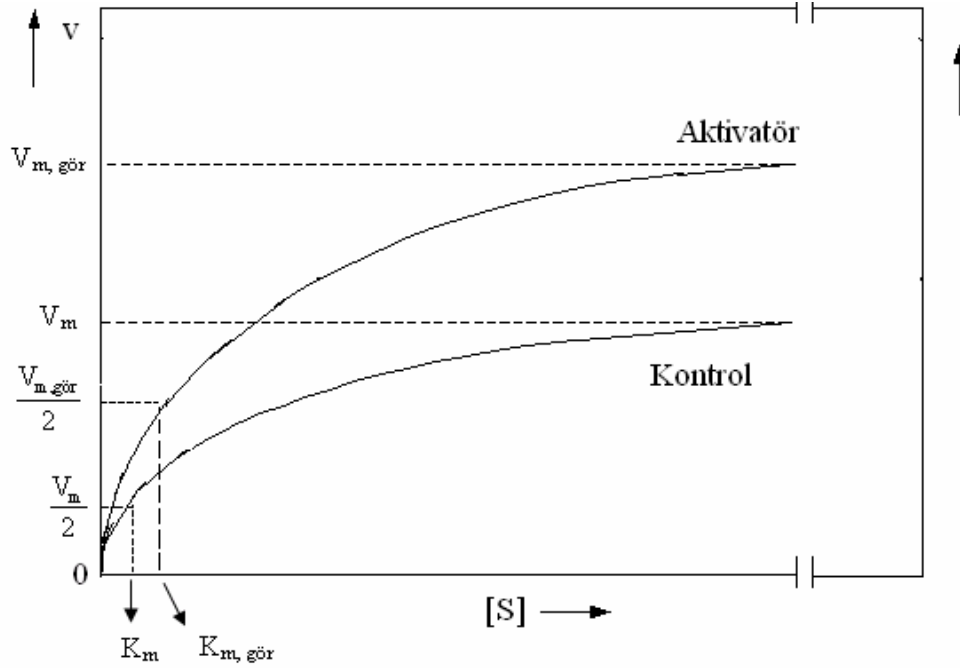
olduğu düşünülürse aktivasyon olması halinde reaksiyonun hız denklemi (2.34) no'lu denklem ile ifade edilir.

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

(2.34) no'lu denklemden yararlanılarak zorunlu olmayan aktivasyon durumunda görünen K_m ve görünen V_m (2.35) ve (2.36)'de verilen formüllerdeki gibi hesaplanır.

$$V_{m,gör} = V_m \frac{\left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_A}\right)}{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_A}\right)} \quad (2.35)$$

$$K_{m,gör} = K_m \frac{\left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)}{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_A}\right)} \quad (2.36)$$



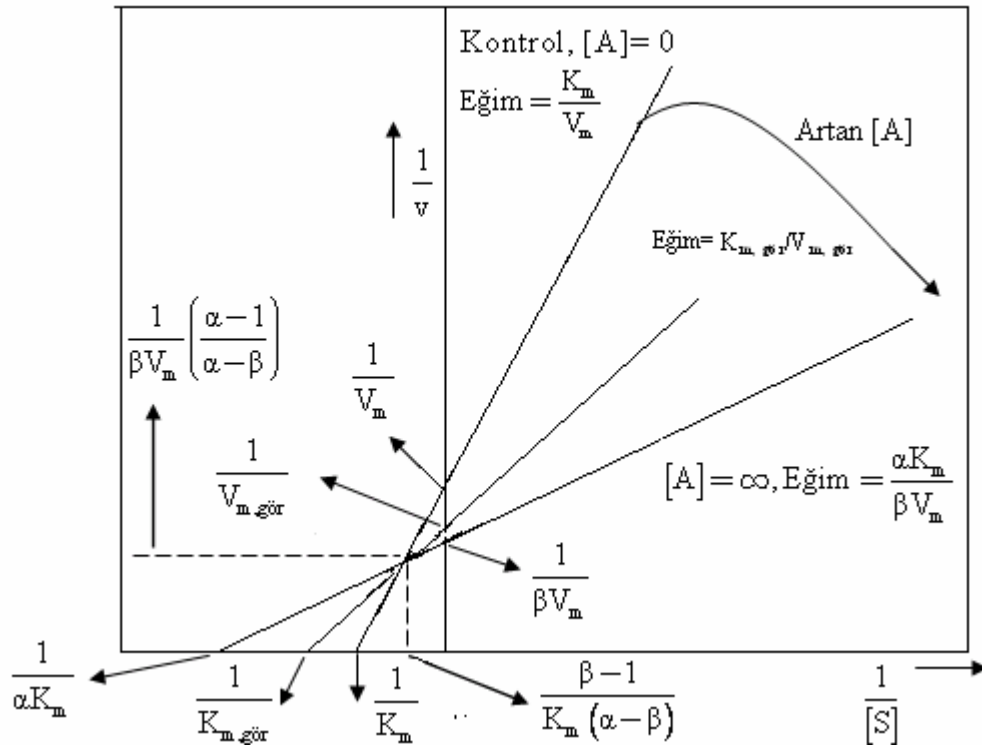
Şekil 2.25: Zorunlu olmayan aktivatör durumunda v 'ye karşı $[S]$ diyagramı

Zorunlu olmayan aktivatörle aktivasyon gerçekleştirilmesi durumunda K_m değeri artabilir ya da azalabilir. K_m değerinin artması enzimin substrata afinitesinin azaldığını gösterir. Ancak her iki durumda da V_m artar ki bu durum aktivasyon durumunda gerçekleşir. Sonsuz yüksek aktivatör konsantrasyonunda çalışıldığında $K_{m,gör} = \alpha K_m$, $V_{m,gör} = \beta V_m$ haline indirgenir. (2.34) no'lu formülü v 'ye karşı $[S]$ gelecek şekilde işaretlendiğinde şekil 2.25'te gösterilen grafik elde edilir.

(2.34) no'lu formülün Lineweaver–Burk diyagramı çizilmek üzere resiprokali alındığında (2.37) no'lu denklem elde edilir.

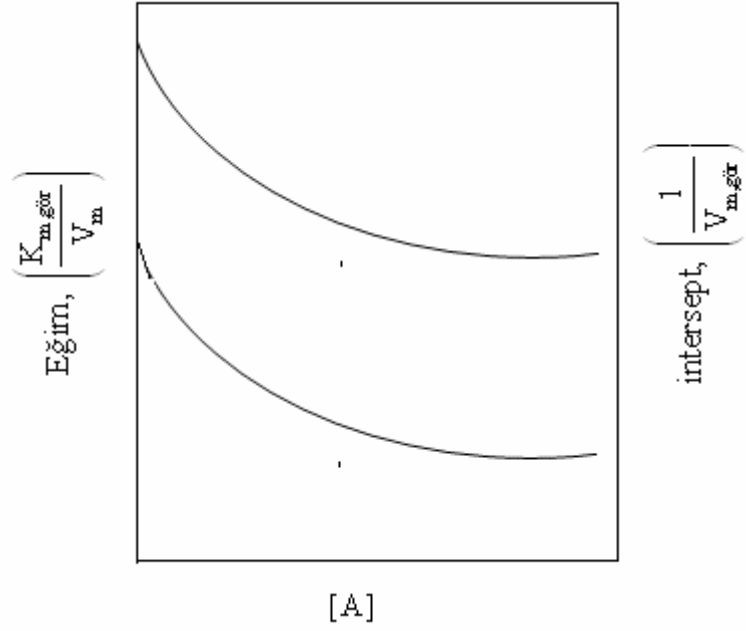
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{[A]}{K_A} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{[A]}{K_A} \right) \quad (2.37)$$

(2.37) no'lu eşitlik kullanılarak Lineweaver-Burk diyagramı şekil 2.26'da görüldüğü gibi elde edilir.



Şekil 2. 26: Zorunlu olmayan aktivasyon için Lineweaver–Burk diyagramı

Zorunlu olmayan aktivasyonda ikincil çizimler görünen eğimin ve görünen interseptin aktivatör konsantrasyonuna karşı işaretlenmesi ile elde edilir ve şekil 2.27'de görülen grafik oluşur.

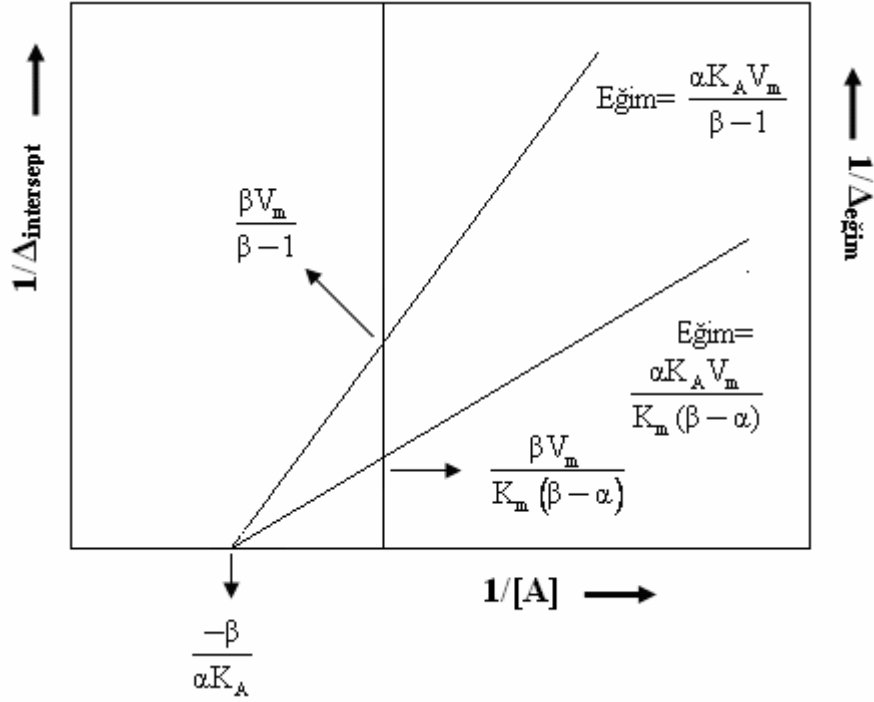


Şekil 2. 27: Zorunlu olmayan aktivasyon için ikincil çizim

İkincil çizimlerden doğrusal bir bağıntı elde edilemediğinden üçüncül çizimlere gidilir. Üçüncül çizimler $\frac{1}{\Delta_{\text{eğim}}}$ 'e karşı $\frac{1}{[A]}$ ve $\frac{1}{\Delta_{\text{intersept}}}$ 'e karşı $\frac{1}{[A]}$ işaretlenerek elde edilir. $\Delta_{\text{eğim}}$ ve $\Delta_{\text{intersept}}$ kontrol varlığındaki eğim ve interseptin aktivatör varlığındaki eğim ve interseptinden farkı alınarak elde edilir ve (2.38) ve (2.39) no'lu doğru denklemler türetilir

$$\frac{1}{\Delta_{\text{eğim}}} = \frac{V_m \cdot \alpha K_A}{K_m (\beta - \alpha)} \cdot \frac{1}{[A]} + \frac{\beta V_m}{K_m (\beta - \alpha)} \quad (2.38)$$

$$\frac{1}{\Delta_{\text{intersept}}} = \frac{\alpha K_A \cdot V_m}{\beta - 1} \cdot \frac{1}{[A]} + \frac{\beta V_m}{\beta - 1} \quad (2.39)$$



Şekil 2. 28: Zorunlu olmayan aktivasyon için üçüncül çizim

Şekil 2.28'den elde edilen doğruların interseptinden, eğimlerinden ve $\frac{1}{[A]}$ eksenini kestiği noktadan zorunlu olmayan aktivatör varlığında α , β ve K_A değerleri hesaplanır.

2.4.3 Organik çözücüler varlığında alkalin proteaz ile kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametreler

Termodinamik parametreler aşağıda ifade edilen formül ve parametrelerden yararlanılarak hesaplanılmıştır.

$$\Delta G^\# = -RT \ln \left(\frac{k_{cat} \cdot h}{k_B \cdot T} \right) \quad (\text{kJ/mol}) \quad (2.40)$$

$\Delta G^\#$: Kazein hidrolizine ilişkin aktivasyon serbest enerjisi,

$$\Delta G_{E-T}^{\#} = -RT \ln \frac{k_{cat}}{K_m} \quad (\text{kJ/mol}) \quad (2.41)$$

$\Delta G_{E-T}^{\#}$: Tranzisyon (geçiş) hali bağlanma serbest enerjisi,

$$\Delta G_{E-S} = -RT \ln K_m^{-1} \quad (\text{kJ/mol}) \quad (2.42)$$

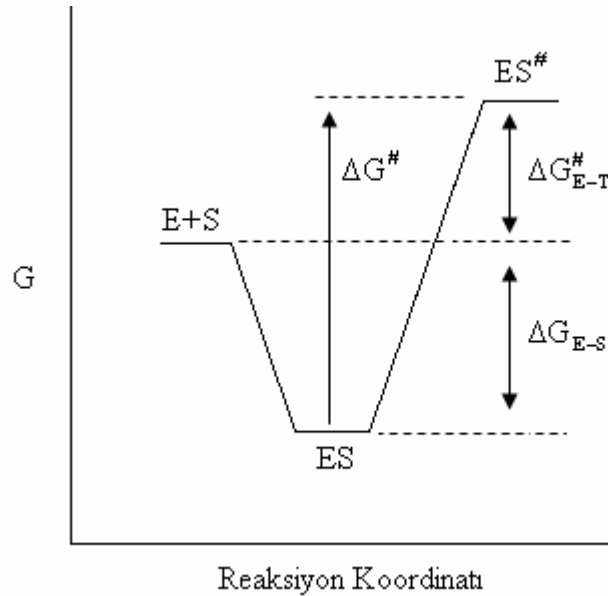
ΔG_{E-S} : Substrat bağlanma serbest enerjisi.

k_B : Boltzman sabiti ($1.38 \cdot 10^{-23}$) (J. K⁻¹),

h : Planck sabiti ($6.63 \cdot 10^{-34}$) (J. s),

R : Gaz sabiti (8.314 J. K⁻¹. mol⁻¹).

B. clausii soyundan saflaştırılan serin alkalen proteaz ile katalizlenen kazein hidrolizi reaksiyonunun termodinamik parametrelerini içeren serbest enerji düzey diyagramı şekil 2.29'da gösterilmiştir.



Şekil 2. 29: Alkalin proteaz ile kazein hidrolizi reaksiyonunda serbest enerji düzey diyagramı

2.4.4 Alkalen proteazın katalitik gücünü etkileyen parametrelerin organik çözücü konsantrasyonu ile ilişkilerinin hesabı

2.4.4.1 Organik çözücülerin çalışıldığı konsantrasyonlardaki log p değerlerinin hesabı

Organik çözücülerin çalışılan konsantrasyonlardaki log P değerleri aşağıda belirtilen formüller yardımı ile hesaplanmıştır [70, 73, 87].

$$\text{Log } P = (1-X) \log P_{\text{çözücü}} + X \log P_{\text{su}} \quad (2.43)$$

X; mol fraksiyonunu ifade etmektedir. Mol fraksiyonu;

$$X_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{n_{\text{H}_2\text{O}}}{n_{\text{H}_2\text{O}} + n_{\text{organik çözücü}}}$$

ve

$$X_{\text{organik çözücü}} = 1 - X_{\text{H}_2\text{O}}$$

olarak hesaplanmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan organik çözücülerin literatürdeki log P değerleri sırasıyla metanol için -0.764, etanol için -0.235, n-propanol için 0.250, i-propanol için 0.05, 1,4-dioksan için -1.100, N,N'-DMF için -1.000, asetonitril için -0.330 ve DMSO için -1.300 olarak bildirilmiştir [70,87].

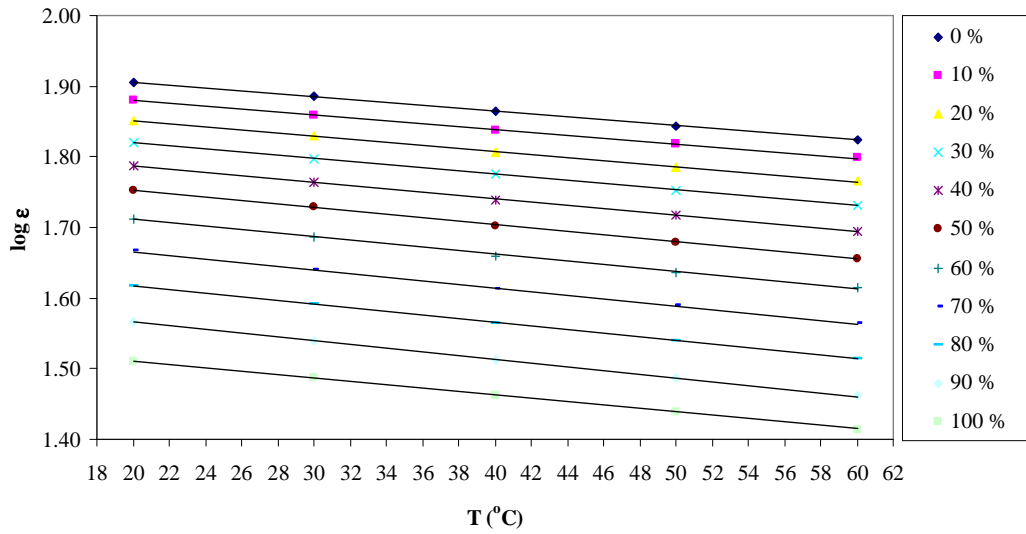
2.4.4.2 Organik çözücülerin çalışıldığı konsantrasyonlardaki dielektrik sabitlerinin hesabı

Organik çözücülerin çalışılan konsantrasyonlardaki dielektrik sabitlerini hesaplamak üzere; grafik çizme yöntemi ve formül ile hesap yöntemleri kullanılmıştır. Organik çözücülerin farklı konsantrasyonları için

$$\log \varepsilon = a-bT \quad (2.44)$$

bağıntısı tanımlanmıştır. 2.44 no'lu bağıntıda; T, °C cinsinden sıcaklığı a ve b Akerlöf sabitlerini, ε dielektrik sabitini ifade etmektedir. % 80 metanol için a ve b sabitleri sırasıyla 1.695 ve 2.50×10^{-3} olarak bulunmuştur [88]. Metanolün farklı konsantrasyonlardaki ve sıcaklıklardaki dielektrik sabitleri; $\log \varepsilon$ 'ye karşı T (°C) gelecek şekilde işaretlendiğinde (Şekil 2.30) % 80 metanol için a ve b sabitleri sırasıyla 1.668 ve 2.60×10^{-3} olarak bulunmuştur ki bu değerler yukarıda tanımlanan değerlere oldukça yakındır (Tablo 2.6) [89]. Aynı grafik ve tablolar etanol, 1-propanol ve i-propanol için de oluşturulmuş ve bu çözücülerin farklı konsantrasyonlarındaki dielektrik sabitleri çizilen grafik ve oluşturulan tablolar yardımı (şekil 2.30, 2.31, 2.32, 2.33 ve tablo 2.6, 2.7, 2.8 ve 2.9) ile hesaplanmıştır.

log ε -T Grafiği

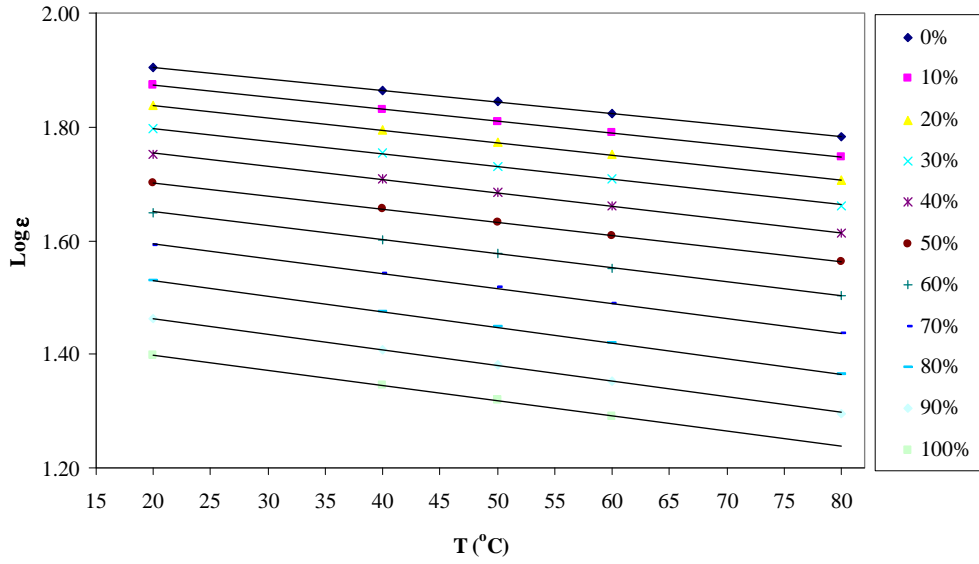


Şekil 2. 30: Metanolün değişen konsantrasyonları için log ε -T grafiği

Tablo 2. 6: Şekil 2.30'dan elde edilen doğru denklemleri

Metanol, (%)	Doğru denklemi	Metanol, (%)	Doğru denklemi
0	$y=-0.002x+1.946$	60	$y=0.0024x+1.760$
10	$y=-0.0021x+1.921$	70	$y=-0.0026x+1.717$
20	$y=-0.0022x+1.894$	80	$y=-0.0026x+1.668$
30	$y=-0.0022x+1.863$	90	$y=-0.0026x+1.618$
40	$y=-0.0023x+1.833$	100	$y=-0.0024x+1.558$
50	$y=-0.0024x+1.800$		

Log ϵ -T Grafiği

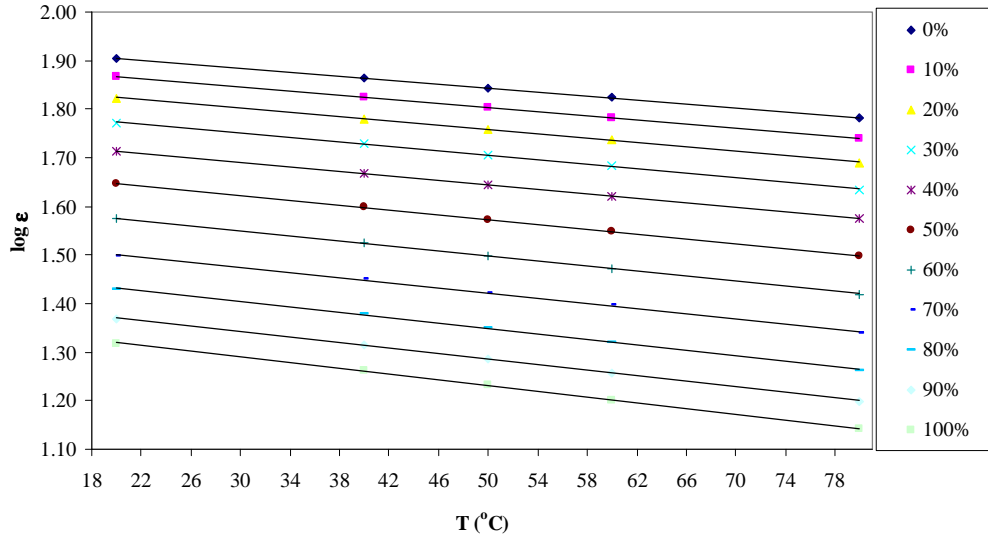


Şekil 2. 31: Etanolün değişen konsantrasyonları için log ϵ -T grafiği

Tablo 2. 7: Şekil 2.31'den elde edilen doğru denklemleri

Etanol, (%)	Doğru denklemi	Etanol, (%)	Doğru denklemi
0	$y=-0.002x+1.946$	60	$Y=0.0025x+1.700$
10	$y=-0.0021x+1.916$	70	$Y=-0.0026x+1.646$
20	$y=-0.0022x+1.881$	80	$Y=-0.0027x+1.585$
30	$y=-0.0023x+1.843$	90	$Y=-0.0028x+1.519$
40	$y=-0.0023x+1.800$	100	$Y=-0.0027x+1.452$
50	$y=-0.0023x+1.1749$		

Log ϵ -T Grafiği

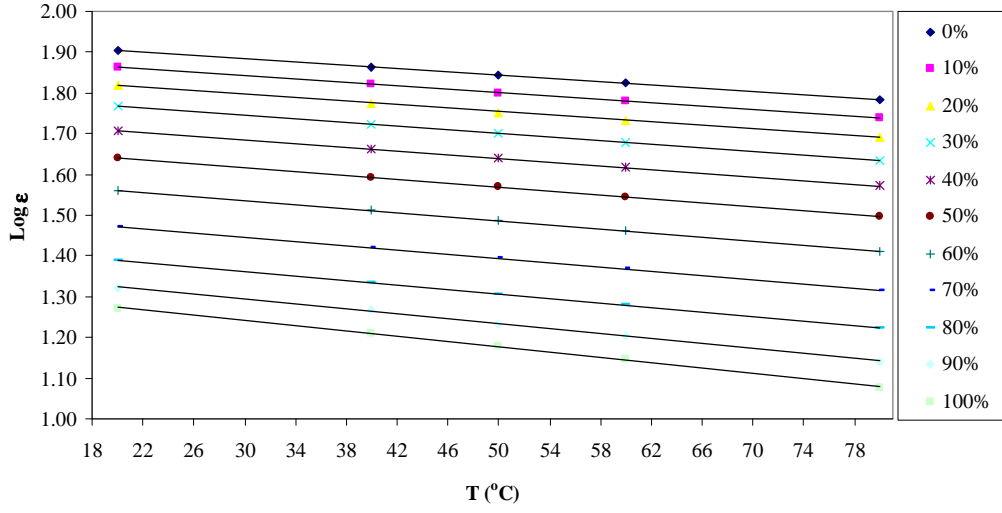


Şekil 2. 32: n-propanolün değişen konsantrasyonları için log ϵ -T grafiği

Tablo 2. 8 Şekil 2.32'den elde edilen doğru denklemleri

n-propanol, (%)	Doğru denklemi	n-propanol, (%)	Doğru denklemi
0	$y=-0.002x+1.946$	60	$Y=0.0026x+1.628$
10	$y=-0.0021x+1.910$	70	$y=-0.0027x+1.555$
20	$y=-0.0022x+1.868$	80	$y=-0.0028x+1.487$
30	$y=-0.0023x+1.820$	90	$y=-0.0028x+1.427$
40	$y=-0.0023x+1.760$	100	$y=-0.0029x+1.379$
50	$y=-0.0025x+1.1697$		

Log ε–T Grafiği



Şekil 2. 33: i-propanolün değişen konsantrasyonları için log ε–T grafiği

Tablo 2. 9: Şekil 2.33’den elde edilen doğru denklemleri

i-propanol, (%)	Doğru denklemi	i-propanol, (%)	Doğru denklemi
0	$y=-0.002x+1.946$	60	$y=0.0025x+1.611$
10	$y=-0.0021x+1.905$	70	$Y=-0.0026x+1.523$
20	$y=-0.0021x+1.860$	80	$Y=-0.0028x+1.444$
30	$y=-0.0022x+1.810$	90	$Y=-0.0030x+1.384$
40	$y=-0.0023x+1.753$	100	$Y=-0.0032x+1.338$
50	$y=-0.0024x+1.1687$		

Elde edilen doğru denklemlerinde x değeri yerine çalışılan sıcaklıklar yazıldığında o sıcaklık ve konsantrasyon değerleri için dielektrik sabiti hesaplanabilmektedir. Aynı grafik ve tablo çalışılan organik çözücüler için de çizilip; çalışılan konsantrasyon ve sıcaklık için dielektrik sabitleri hesaplanabilmektedir.

Diğer çözücülerin (dimetilsülfoksit, N,N-dimetilformamid, 1,4-dioksan, asetonitril) 25-50 °C arası sıcaklıklarda dielektrik sabitlerinin hesaplanmasında (2.45) ve (2.46) eşitlikleri de kullanılmıştır.

$$\varepsilon_t = \varepsilon_t - a(t' - t) \quad (2.45)$$

$$\log_{10} \varepsilon_t = \log_{10} \varepsilon_{t'} - \alpha(t' - t) \quad (2.46)$$

Eşitliklerdeki a ve α parametreleri organik çözücülere ait spesifik parametreleri, t ise °C cinsinden sıcaklığı ifade etmektedir [90].

Su-organik çözücü karışımlarının konsantrasyona bağlı olarak ortalama dielektrik sabitlerinin belirlenmesinde (2.49) no'lu bağıntı kullanılmıştır.

$$\langle \varepsilon \rangle = \frac{(C_1 \cdot \varepsilon_1 + C_2 \cdot \varepsilon_2)}{100} \quad (2.47)$$

C_1 ve C_2 su ve organik çözücünün bağıl konsantrasyonunu ifade etmektedir ($C_1 + C_2 = 100\%$) [91].

2.4.4.3 Organik çözücülerin solvatokromik parametrelerinin çalışılan çözücü konsantrasyonu ile ilişkilerinin hesabı

Saf organik çözücülerin α , β ve π^* solvatokromik parametreleri Kamlet, M.J., ve ark. [77], E_T^N parametreleri ise Reichardt [76] tarafından yapılan çalışmalardan alınmış ve (2.48, 2.49, 2.50 ve 2.51) no'lu denklemde ifade edilen formülde yararlanılarak çalışılan çözücü konsantrasyonu ile ilişkili solvatokromik parametreler hesaplanmıştır. f_1 ve f_2 parametreleri hacim mol ya da kütle fraksiyonlarını ifade edebilmektedir. Bizim çalışmamızda bu parametreler hacim fraksiyonu olarak hesaplanmıştır [79].

$$\begin{aligned} [E_T^N]_{\%x} = & [E_T^N]_{\%100} f_1 + [E_T^N]_{su} f_2 - 0.272 f_1 f_2 - 0.135 f_1 f_2 (f_2 - f_1) + 0.340 f_1 f_2 (f_2 - f_1)^2 + \\ & 0.245 f_1 f_2 (f_2 - f_1)^3 \end{aligned} \quad (2.48)$$

$$\begin{aligned} [\alpha]_{\%x} = & [\alpha]_{\%100} f_1 + [\alpha]_{su} f_2 - 0.964 f_1 f_2 - 0.519 f_1 f_2 (f_2 - f_1) + 0.366 f_1 f_2 (f_2 - f_1)^2 + \\ & 1.229 f_1 f_2 (f_2 - f_1)^3 \end{aligned} \quad (2.49)$$

$$[\beta]_{\%x} = [\beta]_{\%100} f_1 + [\beta]_{su} f_2 + 0.156 f_1 f_2 - 0.181 f_1 f_2 (f_2 - f_1) \quad (2.50)$$

$$[\pi^*]_{\%x} = [\pi^*]_{\%100}f_1 + [\pi^*]_{su}f_2 + 0.537f_1f_2 + 0.317f_1f_2(f_2 - f_1) + 0.380f_1f_2(f_2 - f_1)^2 - 0.876f_1f_2(f_2 - f_1)^3 \quad (2.51)$$

(2.48), (2.49), (2.50) ve (2.51) no'lu denklemlerdeki

$[E_T^N]_{\%x}$: Herhangi bir çözücü % 'sindeki E_T^N değerini,

$[E_T^N]_{\%100}$: Saf çözücünün (%100) E_T^N değerini,

$[\alpha]_{\%x}$: Herhangi bir çözücü % 'sindeki α değerini,

$[\alpha]_{\%100}$: Saf çözücünün (%100) α değerini,

$[\beta]_{\%x}$: Herhangi bir çözücü % 'sindeki β değerini,

$[\beta]_{\%100}$: Saf çözücünün (%100) α değerini ifade etmektedir.

2.4.5 Standart sapma hesabı

Ortalama veya aritmetik ortalama (\bar{x}), tekrarlanan ölçümlerin toplamının gruptaki ölçüm sayısına bölünmesi ile elde edilen büyüklük için kullanılan eş anlamlı ifadelerdir.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N} \quad (2.52)$$

x_i , tekrarlanan N tane ölçümden oluşan popülasyondaki her bir x değerini gösterir [92].

Standart sapma (standard deviation, SD): Bir çalışma grubundaki her bir verinin ortalamaya göre ne kadar uzaklıkta olduğunu, bir diğer deyişle dağılımın ne yaygınlıkta olduğunu gösteren bir ölçüdür. Standart sapma, popülasyonu oluşturan bireyler arasındaki farklılığın bir ölçüsüdür ve (2.52) no'lu eşitlik ile ifade edilmektedir.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^N x_i\right)^2}{N}}{N-1}} \quad (2.53)$$

Ortalamanın standart hatası (standard error of mean, SEM): Aynı popülasyondan seçilecek, aynı büyüklükteki örneklerin ortalamalarının yayılmasını gösteren ölçüdür. Standart sapma değerinin denek sayısının kareköküne bölünmesi ile elde edilen değerdir. (2.54) no'lu eşitlik ile ifade edilir [92,93].

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{N}} \quad (2.54)$$

Tez çalışmamızda su ile karışabilen organik çözücüler olan metanol, etanol, n-propanol, i-propanol, 1,4-dioksan, N,N-dimetilformamid, dimetilsülfoksit ve asetonitrilin artan konsantrasyonlarının *Bacillus clausii* GMBAE 42 serin alkalen proteaz enziminin kinetik ve termodinamik parametreleri üzerine etkileri incelenmiş ve tüm parametreler için standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Kullanılan organik çözücülerin fizikokimyasal parametreleri olan log P değerleri ve dielektrik sabitlerinin (ϵ) çalışılan konsantrasyonlardaki değerleri hesaplanmış ve çalışılan konsantrasyonlarla ilişkili fizikokimyasal parametreler ile enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri arasındaki ilişkiler incelenmiştir. Ayrıca literatürden yararlanılarak tez çalışmasında kullanılan su ile karışabilen organik çözücülerin solvatokromik parametreleri bulunmuş (α , β , π^* , ve E_T^N), solvatokromik parametrelerin çalışılan konsantrasyonlardaki değerleri hesaplanmış ve çalışılan konsantrasyonlar ile ilişkili solvatokromik parametreler ile enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri arasında ilişkiler çoklu lineer regresyon yöntemi ile belirlenmiştir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Kimyasallar

Deneysel amaçlı kullanılan ve su ile karışabilen çözücüler olan metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, dimetilsülfoksit, dimetilformamid, asetonitril ve 1,4-dioksan ve diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup, Sigma Chemical Ltd. (ABD), Fluka AG (İsviçre), Riedel AG (Almanya) ve Merck AG (Almanya)'dan temin edilmiştir.

3.2 Mikroorganizma

Çalışmada kullanılan mikroorganizma; *Bacillus clausii* GMBAE 42 TÜBİTAK GMBE Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuvarı tarafından doğadan izole edilmiş ve tanımlanmış olup bir hücre dışı serin alkalin proteaz üreticisi bakteridir [12].

3.3 Alkalin Proteaz Enziminin Üretimi ve Saflaştırılması

Hücre dışı alkalin serin proteaz; erlen içerisinde, proteince zengin bir ortamda *Bacillus clausii* GMBAE 42'nin 3 gün boyunca pH 7 ve 37 °C'de üretilmesiyle elde edilmiştir. Enzim; (NH₄)₂SO₄ fraksiyonel çöktürmesini takiben DEAE-selüloz anyon değiştirme kromatografisi ile 16 kat saflaştırılmıştır. SDS-PAGE analizi ile enzimin molekül ağırlığı 26.5 kDa olarak bulunmuştur [9].

3.4 Alkalin Proteaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

3.4.1 Folin-Ciocalteu reaktifi içeren aktivite belirleme yöntemi

Alkalin proteaz aktivitesi belirlenirken 0.5 mL enzim çözeltisi 50 mM NaCl- NaOH-glisin tamponunda hazırlanan %0.6'luk kazein çözeltisinin 2.5 mL'si ile muamele

edilmiş, su banyosunda 30°C’de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak amacı ile; reaksiyon ortamına 2.5 mL trikloroasetik asit çözeltisi (TCA) (0.11 M trikloroasetik asit, 0.22 M sodyum asetat, 0.33 M asetik asit) ilave edildikten sonra su banyosunda 30°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra karışım süzülümüş, süzütüden 0.5 mL alınmış ve bu süzütünün üzerine 0.5 M 2.5 mL sodyum karbonat çözeltisi ilave edilmiş ve karışıma saf su ile ½ oranında seyreltilmiş 0.5 mL Folin-Ciocalteau reaktifi ilave edilerek karışım 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir [92]. Folin reaktifinin ilavesi ile ortam asidik olduğundan; (fosfomolibdat ve tungstat içeriğinden dolayı) sodyum karbonat ilavesi reaksiyon ortamının pH’sının yeniden 10 civarına çekilmesi için gereklidir [93]. 30 dakikalık süre sonunda Biorad Smart Spec 3000 ile örneklerin 660 nm’deki absorbans değerleri okunmuştur. Folin-Ciocalteau reaktifi ile tirozin arasında meydana gelen redoks tepkimesinden oluşan mavi renk şiddetine bağlı olarak okunan absorbanslar ile enzim aktivitesi tirozin standart grafiğinin eğimi de dikkate alınarak (3.1) no’lu formül ile hesaplanmıştır.

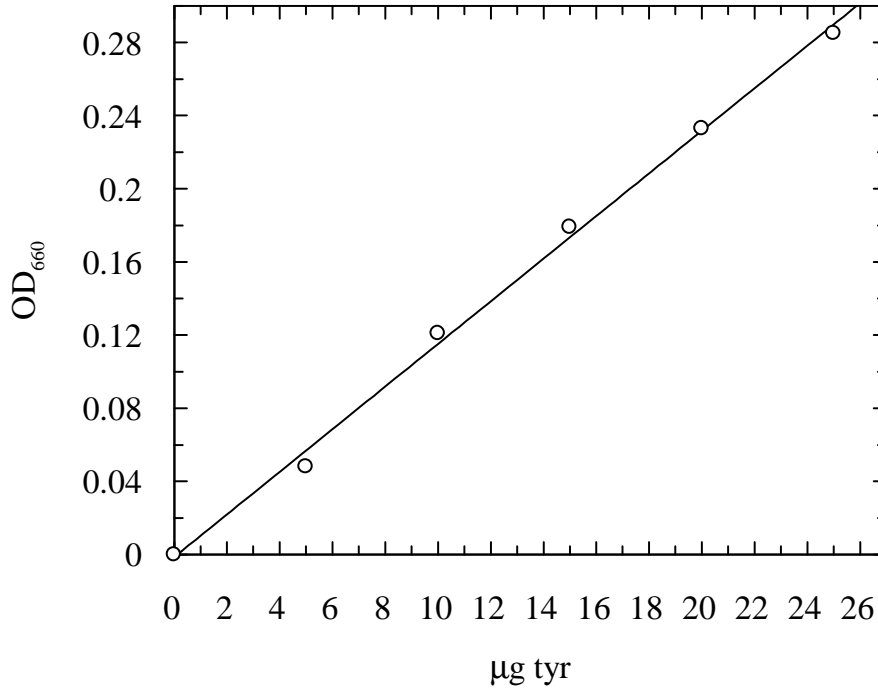
$$\text{Enzim Aktivitesi (U/mL/min)} = \frac{\left(\frac{\text{OD}_{660}}{\text{Eğim}}\right) \times \text{Seyreltme Faktörü} \times \text{Toplam Hacim (mL)}}{\text{Enzim Hacmi (mL)} \times \text{İnkübasyon Süresi (dak)}} \quad (3.1)$$

Bu formül ile hesaplanan alkalen proteaz enzimi için aktivite birimi; 30 °C pH 10.5’de 1 dakikada 1µg tirozin oluşturan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir. Formülde kullanılan eğim tirozin standart grafiğinden elde edilen eğimdir.

3.4.1.1 Folin-Ciocalteau reaktifi içeren aktivite belirleme yöntemi için tirozin standart grafiğinin hazırlanması

Proteaz aktivitesi hesabında kullanılacak standart grafiğin çizilebilmesi için; 50 mM pH 10.5 NaOH-NaCl-glisin tamponunun 100 mL’sinde 50 mg tirozin çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tamponunda 0-25 µg/mL tirozin içerecek şekilde seyreltilmiştir. Farklı konsantrasyondaki tirozin çözeltilerinin her birinden 0.5 mL alınarak 0.5 M, 2.5 mL Na₂CO₃ ve saf su ile ½ oranında seyreltilmiş folin reaktifi ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 30 dakika

bekletildikten sonra Biorad Smart Spec 3000 ile 660 nm'deki absorbands değerleri okunmuştur. Tirozin miktarına karşı okunan absorbandlardan yararlanılarak standart grafik oluşturulmuştur. Doğrusal elde edilen grafiğin eğiminden faydalanılarak alkalen proteaz enziminin aktivitesi hesaplanmıştır.



Şekil 3. 1:Tirozinin Folin reaktifi varlığındaki standart grafiği (r= 0.9986).

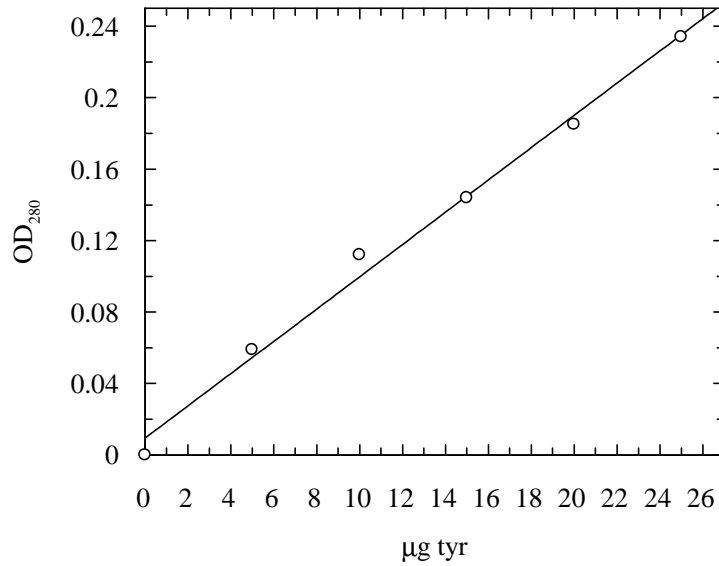
3.4.2. Folin Ciocalteau reaktifi içermeyen aktivite belirleme yöntemi

Alkalen proteaz aktivitesi belirlenirken 0.5 mL enzim 50 mM NaCL-NaOH-glisin tamponunda hazırlanan %0.6'lık kazein çözeltisinin 2.5 mL'si ile muamele edilmiş, su banyosunda 30°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak amacıyla; reaksiyon ortamına 2.5 mL trikloroasetik asit çözeltisi (TCA) (0.11 M trikloroasetik asit, 0.22 M sodyum asetat, 0.33 M asetik asit) ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda karışım süzölmüş ve süzöntünün Biorad Smart Spec 3000 ile 280 nm'deki absorbandsı okunmuştur. (3.2) no'lu eşitlikten yararlanılarak aktivite hesaplanmıştır [94,95].

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/mL/min)} = \frac{\frac{\text{OD}_{280} \times \text{Seyrelme Faktörü} \times \text{Toplam Hacim (mL)}}{\text{Eğim}}}{\text{Enzim Hacmi (mL)} \times \text{inkübasyon Süresi (dak)}} \quad (3.2)$$

3.4.2.1 Folin Ciocalteau reaktifi içermeyen aktivite belirleme yöntemi için tirozin standart grafiğinin hazırlanması

Ciocalteau Reaktifi içermeyen aktivite belirleme yöntemi ile proteaz aktivitesi hesabında kullanılacak standart grafiğın çizilebilmesi için; 50 mM pH 10.5 NaOH-NaCl-glisin tamponunun 100 mL'sinde 50 mg tirozin çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tamponunda 0, 5, 10, 15, 20, 25 µg/mL tirozin içerecek şekilde seyreltilmiştir. Hazırlanan örneklerin Biorad Smart Spec 3000 ile 280 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür. Tirozin miktarına karşı okunan absorbans değerlerinin grafiğinden elde edilen eğimden yararlanılarak aktivite hesaplanmıştır.



Şekil 3. 2:Tirozinin Folin reaktifi yokluğundaki standart grafiği (r= 0.9960).

3.5 Alkalen Proteaz Örneklerinde Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Enzim örneklerindeki protein miktarı (BSA) sığır serum albuminin standart protein olarak kullanıldığı Coomassie Blue G-250 boyası bağlama yöntemi kullanılmıştır [96,97].

3.5.1 Coomassie Blue G-250 boyası bağlama yöntemi ile protein miktarının belirlenmesi

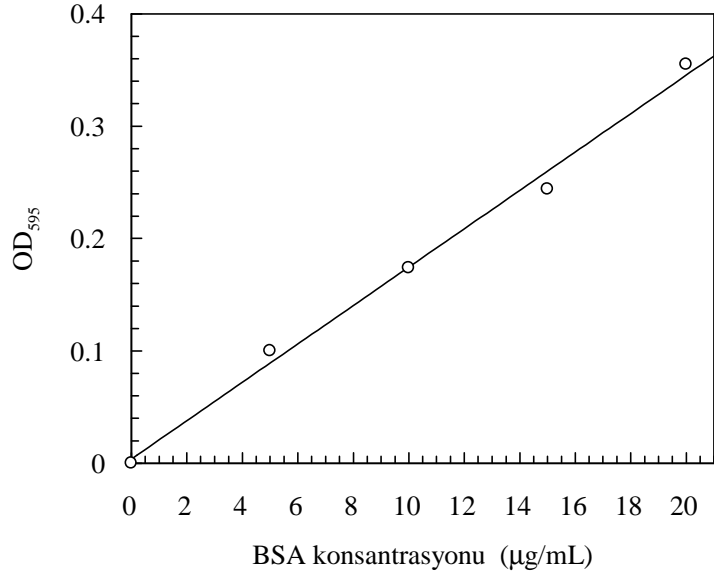
Bu yöntemde 1 mL enzim örneğinin üzerine 1 mL Coomassie Blue G-250 boyası çözeltisi ilave edilmiştir. Kör deneme için saf su kullanılmıştır. Biorad Smart Spec 3000 ile 595 nm'deki absorbans değerleri okunmuştur. Protein miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Protein Miktarı (mg / mL)} = \frac{\text{OD}_{595}}{\text{Eğim}} \times \text{Seyreltme Faktörü} \quad (3.3)$$

3.5.1.1 Coomassie Blue G-250 boyası bağlama yöntemi ile protein standart grafiğinin oluşturulması

600 mg Coomassie Blue G-250 Boyası 1L % 2'lik perklorik asit içinde çözülmüştür. Çözünmeyen taneciklerin giderilmesi için hazırlanan çözelti kaba süzgeç kağıdı ile süzlmüştür. Hazırlanan boya çözeltisi uzun süre için stabildir.

1 mg/mL içerecek şekilde saf su ile 10 mL BSA çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözültiden 1 mL alıp üzerine 9 mL su ilavesi ile 10 kat seyreltilmiştir. 2 mL'lik toplam çözelti içinde hazır; 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mL seyreltilmiş BSA çözeltisi olacak şekilde hazırlanan çözültelerin üzerine hazırlanan boya çözeltisinden 2 ml ilave edilmiştir. Hazırlanan örneklerin (Biorad Smart Spec 3000) OD₅₉₅'deki absorbanslarına karşı µg/mL BSA işaretlenerek elde edilen doğrunun eğiminden yararlanılarak protein miktarı tayin edilmiştir.



Şekil 3. 3: Coomassie Blue 250 bağlama yöntemi ile protein belirlenmesinde kullanılan protein standart grafiği

3.6 Su ile Karışabilen Organik Çözücülerin Alkale Proteaz Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

3.6.1 Organik çözücülerin optimal pH üzerine etkileri

Bacillus clausii GMBAE 42 alkale proteazı pH 10.5 ve 30°C’ da aktivite kaybı olmadan 2 saat stabil kalabildiği için çalışma pH’sı 10.5 ve inkübasyon sıcaklığı da 30 °C seçilmiştir [9]. Çözücülerin; NaOH-glisin tampon çözeltisi ile pH 10.5’e ayarlı tampon çözeltinin çalışma pH’sını ne kadar değiştirdiği belirlenmiştir. Her bir çözücüden farklı yüzdelerde hazırlanmış ve pH değişimleri kontrol edilmiştir.

3.6.2 Enzimin inhibisyona uğradığı organik çözücü yüzdesinin belirlenmesi

3.6.2.1 Folin-Ciocalteu reaktifi içeren yöntem ile enzimin inhibisyona uğradığı organik çözücü yüzdesinin belirlenmesi

Bacillus clausii GMBAE 42 ‘den izole edilen alkale proteaz enzimi üzerinde yapılan kinetik çalışmanın bu adımı iki aşamada gerçekleştirilmiştir.

Birinci aşamada; enzim 120 dakika süre ile artan organik çözücü ortamında inkübe edilmiş, inkübasyon sonrasında organik çözücü içeren substrat ile muamele edilmiş ve kalan aktivite değeri belirlenmiştir. İkinci aşamada; enzim 120 dakika süre ile artan organik çözücü ortamında inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda organik çözücü yüzdesinin enzim üzerindeki etkisini en aza indirmek amacı ile organik çözücü içermeyen substrat çözeltisi ile muamele edilerek 6 kat seyreltme yapılmıştır. Bu aşamanın sonunda da enzimin inaktivasyona uğramadan kalan aktivite değeri belirlenmiştir.

Metanol, etanol, n-propanol ve i-propanol için; birinci aşamada 50 µL enzim çözeltisine 450 µL artan konsantrasyonlarda organik çözücü içeren tampon eklenmiş, reaksiyon karışımı su banyosunda 30°C'de 120 dakika süre ile ön inkübasyona uğratılmıştır. İnkübasyon sonunda su banyosundan alınan reaksiyon karışımına reaksiyon ortamlarında bulunan oranlarda organik çözücü içeren % 0.6'lık kazein çözeltisi ilave edilmiştir. Substrat olarak kazein içeren reaksiyon karışımları 30°C'de 20 dakika süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyonu durdurmak amacı ile 2.5 mL TCA (0.11 M trikloroasetik asit, 0.22 M sodyum asetat, 0.33 M asetik asit) ilavesi yapılmış, reaksiyona girmeyen kazein proteinlerinin çökmesi sağlanmıştır. Oluşan yeni reaksiyon karışımı 30 °C'de 30 dakika süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra reaksiyon karışımı süzölmüş, süzöntüden 0.5 mL alınmış ve bu süzöntünün üzerine 0.5 M 2.5 mL sodyum karbonat çözeltisi ilave edilmiştir. Karışıma saf su ile ½ oranında seyreltilmiş 0.5 mL Folin-Ciocalteau reaktifi ilave edilerek karışım 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda (Biorad Smart Spec 3000) 660 nm'de okunan absorbanlardan kalan aktivite değerleri belirlenmiştir.

İkinci aşamada gerçekleştirilen adımlar 120 dakika ön inkübasyona kadar aynı olmakla birlikte; bu aşamada; ön inkübasyon sonunda organik çözücülerin enzim üzerindeki etkilerini en aza indirmek amacı ile % 0.6'lık kazein çözeltisi organik çözücü içermeyen 50 mM pH 10.5 NaOH-NaCl-glisin tamponunda hazırlanmıştır. Bu çözeltiden reaksiyon ortamına 2.5 mL ilave edilerek organik çözücü konsantrasyonunun 6 kat seyreltilmesi sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra uygulanan aktivite yöntemi birinci aşamadaki ile aynıdır. İnkübasyon süreleri sonunda 660

nm’de okunan absorbanlardan yararlanılarak kalan aktivite değerleri belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan enzimin protein konsantrasyonu ve spesifik aktivitesi metanol varlığında sırasıyla; 0,417 mg/ml ve 2509,01 U/mg, etanol varlığında sırasıyla; 0,417 mg/ml ve 2509,01 U/mg; n-propanol ve i-propanol varlığında; 0,0251 mg/ml ve 1733 U/mg’dir.

İki aşamadan sonra kalan aktiviteye karşı organik çözücü yüzdesi grafiği çizilmiş ve seyreltme yapılmış ve yapılmamış durumlardaki aktivite değerleri karşılaştırılarak hangi çözücü yüzdesinin inhibisyona sebep olduğu belirlenmiştir.

3.6.2.2 Folin-Ciocalteau reaktifi içermeyen yöntem ile enzimin inhibisyona ve aktivasyona uğradığı organik çözücü yüzdesinin belirlenmesi

1,4-dioksan, N,N-DMF, asetonitril ve DMSO ile çalışılan bu kısımda; birinci aşamada; 50 µL enzim çözeltisi üzerine artan organik çözücü konsantrasyonlarında 450 µL özücü içeren tampon ilavesi yapılmış ve karışım su banyosunda 30 °C’de 120 dakika süre ile ön inkübasyona uğratılmıştır. Ön inkübasyon sonunda su banyosundan alınan reaksiyon karışımına reaksiyon ortamlarında bulunan oranlarda organik çözücü içeren % 0.6’lık kazein çözeltisi ilave edilmiştir. Substrat olarak kazein içeren reaksiyon karışımları 30 °C’de 20 dakika süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyonu durdurmak amacı ile 2.5 mL TCA (0.11 M trikloroasetik asit, 0.22 M sodyum asetat, 0.33 M asetik asit) ilavesi yapılmıştır. Oluşan yeni reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 30 dakika süre bekletilmiştir. Süre sonunda süzüntülerin (Biorad Smart Spec 3000) 280 nm’deki absorbanları okunmuştur. (3.2) eşitliğine göre kalan aktivite hesaplanmıştır.

İkinci aşamada uygulanan adımlar birinci aşamadaki adımların aynısıdır. Ancak organik çözücülerin enzim üzerindeki etkilerini en aza indirmek için kazein çözeltisi organik çözücü içermeyen 50 mM pH 10.5 NaOH-NaCl-glisin tamponunda hazırlanmıştır. Örneklerin absorbanı 280 nm’de okunarak kalan aktivite hesaplanmıştır. N,N-DMF, 1,4-Dioksan, DMSO varlığında kullanılan enzimin protein konsantrasyonu ve spesifik aktivite değerleri sırasıyla; 0.154 mg/mL ve 4851

U/mg, asetonitril varlığında kullanılan enzimin protein ve spesifik aktivite değerleri sırasıyla; 0.122 mg/mL ve 4464 U/mg'dir.

İki aşamadan sonra kalan aktiviteye karşı organik çözücü yüzdesi grafiği çizilmiş ve seyreltme yapılmış ve yapılmamış durumlardaki aktivite değerleri karşılaştırılarak organik çözücü yüzdelерinin enzim aktivasyonu üzerindeki etkilerine bakılmıştır.

3.7 Organik Çözücü Varlığında ve Yokluğunda Alkalen Proteaz Enziminin Kinetik Parametrelerinin (K_m ve V_m Değerleri) Belirlenmesi

3.7.1 Organik çözücü yokluğunda alkalen proteaz enziminin Folin-Ciocalteu reaktifi içeren yöntem ile kinetik parametrelerinin belirlenmesi

Organik çözücü içermeyen ortamda Folin-Ciocalteu reaktifi içeren yöntem ile alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerleri Lineweaver-Burk diyagramları oluşturularak belirlenmiştir. 50 mM pH 10.5 NaOH-NaCl-glisin tamponunda 0.5, 0.6, 0.75, 1.0, 1.1 ve 1.25 mg/mL kazein hazırlanmıştır. Deney tüplerine 50 µL enzim (enzimin protein ve spesifik aktivite değerleri sırasıyla 0.179 mg/mL ve 5928.86 U/mg) ve 450 µL 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tamponu ilave edilmiştir. Hazırlanan reaksiyon ortamı üzerine 2.5 mL hazırlanan kazein çözeltilerinden ilave edilmiştir. Denemede kör olarak hazırlanan deney tüpüne enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tamponu ilave edilmiştir. Her bir konsantrasyon için ayrı kör deneme hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler 30°C'de 5 dakika süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örneklere 2.5 mL TCA (0.11 M trikloroasetik asit, 0.22 M sodyum asetat, 0.33 M asetik asit) ilavesi yapılmış ve 30°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyon karışımı süzölmüş, süzöntüden 0.5 mL alınmış ve bu süzöntünün üzerine 0.5 M 2.5 mL sodyum karbonat çözeltisi ilave edilmiştir. Karışıma saf su ile ½ oranında seyreltilmiş 0.5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilerek karışım 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda Biorad Smart Spec 3000 ile 660 nm'de örneklerin absorbansları okunmuştur. (3.1) no'lu eşitlik ile aktivite hesaplanmıştır.

3.7.2 Organik çözücü yokluğunda Folin-Ciocalteu reaktifi içermeyen yöntem ile alkalen proteazın enziminin kinetik parametrelerinin belirlenmesi

Organik çözücü içermeyen ortamda Folin-Ciocalteu reaktifi içermeyen yöntem ile alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerleri Lineweaver-Burk diyagramları oluşturularak belirlenmiştir. 50 mM pH 10.5 NaOH-NaCl-glisin tamponunda 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5 mg/mL kazein hazırlanmıştır. Deney tüplerine 50 μ L enzim (enzimin protein ve spesifik aktivite değerleri sırasıyla 0.154 mg/mL ve 4851 U/mg) ve 450 μ L 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tamponu ilave edilmiştir. Hazırlanan reaksiyon ortamı üzerine 2.5 mL hazırlanan kazein çözeltilerinden ilave edilmiştir. Denemede kör olarak hazırlanan deney tüpüne enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tamponu ilave edilmiştir. Her bir konsantrasyon için ayrı kör deneme hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler 30°C'de 5 dakika süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örneklere 2.5 mL TCA (0.11 M trikloroasetik asit, 0.22 M sodyum asetat, 0.33 M asetik asit) ilavesi yapılmış ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda reaksiyon karışımı süzölmüş, süzöntülerin absorbansı; Biorad Smart Spec 3000 ile 280 nm'de okunmuştur. (3.2) no'lu eşitlik ile aktivite hesaplanmıştır.

3.7.3 Organik çözücü varlığında Folin-Ciocalteu reaktifi içeren yöntem ile alkalen proteazın enziminin kinetik parametrelerinin belirlenmesi

Organik çözücü varlığında enzimin K_m ve V_m belirlenmesi organik çözücü yokluğunda K_m ve V_m belirlenmesine benzer şekilde yapılmıştır. Çalışılan konsantrasyondaki organik çözücü seyreltmesi 50 mM pH 10.5 NaOH-NaCl-glisin-tamponunda yapılarak, çalışılan organik çözücü konsantrasyonlarını içerecek şekilde 0.5, 0.6, 0.75, 1.0, 1.1 ve 1.25 mg/mL kazein hazırlanmıştır. Deney tüplerine 50 μ L enzim (etanol varlığında enzimin protein ve spesifik aktivite değerleri sırasıyla 0.176 mg/mL ve 5928.86 U/mg, metanol varlığında 0.168 mg/mL ve 2475.25 U/mg, n-propanol ve i-propanol varlığında protein 0.293 mg/mL ve 1710 U/mg olarak belirlenmiştir) ve 450 μ L çalışılan konsantrasyondaki organik çözücü seyreltmesi 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin ile yapılan tampon çözelti ilave edilmiştir. Hazırlanan

reaksiyon ortamı üzerine 2.5 mL hazırlanan kazein çözeltilerinden ilave edilmiştir. Denemede kör olarak hazırlanan deney tüpüne enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tamponu ilave edilmiştir. Her bir konsantrasyon için ayrı kör deneme hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler su banyosunda 30°C'de 5 dakika süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örneklere 2.5 mL TCA (0.11 M trikloroasetik asit, 0.22 M sodyum asetat, 0.33 M asetik asit) ilavesi yapılmış ve 30°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyon karışımı süzölmüş, süzöntüden 0.5 mL alınmış ve bu süzöntünün üzerine 0.5 M 2.5 mL sodyum karbonat çözeltisi ilave edilmiştir. Karışıma saf su ile ½ oranında seyreltilmiş 0.5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilerek karışım 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda Biorad Smart Spec 3000 ile 660 nm'de örneklerin absorbansları okunmuş, (3.1) eşitliği ile aktivite hesabı yapılmıştır.

3.7.4 Organik çözücü varlığında Folin-Ciocalteu reaktifi içermeyen yöntem ile alkale proteazın enziminin kinetik parametrelerinin belirlenmesi

1,4-dioksan, N,N-DMF, ve DMSO varlığında (N,N-Dimetilformamid, 1,4-Dioksan, DMSO (inhibisyon kinetiği için) varlığında enzimin protein konsantrasyonu spesifik aktivite değerleri sırasıyla; 0.154 mg/mL ve 4851 U/mg, asetonitril ve DMSO (aktivasyon kinetiği için); 0.122 mg/mL ve 4464 U/mg olarak belirlenmiştir) K_m ve V_m belirlemesi bölüm 3.4.2.1.'de belirtildiği gibi yapılmıştır. 50 µL enzim çözeltisi üzerine çalışılan konsantrasyonda organik çözücü içeren 450 µL NaOH-glisin tamponuna (pH 10.5, 50 mM) ilave edilmiştir. Hazırlanan reaksiyon ortamı üzerine çalışılan organik çözücü konsantrasyonuna sahip 450 µL NaOH-NaCl-glisin tamponunda (pH 10.5, 50 mM) hazırlanmış 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6 mg/mL'lik kazein çözeltisi ilave edilmiştir. Karışım; su banyosunda 30°C'de 5 dakika süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örneklere 2.5 mL TCA (0.11 M trikloroasetik asit, 0.22 M sodyum asetat, 0.33 M asetik asit) ilavesi yapılmış ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin Biorad Smart Spec 3000 ile 280 nm'deki absorbansları okunmuş, (3.2) eşitliği ile aktivite hesaplanmıştır.

Organik çözücüler varlığında ve yokluğundaki K_m ve V_m değerlerinin belirlenebilmesi için başlangıç hızı resiprokalının substrat konsantrasyonu resiprokal değerine karşı grafiğinin çizilmesi gerekmektedir. Bu amaçla hesaplanan aktivite değerlerinin resiprokal değerlerinin ($1/v$) substrat konsantrasyonunun resiprokal değerlerine ($1/[S]$) karşı çizilen Lineweaver–Burk grafiğinden elde edilen doğruların eğiminden K_m/V_m interseptinden $1/V_m$ bulunarak kinetik parametreler olan K_m ve V_m değerleri hesaplanmış, tersinir inhibisyonların türleri belirlenmiştir.

3.8 Alkalen Proteaz Enziminin Organik Çözücü Varlığında ve Yokluğunda Katalitik Hız Sabiti (Turn-over Sayısı) ve Katalitik Performansının (k_{cat} ve k_{cat}/K_m) Belirlenmesi

Organik çözücü yokluğunda; alkalen proteaz enziminin k_{cat} değeri;

$$V_m = k_{cat} \times [E]_T \quad (3.4)$$

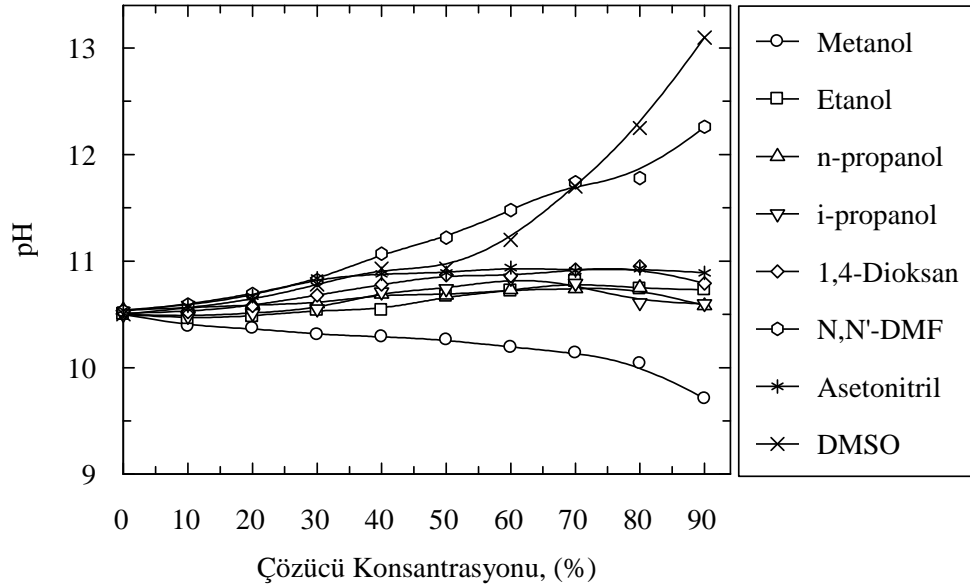
denklemine göre hesaplanmış ve bulunan değerden k_{cat}/K_m oranı hesaplanmıştır. $[E]_T$ reaksiyon ortamındaki toplam enzim konsantrasyonudur. Organik çözücü varlığında elde edilen V_m değerlerinden yararlanılarak organik çözücü varlığında turn–over katsayısı ve enzimin katalitik performansı (3.4) no'lu eşitlikten yararlanılarak hesaplanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 BULGULAR

4.1.1 Organik çözücülerin optimal pH üzerine etkileri

8 farklı organik çözücünün farklı yüzdelерinin çalışma pH'sı olan 10.5 değerini ne kadar değiştirdiğine bakılmıştır. Bunun için Şekil 4.1 ve 4.8 no'lu Şekiller arasında verilen çözücü konsantrasyonuna karşılık gelen pH değerleri işaretlenmiştir.



Şekil 4. 1: 50 mM NaOH-Glisin tamponu içinde değişik yüzdelerde hazırlanan organik çözücülerin pH profili

Grafiklerden de görüldüğü gibi organik çözücülerden metanol, etanol, n-propanol, i-propanol, 1,4-dioksan ve asetonitrilin artan konsantrasyonlarında çalışma pH'sı olan pH 10.5 değerini çok fazla değişmezken DMSO ve N,N'-DMF'nin artan konsantrasyonlarında pH değerinde gözle görüldüğü değişiklikler kaydedilmiştir. Ancak

N,N'-DMF ile yapılan kinetik incelemelerde en yüksek %15'lik DMSO ile yapılan kinetik incelemelerde ise en fazla %45'lik konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Şekil 4.1'in incelenmesinden bu iki çözücü için yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda ortam pH'sının çalışmayı etkileyecek ölçüde önemli bir değişime uğramadığı görülebilir.

4.1.2 Enzimin inhibisyona uğradığı organik çözücü yüzdesinin belirlenmesi

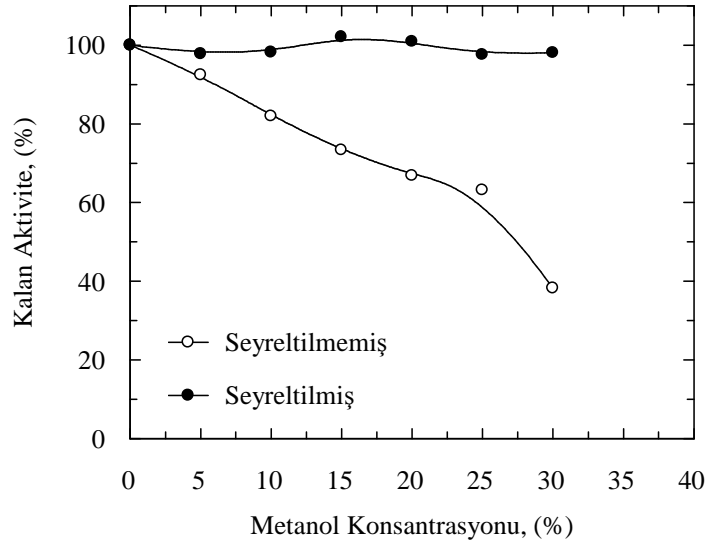
4.1.2.1 Folin-Ciocalteu reaktifi içeren yöntemle:

Organik çözücüler varlığında enzimin konformasyonel yapısında meydana gelen denatürasyon tersinir ya da tersinmez olabilmektedir. Bu değişimi görebilmek için enzim çözeltisi organik çözücülerin değişik konsantrasyonlarında 30°C'de 120 dakika inkübe edildikten sonra çalışılan organik çözücü konsantrasyonunda hazırlanan substrat çözeltisi ilavesinin ardından bölüm 3.4.1 ve 3.4.1.1'de belirtilen aktivite belirleme yöntemi ile kalan aktivite belirlenmiştir. Sonrasında substrat çözeltisinin organik çözücü içermeyen ortamda hazırlanıp, reaksiyon ortamına alınması ile seyreltme yapılarak ikinci aşamanın gerçekleştirilmesi ile kalan aktivite yeniden ölçülmüştür.

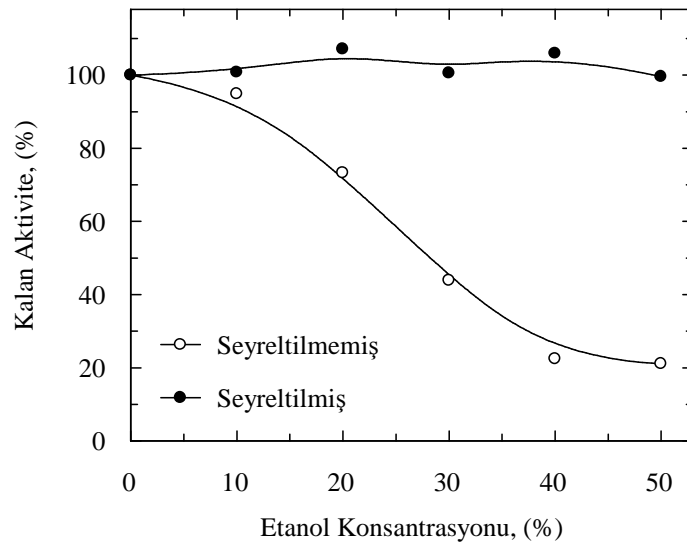
Organik çözücüler varlığında meydana gelen inhibisyonun tersinir olması durumunda; organik çözücü varlığında aktivitede azalma görülürken organik çözücü seyreltilmesi yapıldığında kaybedilen aktivite geri kazanılmaktadır. Ancak inhibisyonun tersinmez olduğu durumda ise organik çözücü varlığında görülen aktivite kaybı organik çözücü seyreltilmesi yapıldıktan sonra bile kaybedilen aktivite geri kazanılamamaktadır.

Alkalen proteaz enzimi de metanol, etanol, n-propanol ve i-propanolün artan konsantrasyonları varlığında 30°C'de 120 dakika ön inkübasyonu sonucunda seyrelme yapıldıktan sonra aktivasyonun geri kazanılmasından dolayı tersinir inhibisyon oluşturduğu gözlenmiştir. Metanol, etanol, n-propanol ve i-propanolün artan konsantrasyonları varlığında kalan aktivite değerleri işaretlendiğinde oluşan

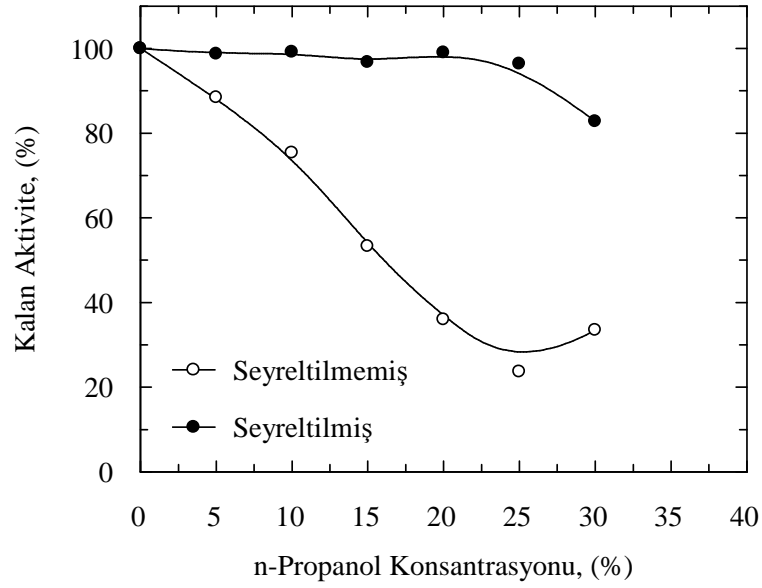
grafikler Şekil 4.2–4.5 arasında gösterilmiştir. Çalışılan konsantrasyonlar substratın çözünebildiği konsantrasyonlar olarak belirlenmiştir. Metanol varlığında %30 metanolden fazla konsantrasyonda kazein çözünemediğinden en fazla %30 konsantrasyona çıkılabilmektedir, etanol varlığında bu konsantrasyon değeri %50 etanol konsantrasyonuna, n-propanol varlığında %30 n-propanol konsantrasyonuna ve i-propanol varlığında ise %35 i-propanol konsantrasyonuna kadar çıkılmış ve bu konsantrasyonlardaki kalan aktivite değerleri belirlenmiştir.



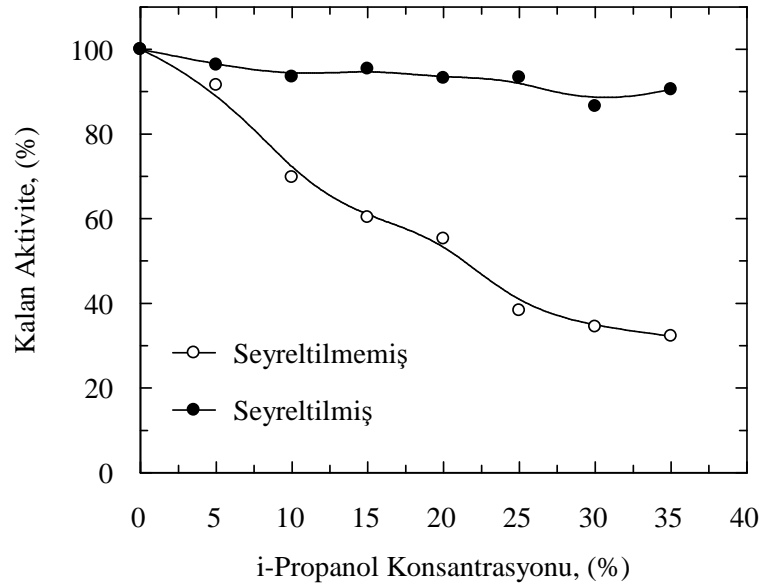
Şekil 4. 2: %10-%30 Metanol konsantrasyonlarında alkalen proteaz enziminin 30°C ve pH 10.5'da 120 dakika ön inkübasyonu sonucunda tersinir inhibisyonunun belirlenmesi



Şekil 4. 3: %10-%50 etanol konsantrasyonlarında alkalen proteaz enziminin 30°C ve pH 10.5'da 120 dakika ön inkübasyonu sonucunda tersinir inhibisyonunun belirlenmesi



Şekil 4. 4: %10-%30 n-propanol konsantrasyonlarında alkalen proteaz enziminin 30°C ve pH 10.5'da 120 dakika ön inkübasyonu sonucunda tersinir inhibisyonunun belirlenmesi

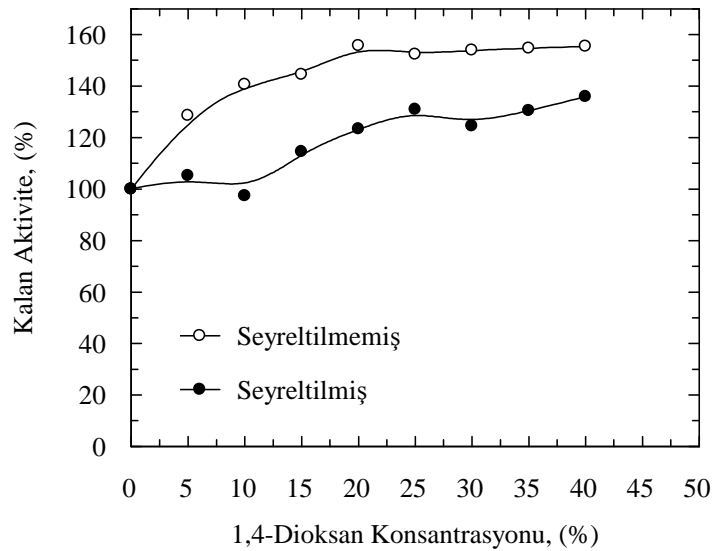


Şekil 4. 5: %10-%35 i-propanol konsantrasyonlarında alkalen proteaz enziminin 30°C ve pH 10.5'da 120 dakika ön inkübasyonu sonucunda tersinir inhibisyonunun belirlenmesi

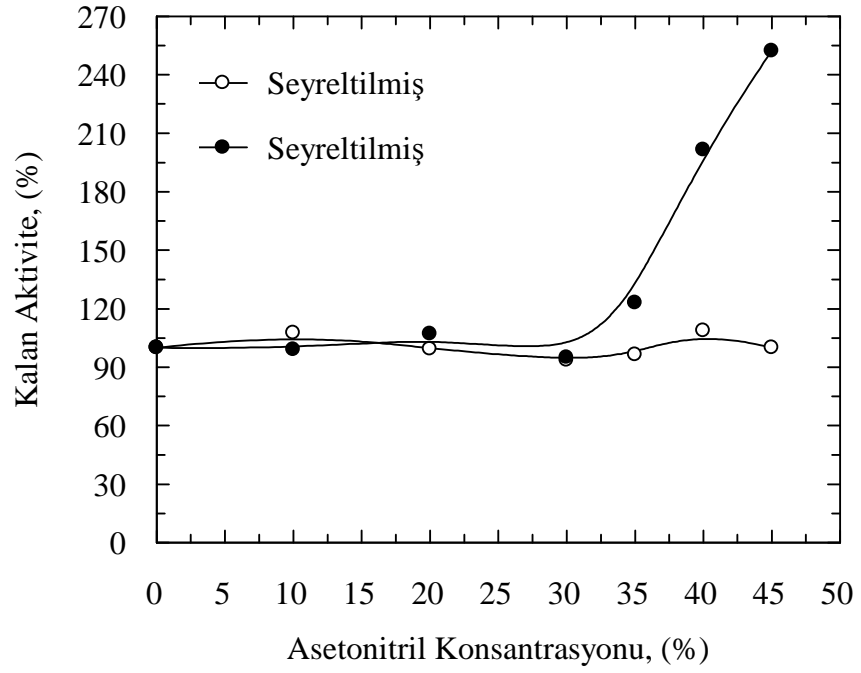
4.1.2.2 Folin-Ciocalteu reaktifi içermeyen yöntemle:

Organik çözücüler varlığında aktivasyon da gözlenebilir. Bu durumda aktivite organik çözücülerin artan konsantrasyonu ile artar ve organik çözücü seyreltilmesi yapıldıktan sonra da organik çözücü yokluğunda belirlenen aktivite değerleri okunur.

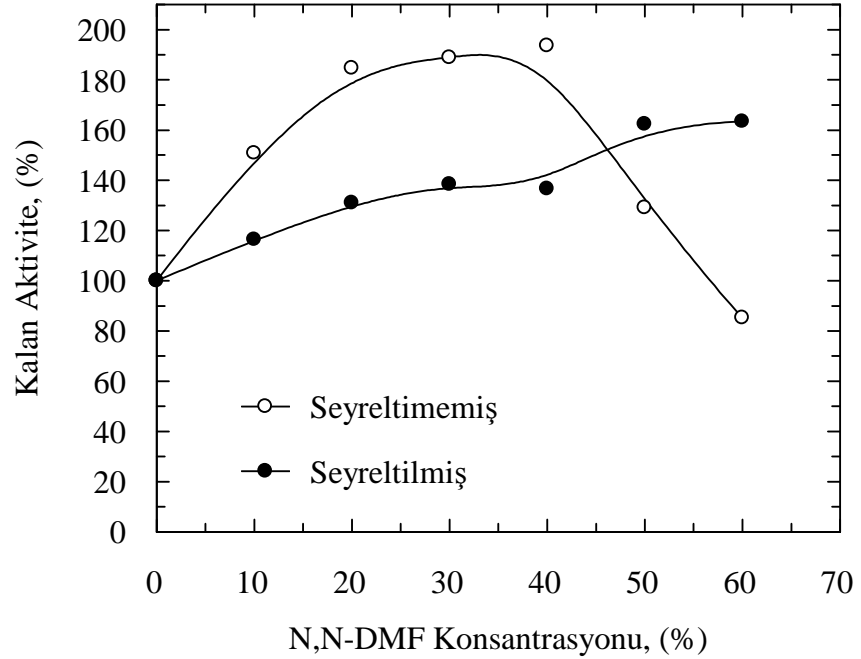
Alkalen proteaz enziminin 1,4- dioksan, N,N'-DMF, asetonitril ve DMSO'un artan konsantrasyonları varlığında 30°C'de 120 dakika ön inkübasyonu sonucunda aktivitenin arttığı görülmüştür. Organik çözücü seyreltmesi yapıldıktan sonra aktivasyonun organik çözücüyü içermeyen ortamdaki değerine ulaşması aktivasyonun zorunlu olmayan aktivasyon olduğunu göstermiştir. 1,4-dioksan, N,N'-DMF, asetonitril ve DMSO'un artan konsantrasyonları ile bu konsantrasyonlar varlığındaki kalan aktivite değerlerine karşı işaretlendiğinde oluşan grafikler Şekil 4.6–4.9 arasında gösterilmiştir. Çalışılan konsantrasyonlar substratın organik çözücü varlığında çözünebildiği en üst konsantrasyonlar olarak belirlenmiştir. 1,4-dioksan varlığında %40 1,4-diokсандan fazla konsantrasyonda kazein çözünemediğinden en fazla %40 konsantrasyona çıkılabildiği, N,N'-DMF varlığında bu konsantrasyon değeri %60 N,N'-DMF konsantrasyonuna, asetonitril varlığında %45 asetonitril konsantrasyonuna ve DMSO varlığında ise %50 DMSO konsantrasyonuna kadar çıkılmış ve bu konsantrasyonlardaki kalan aktivite değerleri belirlenmiştir. Aktivasyon gözlemlendiği durumlarda bölüm 3.4.2 ve 3.4.2.1'de belirtilen aktivite belirleme yöntemi ile aktivite belirlenmiştir. 1,4-dioksan, N,N'-DMF, asetonitril ve DMSO'un artan konsantrasyonları varlığında aktivasyonun gözlemlendiği durumda renksiz olması gereken enzim içermeyen kör denemenin bulunduğu tüp de mavi renk oluşturduğu için Folin-Ciocalteu reaktifi içermeyen yöntem kullanılarak renk oluşumuna neden olan reaktifin kullanılmadığı yöntem ile aktivite belirlenmiştir.



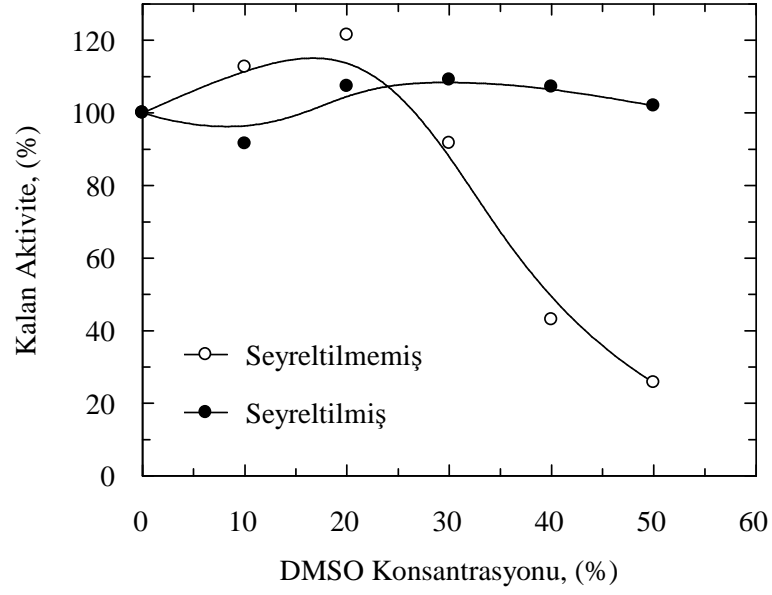
Şekil 4. 6: Artan 1,4-dioksan konsantrasyonlarında alkalen proteaz enziminin 30°C ve pH 10.5'da 120 dakika ön inkübasyonu sonunda zorunlu olmayan aktivasyonunun belirlenmesi



Şekil 4. 7: Artan asetonitril konsantrasyonları varlığında alkalen proteaz enziminin 30°C ve pH 10.5'da 120 dakika ön inkübasyon sonunda zorunlu olmayan aktivasyonunun belirlenmesi



Şekil 4. 8: Artan N,N'-DMF konsantrasyonları varlığında alkalen proteaz enziminin 30°C ve pH 10.5'da 120 dakika ön inkübasyon sonunda zorunlu olmayan aktivasyonunun belirlenmesi



Şekil 4. 9: Artan DMSO konsantrasyonları varlığında alkalen proteaz enziminin 30°C ve pH 10.5’da 120 dakika ön inkübasyon sonunda zorunlu olmayan aktivasyonunun belirlenmesi

1,4-dioksan varlığında seyreltilmemiş durumda aktivasyon %5 konsantrasyondan itibaren görünmekle beraber en fazla aktiviteyi %150 olarak %20 1,4-dioksan konsantrasyonunda göstermiştir ve bu konsantrasyondan itibaren kazeinin çözünebildiği en üst konsantrasyon sınırı olan %45 1,4-dioksan konsantrasyonuna kadar aktivitede plato gözlenmiştir. 1,4-dioksan konsantrasyonunun 6 kat seyreltildiği durumda %10 organik çözücü konsantrasyonun aktivite %100’e düşmüştür. Ancak %15 dioksan konsantrasyonundan itibaren seyreltilmiş formda dahi enzimde aktivite artışı gözlenmiştir. Çünkü %15’lik konsantrasyon 6 kat seyreltildiğinde %2.5’e inmektedir. Bu durumda seyrelme sonucunda %2.5 konsantrasyonundaki 1,4-dioksanın yaptığı aktivasyon değerleri gözlenmektedir. Seyreltilmiş formda da en fazla aktivite %120 olarak %20 1,4-dioksan konsantrasyonunda görülmüştür. Bu esasen %3.5’lik dioksan konsantrasyonunun yaptığı aktivasyona denk gelmektedir. Buradan, yapılan seyrelmenin aktivasyonu ortadan kaldırdığı net olarak anlaşılmaktadır.

Asetonitrilin artan konsantrasyonlarında yapılan çalışmada; asetonitril varlığında kazein en fazla %45 konsantrasyonda çözünebildiği için bu konsantrasyona kadar çıkılabilmektedir. %20 asetonitril konsantrasyonuna dek enzimin aktivitesinde değişiklik gözlenmemiştir. %30 asetonitril konsantrasyonundan itibaren alkalen

proteaz enzim aktivitesinde hızlı bir artış gözlenmiştir. Asetonitril konsantrasyonunun 6 kat seyreltildiği durumda kalan aktivite ölçüldüğünde seyreltilmemiş formda olduğu gibi %20 asetonitril konsantrasyonuna dek aktivitede değişiklik olmamıştır. Ancak %30'un üzerindeki asetonitril konsantrasyonlarında 6 kat seyrelmeden sonra aktivasyonun tamamen ortadan kalktığı gözlenmiştir.

N,N'-DMF'in artan konsantrasyonlarında yapılan çalışmada organik çözücü için üst sınır %60 N,N'-DMF olarak belirlenmiştir. Seyreltilmenin yapılmadığı durumda en fazla aktivite %190 olarak %40 organik çözücü varlığında görülmüş ve bu konsantrasyondan itibaren aktivitede azalma kaydedilmiştir. Üst konsantrasyon sınır olan %60 N,N'-DMF konsantrasyonunda aktivite %90'a düşmüştür. 6 kat seyreltilmenin yapıldığı durumda %40'a kadarki çalışma konsantrasyonlarında aktivasyonun gerilediği gözlenmiştir. %50 ve %60'luk konsantrasyonlar 6 kat seyreltildiğinde ortamdaki N,N'-DMF konsantrasyonları sırasıyla %8.3 ve %10'a indiğinden bu konsantrasyonların neden olduğu aktivasyonlar gözlenmiştir.

DMSO ile yapılan çalışmada çözücünün üst sınır konsantrasyonu %50 olarak belirlenmiştir. %20 DMSO konsantrasyonuna kadarenzim üzerinde aktivasyon gözlenirken bu konsantrasyonun üzerinde DMSO'nun enzimi inhibe ettiği gözlenmiştir. En fazla aktivite %20 DMSO konsantrasyonunda %120 olarak belirlenmiştir. En düşük kalan aktivite ise %50 DMSO konsantrasyonunda %25 olarak belirlenmiştir. 6 kat seyreltilmenin yapıldığı durumda ise çalışılan konsantrasyonların neden olduğu aktivasyon ve inhibisyon etkileri ortadan kalkmıştır.

Bölüm 4.1.2.1'de belirtilen metanol, etanol, n-propanol ve i-propanol'ün artan konsantrasyonlarının seyreltilmemiş formlarında, enzim üzerindeki etkileri kalan aktivitelerini dereceli olarak düşürüp organik çözücülerin 6 kat seyreltildiği durumda aktivitenin geri kazanılması sebebi ile bu çözücüler varlığında enzim için başlangıç hızı koşullarında tersinir inhibisyon kinetiği çalışılmıştır.

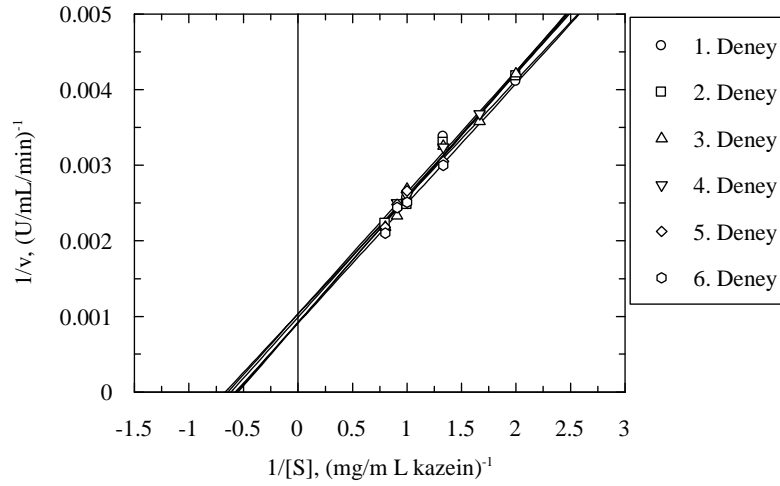
Bölüm 4.1.2.2'de belirtilen 1,4-dioksan, asetonitril, N,N'-DMF ve DMSO'nun artan konsantrasyonları varlığında kalan aktivitenin belirlendiği çalışmada; bu organik

çözücülerin enzim üzerinde aktivasyon etkisi oluşturduğu için aktivasyon kinetiği çalışılmıştır. Ancak DMSO varlığında farklı olarak hem inhibisyon hem de aktivasyon kinetiği çalışılmıştır. Enzim DMSO'nun %20 konsantrasyonundaki varlığında aktive olur iken, aynı organik çözücününün %30 konsantrasyonundan itibaren inhibe olmaktadır. Bu yüzden bu çözücü varlığında; %20 konsantrasyona kadar aktivasyon kinetiği, %30 konsantrasyonunun üzerinde de inhibisyon kinetiği çalışılmıştır.

4.1.3 Organik çözücü varlığında ve yokluğunda alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi ve organik çözücülerin enzim üzerinde yarattıkları tersinir inhibisyon ve aktivasyon etkisinin belirlenmesi

4.1.3.1 Organik çözücü yokluğunda alkalen proteaz enziminin Folin-Ciocalteu Reaktifi içeren yöntem ile K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi

Alkalen proteaz enziminin organik çözücü içermeyen ortamdaki K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi için bölüm 3.7.1'de belirtilen protokol uygulanmıştır. 50 mM, pH 10.5 NaOH–NaCl–glisin tampon çözeltisinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kazein çözeltilerinin 2.5 mL'si 450 μ L tampon çözelti içine ilave edilen 50 μ L enzim çözeltisi ile muamele edilmiştir. Enzimatik reaksiyon sonunda açığa çıkan tirozin Folin-Ciocalteu reaktifi içeren yöntemle belirlenerek başlangıç reaksiyon hızı yani enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Farklı başlangıç substrat konsantrasyonları ve bunlara karşılık gelen başlangıç hızlarının resiprokalleri $1/v$ 'ye karşı $1/[S]$ işaretlenerek Lineweaver–Burk diyagramı oluşturulmuştur. Nativ enzimin K_m ve V_m kinetik parametrelerinin belirlenmesi için deneme 6 kez tekrarlanmıştır. Deney sonuçlarının aritmetik ortalaması ve ortalamanın standart sapması hesaplanarak K_m ve V_m değerleri belirlenmiştir. Nativ enzimin K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesinde oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramı Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4. 10: Organik çözücü içermeyen (nativ) enzimin K_m ve V_m değerlerinin hesaplamak üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Şekil 4.10 diyagramından yararlanılarak elde edilen doğruların eğiminden; intreseptinden ve x eksenini kestiği noktalarda K_m ve V_m hesaplanmıştır. Hesaplanan parametreler tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4. 1: Nativ enzimin K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	V_m (μ mol tirozin /mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00099	0.00161	1.63	1010.10	5.57	0.9815
2	0.00091	0.00166	1.82	1098.90	6.06	0.9910
3	0.00092	0.00165	1.79	1086.96	6.00	0.9920
4	0.00103	0.00161	1.56	970.87	5.36	0.9963
5	0.00103	0.00154	1.49	970.87	5.36	0.9767
6	0.00091	0.00158	1.74	1098.90	6.06	0.9819

Tablo 4. 2: Nativ enzimin K_m , V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m , (mg/mL kazein)	1.67 ± 0.05
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	1024.63 ± 22.81
Dönüştürülen V_m , (μ mol tirozin/mL/dak)	5.62 ± 0.21
İntersept	$9.78 \times 10^{-4} \pm 2.14 \times 10^{-5}$
Eğim	$1.61 \times 10^{-3} \pm 1.73 \times 10^{-5}$

Belirlenen V_m değerinin birimi U/mL/min’dir. Bu birimin dakikada μ mol tirozin/mL/min şekline dönüştürülebilmesi için tirozinin molekül ağırlığı olan 181.19

g/mol değerine bölünmesi gerekmektedir. Bundan sonraki V_m hesaplarında V_m ; V_m dönüştürülen olarak hesaplanacaktır. Organik çözücü içermeyen ortamda Folin-Ciocalteu reaktifi içeren yöntem ile belirlenen K_m ve V_m değerlerinin ortalamaları ile doğruların interseptleri ve eğimlerinin ortalamaları, standart sapmaları ile birlikte tablo 4.2’de verilmiştir.

4.1.3.2 Alkalen proteaz enziminin k_{cat} değeri (turn-over katsayısı) ve katalitik performansının (k_{cat}/K_m) belirlenmesi

Bacillus clausii GMBAE 42 soyunun ürettiği alkalen proteazla kazein hidrolizi reaksiyonuna ilişkin katalitik hız sabiti (k_{cat}) 846.40 dak^{-1} olarak hesaplanmıştır. Enzimin katalitik performansını ifade eden k_{cat}/K_m oranı 506.83 $(\text{dak})^{-1}(\text{mg/mL kazein})^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

4.1.3.3 Alkalen proteaz enziminin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

Alkalen proteaz enzimiyle kazein hidroliz reaksiyonuna ilişkin aktivasyon serbest enerjisi ($\Delta G^\#$), geçiş hali serbest enerjisi ($\Delta G_{E-T}^\#$) ve substrat bağlama serbest enerjisi (ΔG_{E-S}) (termodinamik parametreleri) (2.40), (2.41) ve (2.42) no’lu denklemlerden yararlanılarak sırasıyla 67.59 kJ/mol, -15.79 kJ/mol ve 1.29 kJ/mol olarak hesaplanmıştır.

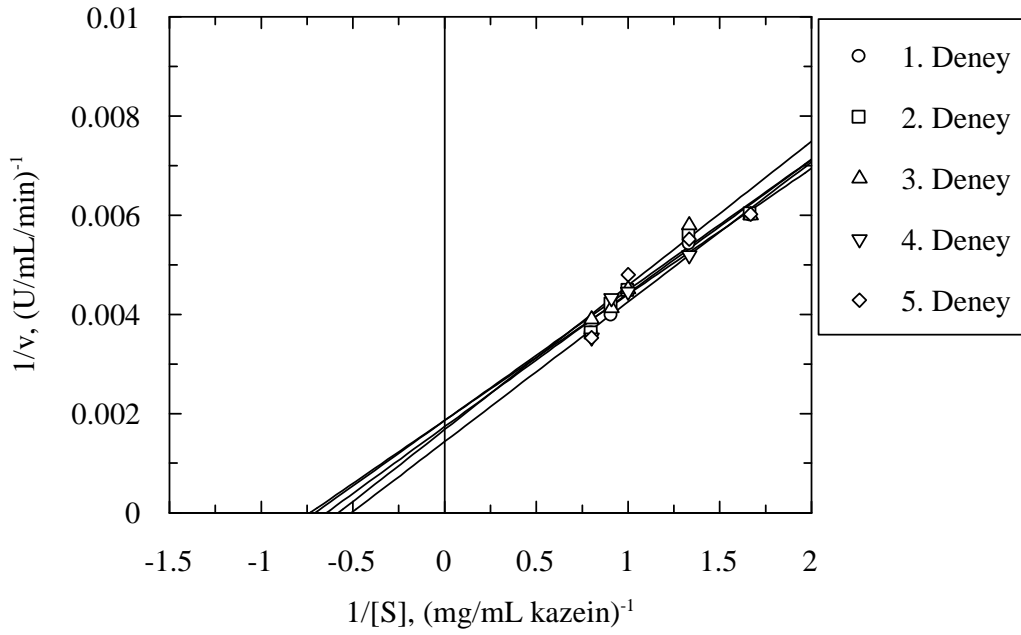
4.1.3.4 Organik çözücü varlığında Folin-Ciocalteu reaktifi içeren yöntem ile alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi ve organik çözücülerin enzim üzerinde yarattıkları tersinir inhibisyon etkisinin belirlenmesi

Metanol, etanol, n-propanol ve i-propanol’ün artan konsantrasyonları varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi Folin-Ciocalteu reaktifi varlığında bölüm 3.7.3’te belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. 50 mM pH

10.5 NaOH-NaCl-glisin- tamponunda çalışılan konsantrasyondaki organik çözücü içerecek şekilde 0.5, 0.6, 0.75, 1.0, 1.1 ve 1.25 mg/mL kazein çözeltileri hazırlanmıştır. Deney tüplerine 50 µL enzim ve 450 µL çalışılan konsantrasyondaki organik çözücü içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tampon çözelti ilave edilmiştir. Hazırlanan reaksiyon ortamı üzerine 2.5 mL hazırlanan kazein çözeltilerinden ilave edilmiştir. Denemede kör olarak hazırlanan deney tüpüne enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-glisin tamponu ilave edilmiştir. Her bir konsantrasyon için ayrı kör deneme hazırlanmıştır. Enzimatik reaksiyon sonunda açığa çıkan tirozin Folin-Ciocalteu reaktifi içeren yöntemle belirlenerek başlangıç reaksiyon hızı yani enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Farklı başlangıç substrat konsantrasyonları ve bunlara karşılık gelen başlangıç hızlarının resiprokalleri $1/v$ 'ye karşı $1/[S]$ işaretlenerek Lineweaver–Burk diyagramı oluşturulmuştur. Her bir organik çözücü konsantrasyonları varlığındaki K_m ve V_m kinetik parametrelerinin hesaplanması için denemeler 5 kez tekrarlanmıştır. Deney sonuçlarının aritmetik ortalaması ve ortalamanın standart sapması hesaplanarak organik çözücü varlığındaki görünen K_m ve V_m değerleri belirlenmiştir.

4.1.3.4.1 Metanol varlığında enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

Metanol için %2.5, 5, 10, 20, 25 ve %30 konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Bu konsantrasyonlar için oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramları sırasıyla Şekil 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16'da gösterilmiştir. Çalışılan metanol konsantrasyonları varlığında Folin-Ciocalteu reaktifi içeren yöntem ile belirlenen K_m ve V_m değerleri ile oluşturulan doğruların interseptleri ve eğimleri sırasıyla tablo 4.3, 4.5, 4.7, 4.9, 4.11 ve 4.13'te verilmiştir. Hesap ile bulunan K_m ve V_m değerlerinin ortalamaları ile doğruların y eksenini kestiği noktalar olan interseptleri ve eğimlerinin ortalamaları, standart sapmaları ile birlikte tablo 4.4, 4.6, 4.8, 4.10 4.12 ve 4.14'te verilmiştir.



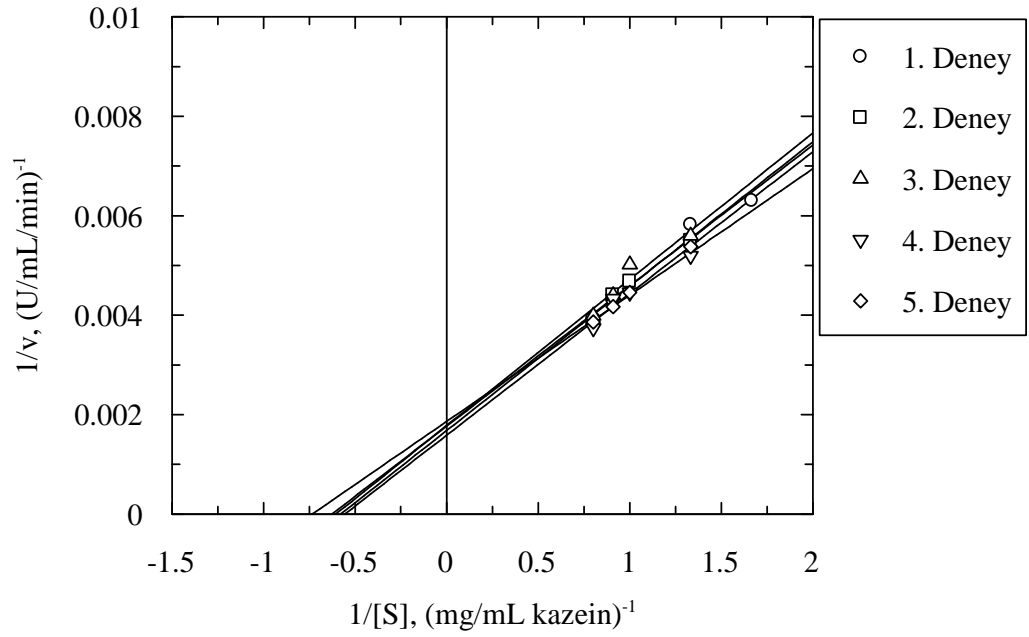
Şekil 4. 11: %2.5 Metanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 3: %2.5 Metanol varlığında enzimin Şekil 4.11’deki Lineweaver-Burk diyagramından belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00143	0.00282	1.97	699.3	3.86	0.9903
2	0.00165	0.00274	1.66	606.06	3.34	0.9878
3	0.00186	0.00263	1.41	537.63	2.97	0.9638
4	0.00155	0.00281	1.81	645.16	3.56	0.9495
5	0.00174	0.00269	1.55	574.71	3.17	0.9493

Tablo 4. 4: %2.5 Metanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.68 ± 0.09
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	612.57 ± 62.60
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	3.38 ± 0.15
İntersept	$1.65 \times 10^{-3} \pm 7.43 \times 10^{-5}$
Eğim	$2.74 \times 10^{-3} \pm 3.60 \times 10^{-5}$



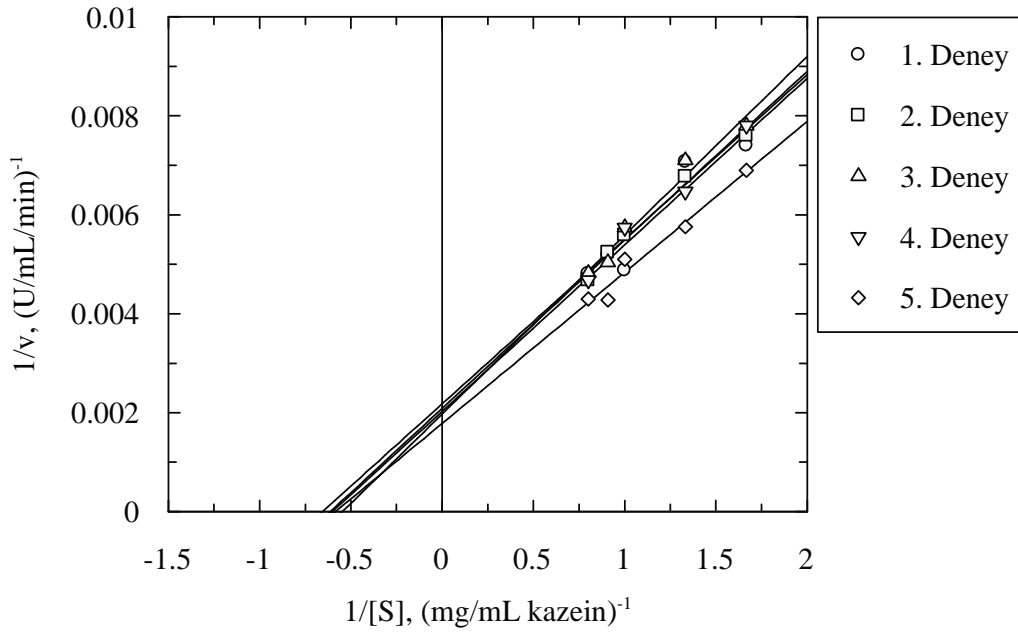
Şekil 4. 12: %5 Metanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 5: %5 Metanol varlığında enzimin Şekil 4.12’deki Lineweaver-Burk diyagramından belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deneý No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ g tirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00177	0.00283	1.59	564.97	3.36	0.9904
2	0.00168	0.00291	1.73	595.24	3.28	0.9878
3	0.00178	0.00294	1.65	561.80	3.10	0.9581
4	0.00167	0.00273	1.64	598.80	3.30	0.9734
5	0.00159	0.00285	1.79	628.93	3.47	0.9992

Tablo 4. 6: %5 Metanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.68 ± 0.04
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	589.95 ± 27.58
Dönüştürülen V_m (μ mol tirozin/mL/dak)	3.30 ± 0.06
İntersept	$1.70 \times 10^{-3} \pm 3.51 \times 10^{-5}$
Eğim	$2.85 \times 10^{-3} \pm 3.64 \times 10^{-5}$



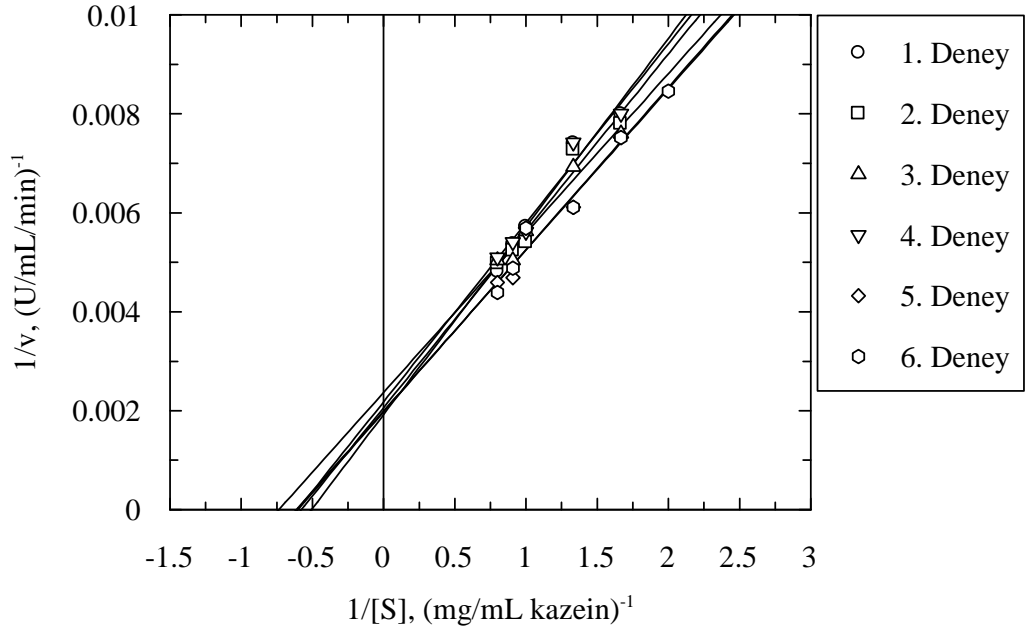
Şekil 4. 13: % 10 Metanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 7: % 10 Metanol varlığında enzimin Şekil 4.13’deki Lineweaver-Burk diyagramından belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00203	0.00336	1.65	492.61	2.72	0.9476
2	0.00218	0.00332	1.52	458.72	2.53	0.9934
3	0.00197	0.00361	1.83	507.61	2.8	0.9846
4	0.00209	0.0034	1.63	478.47	2.64	0.9898
5	0.00179	0.00305	1.70	558.66	3.08	0.9831

Tablo 4. 8: % 10 Metanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.67 ± 0.05
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	499.21 ± 37.81
Dönüştürülen V_m (μ mol tirozin/mL/min)	2.75 ± 0.09
İntersept	$2.01 \times 10^{-3} \pm 6.54 \times 10^{-5}$
Eğim	$3.35 \times 10^{-3} \pm 8.97 \times 10^{-5}$



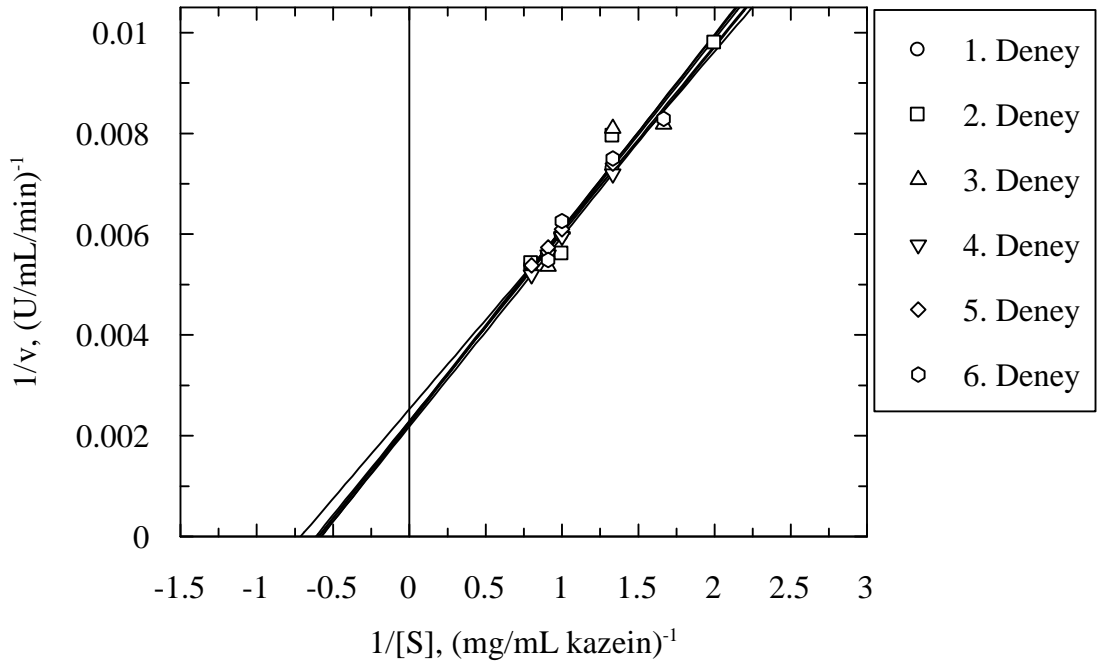
Şekil 4. 14: %20 Metanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 9: %20 Metanol varlığında enzimin Şekil 4.14’deki Lineweaver-Burk diyagramından belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deneý No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00192	0.0038	1.98	520.83	2.87	0.9821
2	0.00206	0.00357	1.73	485.44	2.68	0.9765
3	0.00237	0.00322	1.36	421.94	2.33	0.9844
4	0.00218	0.00362	1.66	458.72	2.53	0.9812
5	0.00198	0.00328	1.66	505.05	2.78	0.9714
6	0.00199	0.00325	1.63	502.51	2.77	0.9874

Tablo 4. 10: %20 Metanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.67 ± 0.08
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	482.41 ± 36.39
Dönüştürülen V_m (μ mol tirozin/mL/dak)	2.66 ± 0.08
İntersept	$2.08 \times 10^{-3} \pm 6.65 \times 10^{-5}$
Eğim	$3.46 \times 10^{-3} \pm 9.79 \times 10^{-5}$



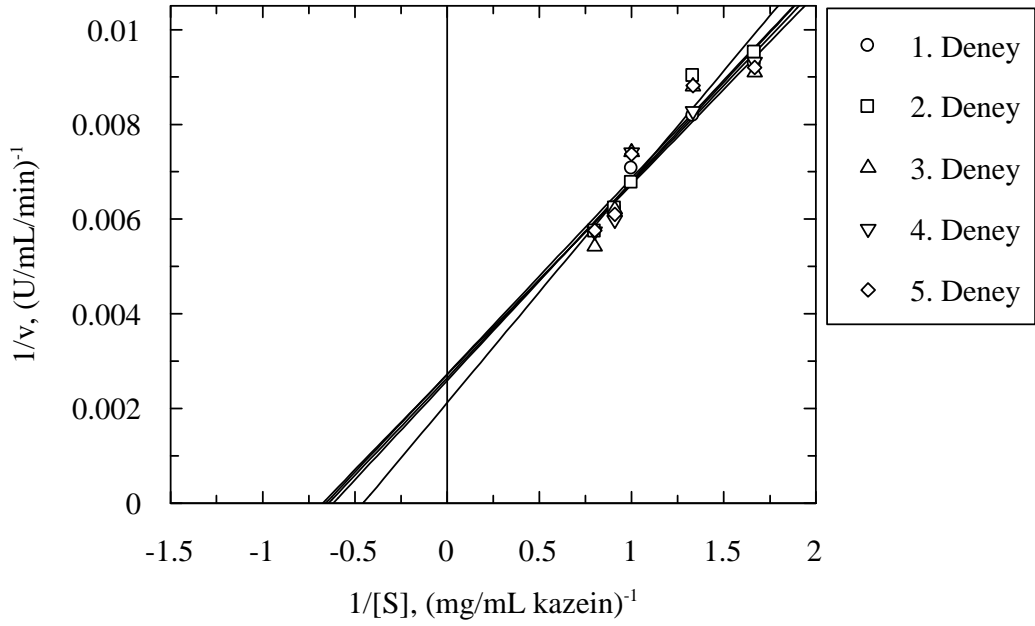
Şekil 4. 15: %25 Metanol varlığında alkalin proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 11: %25 Metanol varlığında enzimin Şekil 4.15’deki Lineweaver-Burk diyagramından belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00229	0.00373	1.63	436.68	2.41	0.9947
2	0.00223	0.00387	1.73	448.43	2.47	0.977
3	0.00226	0.00381	1.69	442.48	2.44	0.9232
4	0.00218	0.00376	1.72	458.72	2.53	0.9999
5	0.00229	0.00383	1.67	436.68	2.41	0.9996
6	0.00253	0.00355	1.40	395.26	2.18	0.9801

Tablo 4. 12: %25 Metanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.64 ± 0.05
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	436.37 ± 21.78
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	2.41 ± 0.05
İntersept	$2.30 \times 10^{-3} \pm 5.55 \times 10^{-5}$
Eğim	$3.76 \times 10^{-3} \pm 4.64 \times 10^{-5}$



Şekil 4. 16: %30 Metanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

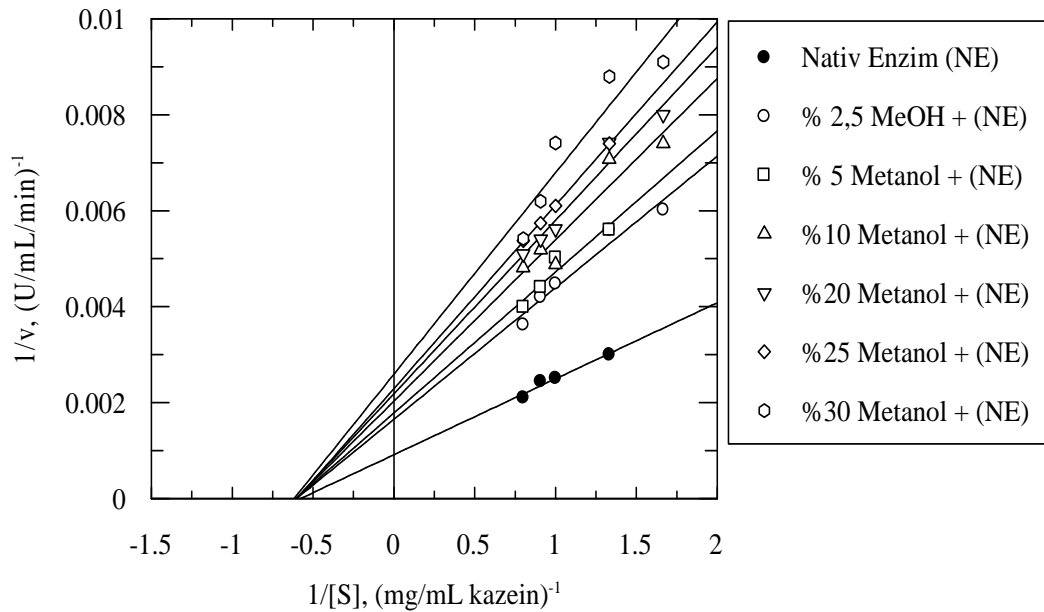
Tablo 4. 13: %30 Metanol varlığında enzimin Şekil 4.16'daki Lineweaver-Burk diyagramından belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00271	0.00467	1.48	369.00	2.04	0.988
2	0.00212	0.00467	2.20	471.70	2.60	0.9723
3	0.00259	0.0042	1.62	386.10	2.13	0.9586
4	0.00264	0.00412	1.56	378.79	2.09	0.9623
5	0.00272	0.00414	1.52	367.65	2.03	0.9468

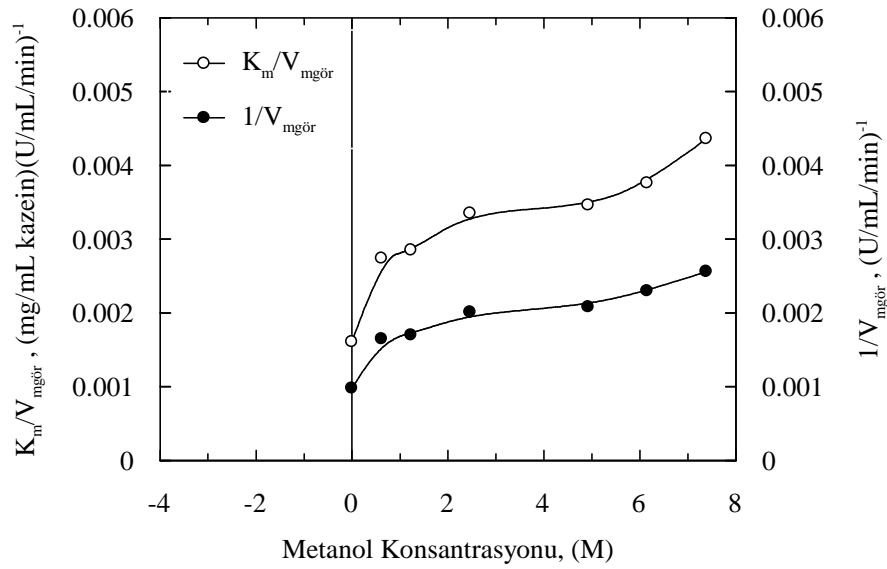
Tablo 4. 14: %30 Metanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.68 ± 0.13
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	394.65 ± 43.73
Dönüştürülen V_m (μ mol tirozin/mL/dak)	2.18 ± 0.11
İntersept	$2.56 \times 10^{-3} \pm 1.11 \times 10^{-4}$
Eğim	$4.36 \times 10^{-3} \pm 1.28 \times 10^{-4}$

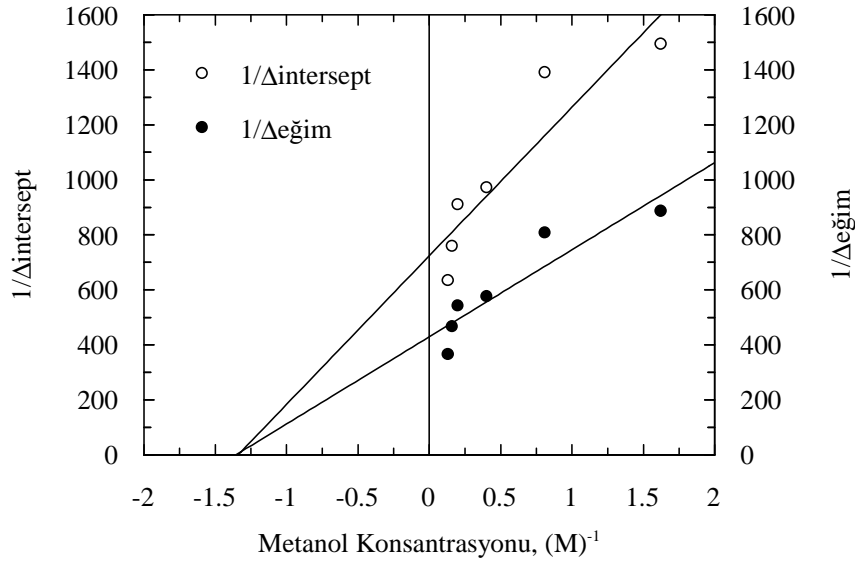
4.3, 4.5, 4.7, 4.9, 4.11, 4.13 no'lu tablolarda ve 4.4, 4.6, 4.8, 4.10, 4.12, 4.14 no'lu tablolarda verilen ortalama K_m değerlerine en yakın deney numaralarına ait veriler kullanılarak metanolün çalışılan tüm konsantrasyonları için Şekil 4.17'de gösterilen Lineweaver–Burk diyagramı oluşturulmuştur. Şekil 4.17'de görülen Lineweaver–Burk diyagramının metanolün alkalen proteaz üzerinde non–kompetitif tip inhibisyon oluşturduğunu göstermektedir. İnhibisyonun kısmi ya da gerçek non–kompetitif inhibisyon olduğunu görmek ve K_i inhibisyon sabitini hesaplayabilmek için Lineweaver–Burk diyagramından elde edilen intersept ve eğimlerden yararlanılarak ikincil çizimlere gidilmiştir. Görünen eğim ve görünen intersept çalışılan inhibitör (organik çözücü) konsantrasyonuna karşı işaretlenerek Şekil 4.18'de gösterilen ikincil çizimler elde edilmiştir. İncil çizimlerden hiperboller elde edilmiştir. Bu durum; metanolün artan konsantrasyonları varlığında enzimin kısmi (hiperbolik) non–kompetitif inhibisyona uğradığı göstermiştir. Bölüm 2.4.1 ve (2.24) ve (2.35) no'lu eşitliklerden yararlanılarak ncl çizimlere gidilmiştir. Elde edilen doğruların eğiminden, interseptinden ve x eksenini kestiği noktalardan yararlanılarak α , β ve K_i değerleri hesaplanmıştır. α değerinin 1, β değerinin de 0.41 M metanol çıkması inhibisyonun kısmi non–kompetitif inhibisyon olduğunu doğrulamıştır. Artan metanol konsantrasyonları varlığında ncl izim Şekil 4.19'da ncl çizimden yararlanılarak elde edilen α , β ve K_i değerleri tablo 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4. 17: Metanolün artan konsantrasyonları varlığında oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramı



Şekil 4. 18: Artan metanol konsantrasyonları varlığında Şekil 4.17’deki doğruların eğim ve interseptlerinin metanol konsantrasyonuna karşı işaretlenmesiyle oluşturulan ikincil çizim



Şekil 4. 19: Artan metanol konsantrasyonları varlığında oluşturulan üçüncül çizim

Tablo 4. 15: Artan metanol konsantrasyonu varlığında üçüncül çizimlerden yararlanılarak hesaplanan α , β ve K_i değerleri

	$1/[I]-1/\Delta\dot{\text{Intersept}}$ $r= 0.9124$	$1/[I]-1/\Delta\dot{\text{Eğim}}$ $r= 0.9164$
İntersept	724.00	429.27
Eğim	540.31	316.74
β	0.41	-
α	-	1.006
K_i, (M)	0.307	0.304

Metanolün artan konsantrasyonları varlığında alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri olan k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri (3.4) no'lu denklemden, termodinamik parametreleri ise (2.40), (2.41) ve (2.42) no'lu denklemlerden yararlanılarak belirlenmiş ve tablo 4.16'da kinetik parametreler, tablo 4.17'de termodinamik parametreler verilmiştir.

Tablo 4. 16: Artan metanol konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri

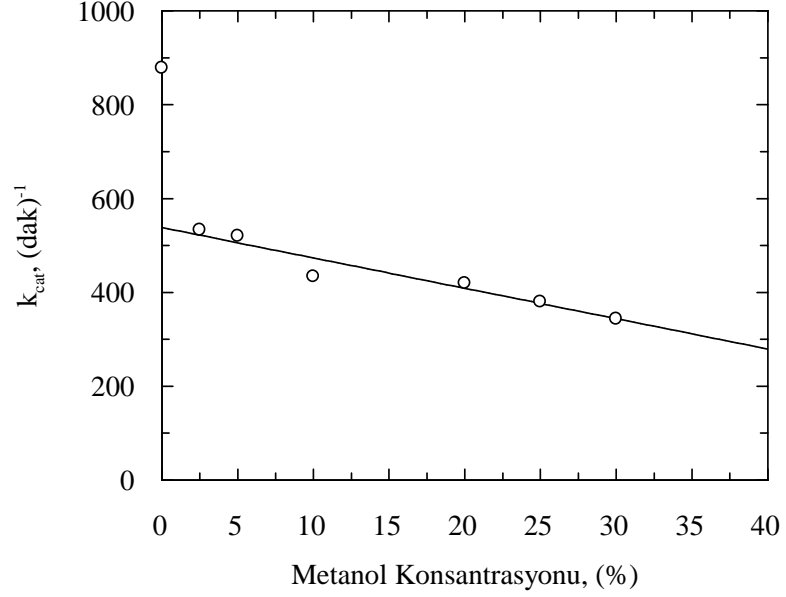
% Metanol	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ mol tirozin/mL/min)	k_{cat} (dak) ⁻¹	k_{cat}/K_m (dak) ⁻¹ (mg/ML kazein) ⁻¹
0	1.67	5.62	832.59	498.56
2.5	1.68	3.38	533.15	317.35
5	1.68	3.30	520.50	309.82
10	1.67	2.75	433.75	259.73
20	1.67	2.66	419.56	251.23
25	1.64	2.41	380.13	231.79
30	1.68	2.18	343.85	204.67

Tablo 4. 17: Artan metanol konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin termodinamik parametreleri

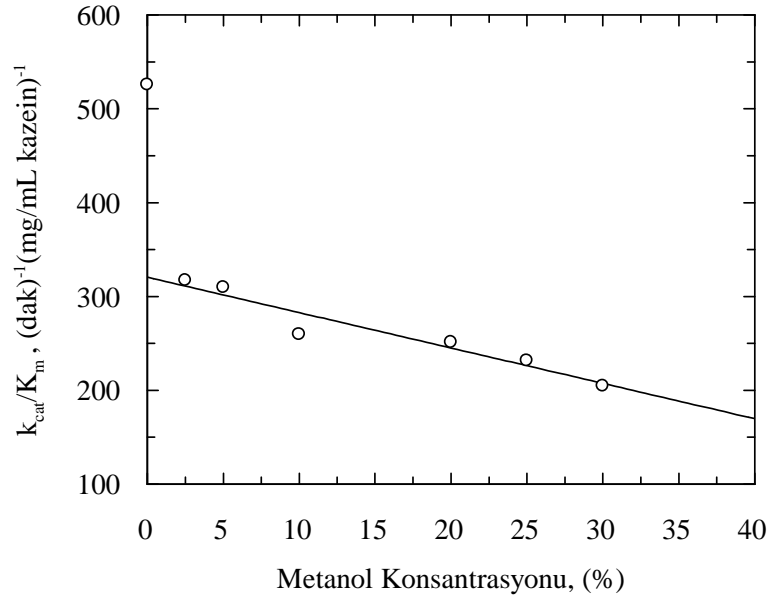
% Metanol	$\Delta G^\#$ (kJ/mol)	$\Delta G^\#_{E-T}$ (kJ/mol)	$\Delta G^\#_{E-S}$ (kJ/mol)
0	67.65	-15.66	1.29
2.5	68.78	-14.53	1.31
5	68.84	-14.47	1.31
10	69.30	-14.01	1.29
20	69.38	-13.93	1.29
25	69.63	-13.68	1.25
30	69.88	-13.43	1.31

Çalışılan metanol konsantrasyonlarına karşı enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri işaretlendiğinde aralarında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Şekil 4.20 ve 4.21 enzimin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin artan metanol konsantrasyonu ile lineer olarak azaldığını göstermektedir. Şekil 4.22 ve 4.23 ise enzimin $\Delta G^\#$, $\Delta G^\#_{E-T}$ ve $\Delta G^\#_{E-S}$ değerlerinin artan metanol konsantrasyonu ile lineer olarak arttığını göstermektedir. Metanolün non-kompetitif etkisinden dolayı K_m değeri

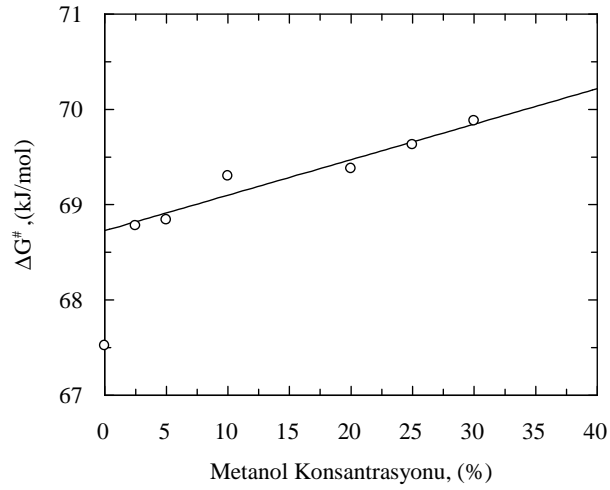
değişmediğinden ΔG_{E-S} K_m 'e bağlı olarak değiştiğinden K_m ve ΔG_{E-S} ile metanol konsantrasyonu arasında grafik oluşturulmamıştır.



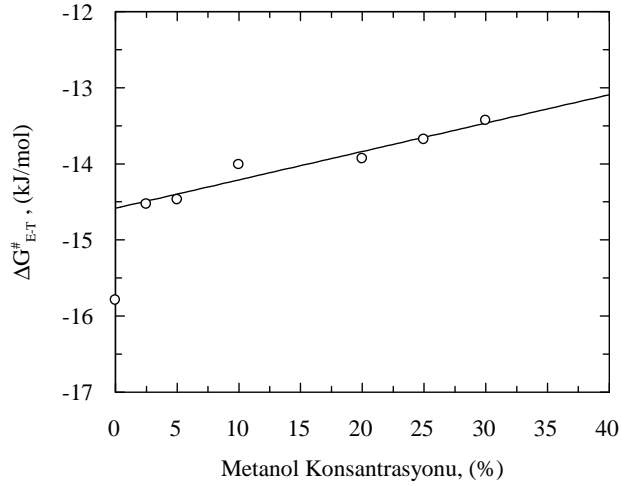
Şekil 4. 20: Alkale proteazın k_{cat} değerinin artan metanol konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = -0.9632$)



Şekil 4. 21: Alkale proteazın k_{cat}/K_m değerinin artan metanol konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = -0.9585$)



Şekil 4. 22: Alkale proteazın aktivasyon serbest enerjisinin ($\Delta G^{\#}$) artan metanol konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= -0.9686$)



Şekil 4. 23: Alkale proteazın geçiş hali serbest enerjisinin ($\Delta G^{\#}_{E-T}$) artan metanol konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= -0.9621$)

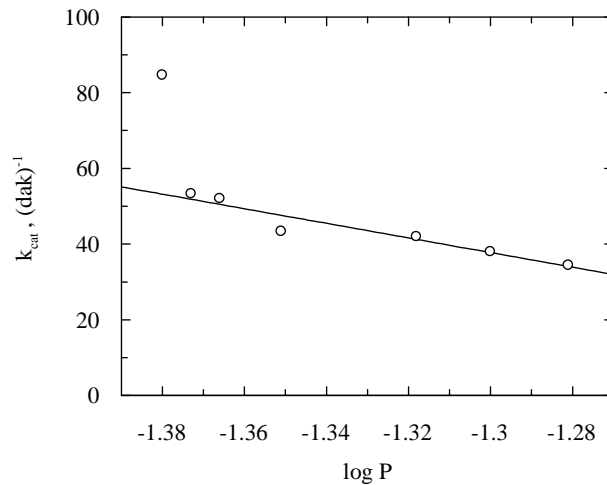
4.1.3.4.1.1 Metanol varlığında enzimatik katalizi etkileyen faktörlerin enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri ile ilişkilendirilmesi

Organik çözücü ortamında enzimatik katalizi etkileyen faktörlerden biri olan çözücünün, çalışılan çözücü konsantrasyonlarındaki log P değerleri (2.43) no'lu eşitlikten yararlanılarak hesaplanılmıştır. Buna göre çalışılan konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerleri tablo 4.18'de verilmiştir. Çalışılan metanol konsantrasyonları ile ilişkili log P değerlerine karşı enzimin kinetik (k_{cat} , k_{cat}/K_m) ve termodinamik parametreleri ($\Delta G^{\#}$, $\Delta G^{\#}_{E-T}$) işaretlendiğinde aralarında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir.

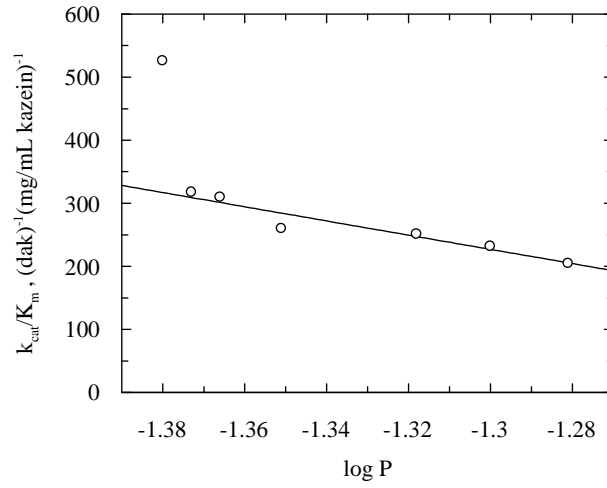
Tablo 4. 18: Farklı metanol konsantrasyonlarına ilişkin log P değerleri

Metanol Konsantrasyonu, (%)	Log P
0	-1.380
2.5	-1.373
5	-1.366
10	-1.351
20	-1.318
25	-1.300
30	-1.281

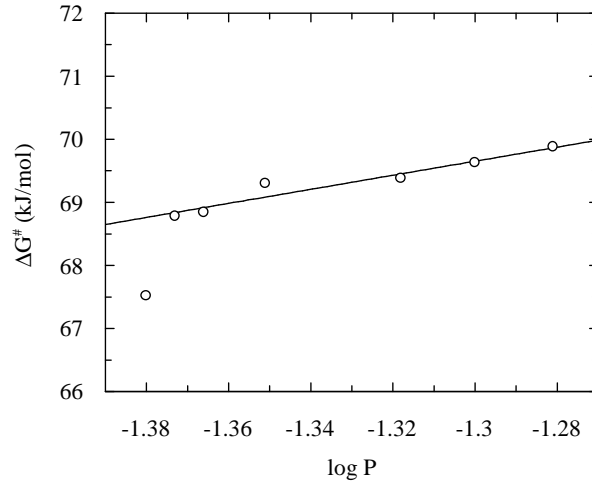
Log P değerlerine karşılık gelen kinetik parametrelerin grafikleri Şekil 4.24 ve 4.25’de, termodinamik parametrelere karşılık gelen grafikler Şekil 4.26 ve 4.27’de gösterilmiştir. Artan metanol konsantrasyonlarında enzimin kinetik parametreleri olan k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleriyle ilişkili log P değerleri arasında azalan bir doğrusal ilişki belirlenmiştir. Non-kompetitif inhibitör varlığında enzimin K_m değeri değişmediğinden artan metanol konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri ile K_m değerleri arasında grafik oluşturulmamıştır. Artan metanol konsantrasyonunda enzimin termodinamik parametreleri arttığından, bu konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerleri ile termodinamik parametrelerden ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger arasında artan bir doğrusal ilişki gözlenirken ΔG_{E-S} parametresi sadece K_m değeri ile bağlantılı olduğu için grafik oluşturulmamıştır.



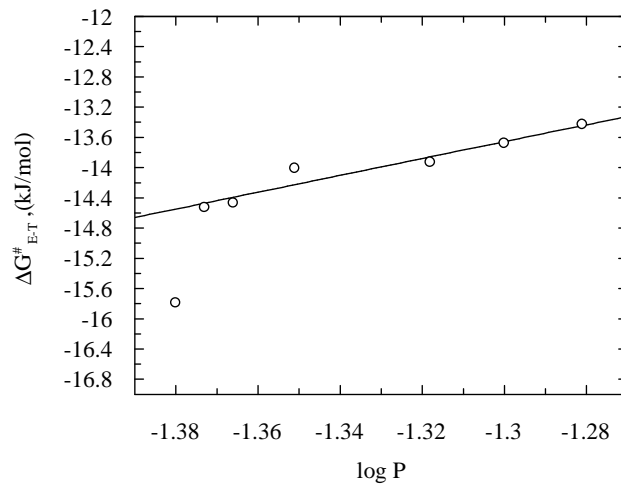
Şekil 4. 24: Alkalen proteazın k_{cat} değerinin artan metanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9585$)



Şekil 4. 25: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerinin artan metanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9584$)



Şekil 4. 26: Alkalen proteazın $\Delta G^\#$ değerleri ile artan metanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r = 0.9663$)



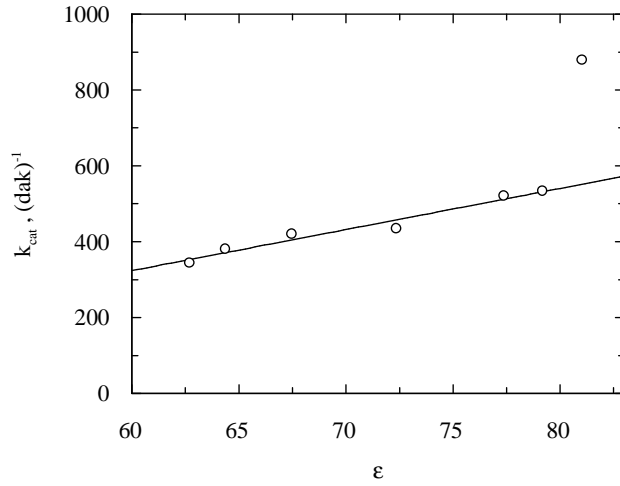
Şekil 4. 27: Alkalen proteazın $\Delta G^\#_{E-T}$ değerleri ile artan metanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r = 0.9663$)

Organik çözücü ortamında enzimatik katalizi etkileyen bir başka faktör, çözücünün dielektrik sabitidir. Metanolün artan konsantrasyonu ile ilişkili dielektrik sabitleri şekil 2.30 ve (2.6) no'lu tablodan yararlanılarak hesaplanmıştır. Buna göre çalışılan konsantrasyonlar ile ilişkili dielektrik sabitleri tablo 4.19'da verilmiştir.

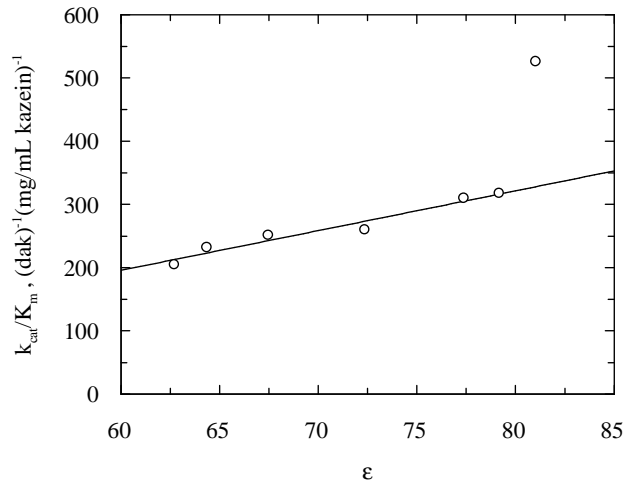
Tablo 4. 19: Artan metanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri

Metanol Konsantrasyonu, (%)	Dielektrik sabiti, (ϵ)
0	81.04
2.5	79.19
5	77.39
10	72.37
20	67.48
25	64.37
30	62.71
100	30.68

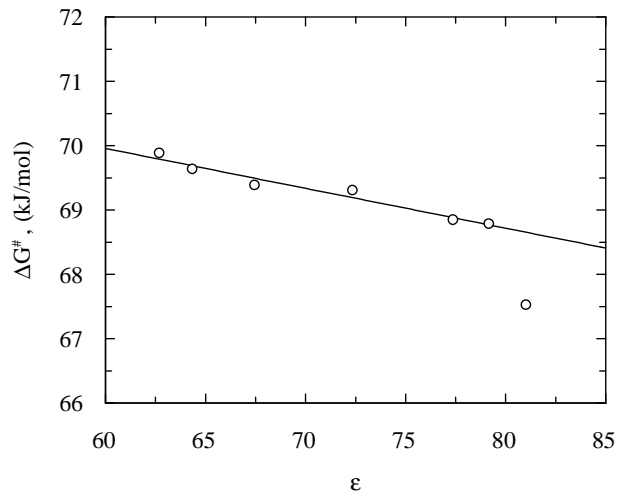
Çalışılan metanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitlerine karşı enzimin kinetik (k_{cat} , k_{cat}/K_m) ve termodinamik parametreleri (ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger) işaretlenmiş ve aralarında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Dielektrik sabitlerine karşılık gelen kinetik parametrelerin (k_{cat} , k_{cat}/K_m) grafikleri şekil 4.28, ve 4.29'da, termodinamik parametrelere (ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger) karşılık gelen grafikler ise Şekil 4.30 ve 4.31'de gösterilmiştir. Artan metanol konsantrasyonlarında gerçekleşen non-kompetitif inhibisyon için K_m değeri değişmediğinden K_m 'e karşı ϵ grafiği oluşturulmamıştır. Enzimin diğer kinetik parametreleri olan k_{cat} ve k_{cat}/K_m ile artan metanol konsantrasyonlarıyla ilişkili ϵ değerleri arasında artan lineer ilişkiler gözlenmiştir. Enzimin termodinamik parametrelerinden ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger ile artan metanol konsantrasyonlarıyla ilişkili ϵ değerleri arasında ise lineer olarak azalan bir ilişki belirlenmiştir. ΔG_{E-S} parametresi sadece K_m değeri ile bağlantılı olduğu için ΔG_{E-S} ve ϵ değerleri arasında grafik oluşturulmamıştır.



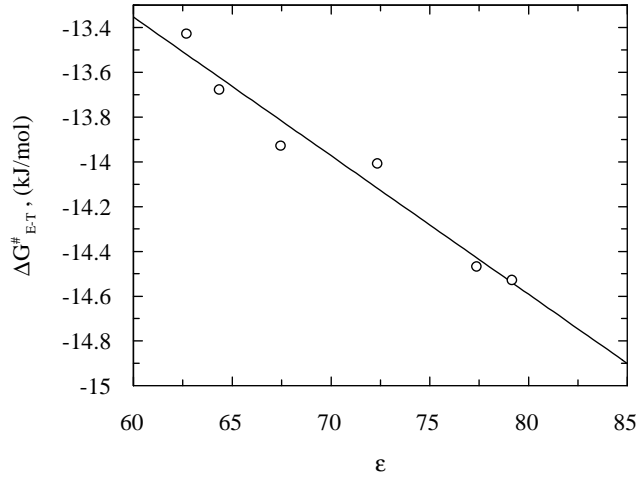
Şekil 4. 28: Alkalen proteazın k_{cat} değerleri ile artan metanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9816$)



Şekil 4. 29: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerleri ile artan metanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9755$)



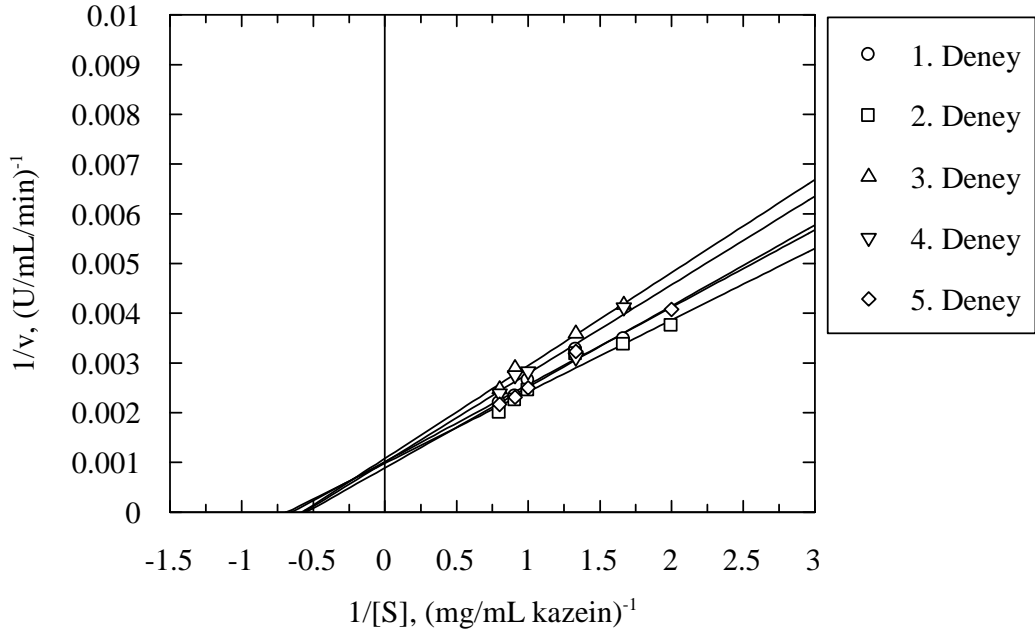
Şekil 4. 30: Alkalen proteazın ΔG^{\ddagger} değerleriyle artan metanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9794$)



Şekil 4. 31: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-T}^{\#}$ değerleriyle artan metanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9709$)

4.1.3.4.2 Etanol varlığında enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

Etanol için %10, 15, 20, 25, ve %30 konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Çalışılan konsantrasyonlarda enzimin kinetik parametrelerini belirlemek için oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramları şekil 4.32, 4.33, 4.34, 4.35 ve 4.36’da gösterilmiştir. Kinetik incelemelerin belirlenmesinde başlangıç hızı ölçümleri Folin-Ciocalteu reaktifi içeren yöntem ile yapılmıştır. Çalışılan etanol konsantrasyonlarında elde edilen Lineweaver-Burk diyagramlarının eğim ve interseptleri ile bunlardan hesaplanan K_m ve V_m değerleri sırasıyla tablo 4.20, 4.22, 4.24, 4.26, 4.28’de verilmiştir. Hesaplanan K_m ve V_m değerleri ile Lineweaver-Burk diyagramlarının intersept ve eğimlerinin ortalamaları, standart sapmaları ile birlikte tablo 4.21, 4.23, 4.25, 4.27 ve 4.29’da verilmiştir.



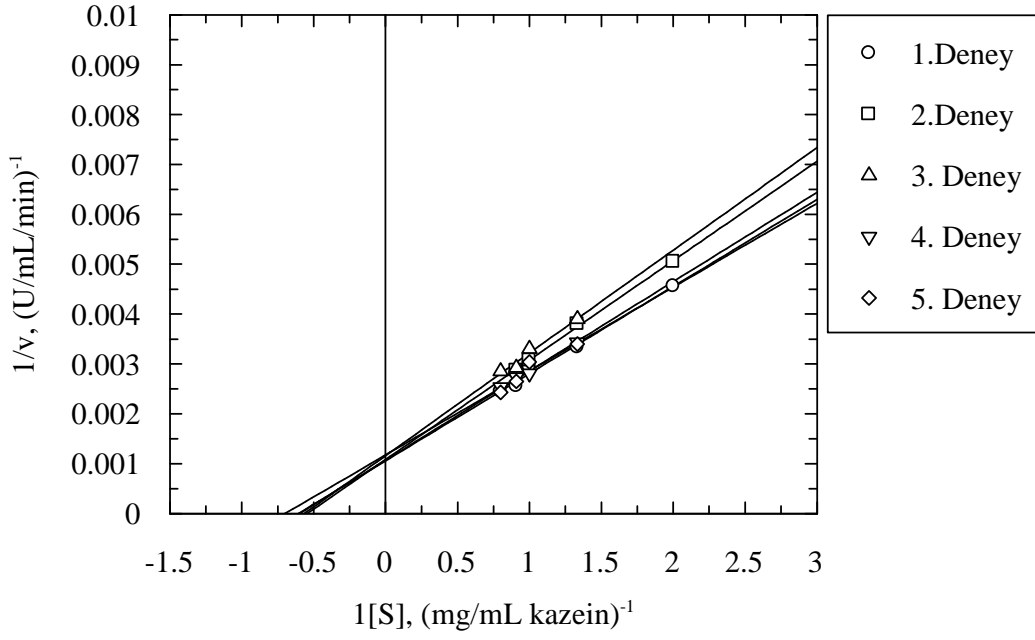
Şekil 4. 32: %10 Etanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 20: %10 Etanol varlığında enzimin Şekil 4.32’deki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00101	0.00155	1.53	990.10	5.46	0.9729
2	0.00098	0.00144	1.47	1020.41	5.63	0.9770
3	0.00108	0.00187	1.73	925.93	5.11	0.9928
4	0.00101	0.00178	1.76	990.10	5.46	0.9657
5	0.00089	0.00163	1.83	112.60	6.20	0.9925

Tablo 4. 21: %10 Etanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.67 ± 0.07
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	1010.03 ± 32.39
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	5.57 ± 0.18
İntersept	$9.94 \times 10^{-4} \pm 3.08 \times 10^{-5}$
Eğim	$1.65 \times 10^{-3} \pm 7.74 \times 10^{-5}$



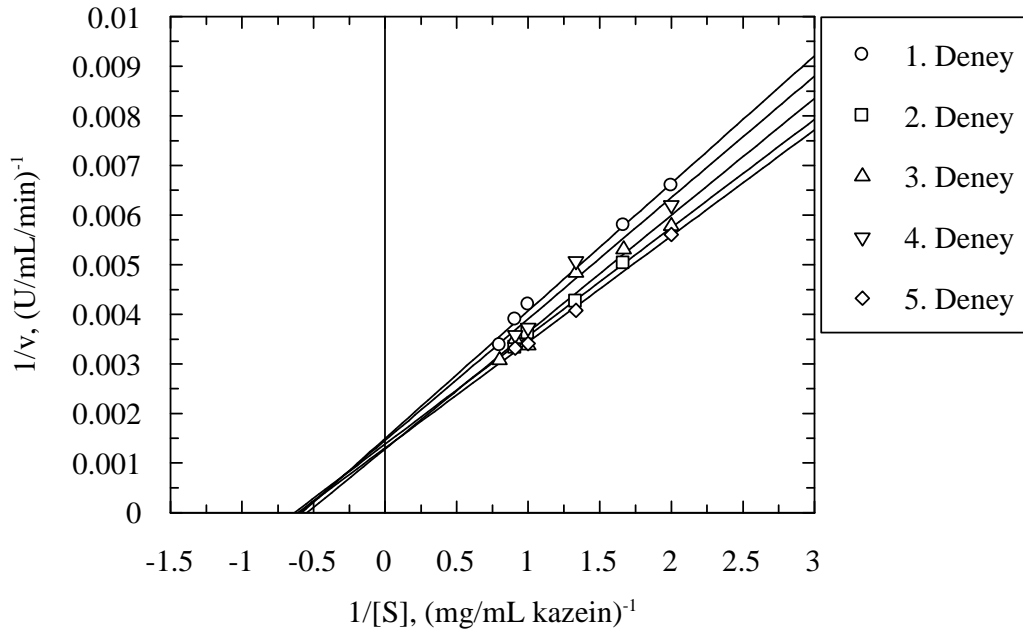
Şekil 4. 33: % 15 Etanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı

Tablo 4. 22: % 15 Etanol varlığında enzimin Şekil 4.33’deki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00106	0.00175	1.65	943.4	5.21	0.9952
2	0.00109	0.00199	1.83	917.43	5.06	0.9992
3	0.00116	0.00206	1.78	862.07	4.76	0.9848
4	0.00118	0.00168	1.42	847.46	4.68	0.9965
5	0.00107	0.00179	1.67	934.58	5.16	0.9603

Tablo 4. 23: % 15 Etanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.67 ± 0.07
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	900.99 ± 19.47
Dönüştürülen V_m (μ mol tirozin/mL/dak)	4.97 ± 0.11
İntersept	$1.12 \times 10^{-3} \pm 2.44 \times 10^{-5}$
Eğim	$1.85 \times 10^{-3} \pm 7.28 \times 10^{-5}$



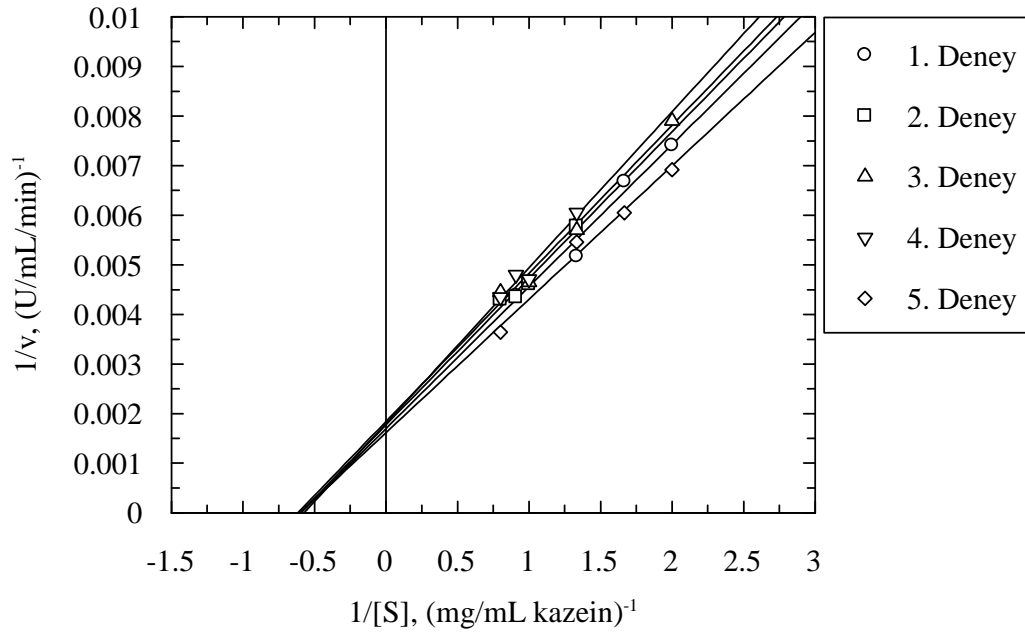
Şekil 4. 34: %20 Etanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 24: %20 Etanol varlığında enzimin Şekil 4.34’teki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ g tirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.0015	0.00257	1.71	666.67	3.68	0.9964
2	0.00138	0.00218	1.58	724.64	4.00	0.9984
3	0.00128	0.00236	1.84	781.25	4.31	0.9754
4	0.00146	0.00245	1.69	684.93	3.78	0.9728
5	0.00130	0.00214	1.65	769.23	4.24	0.9981

Tablo 4. 25: %20 Etanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.69 ± 0.04
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	725.34 ± 22.50
Dönüştürülen V_m (μ mol tirozin/mL/dak)	4.00 ± 0.12
İntersept	$1.38 \times 10^{-3} \pm 4.31 \times 10^{-5}$
Eğim	$2.34 \times 10^{-3} \pm 8.09 \times 10^{-5}$



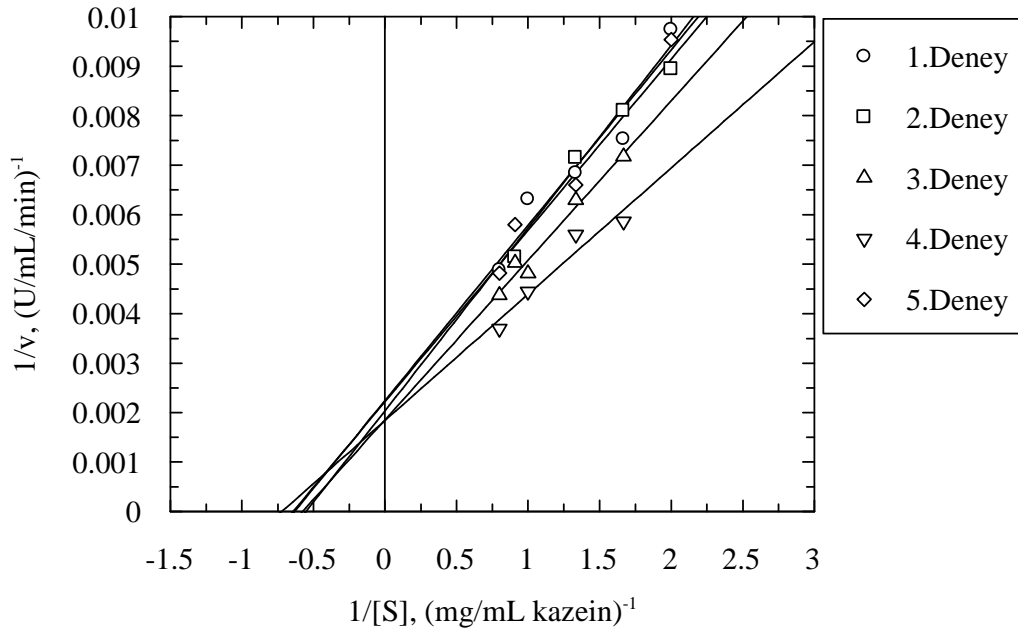
Şekil 4. 35: %25 Etanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 26: %25 Etanol varlığında enzimin Şekil 4.35’teki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.0017	0.00286	1.68	588.24	3.25	0.9874
2	0.00177	0.00295	1.67	564.97	3.12	0.9800
3	0.00184	0.00299	1.62	543.48	3.00	0.9932
4	0.0018	0.00314	1.74	555.56	3.07	0.9600
5	0.00162	0.00269	1.66	617.28	3.41	0.9921

Tablo 4. 27: %25 Etanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.68 ± 0.02
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	573.90 ± 22.50
Dönüştürülen V_m (μ mol tirozin/mL/dak)	3.17 ± 0.07
İntersept	$1.75 \times 10^{-3} \pm 3.89 \times 10^{-5}$
Eğim	$2.93 \times 10^{-3} \pm 7.43 \times 10^{-5}$



Şekil 4. 36: %30 Etanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

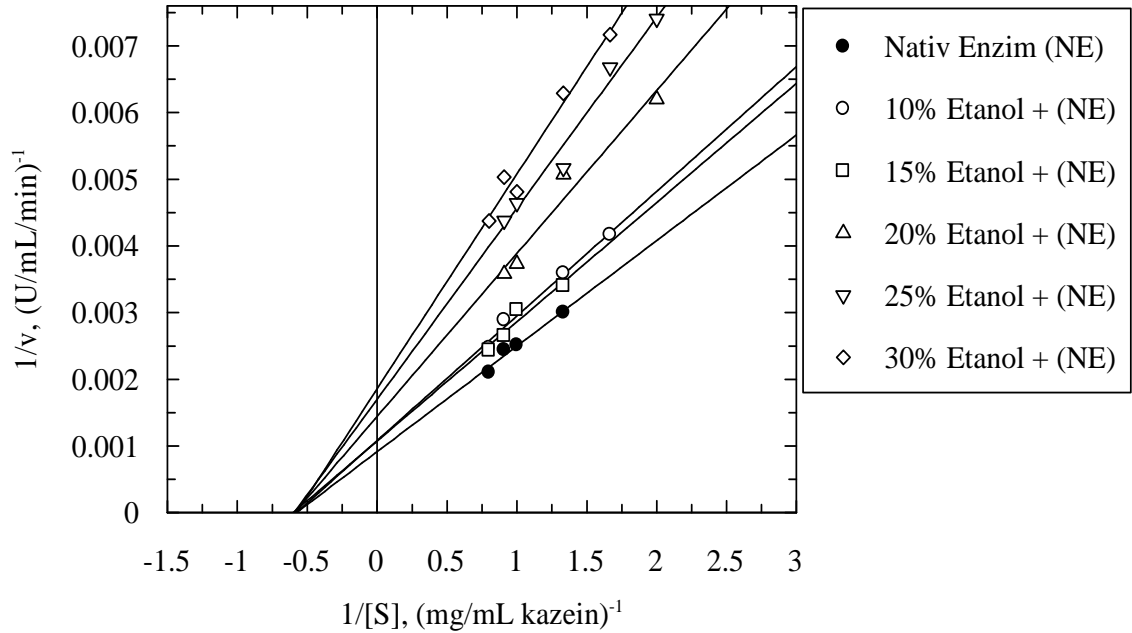
Tablo 4. 28: %30 Etanol varlığında enzimin Şekil 4.36'daki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00224	0.00354	1.58	446.43	2.46	0.9649
2	0.00222	0.00346	1.56	450.45	2.49	0.9872
3	0.00186	0.00322	1.73	537.63	2.97	0.9852
4	0.00184	0.00255	1.39	543.48	3.00	0.9634
5	0.00204	0.00369	1.81	490.20	2.70	0.9863

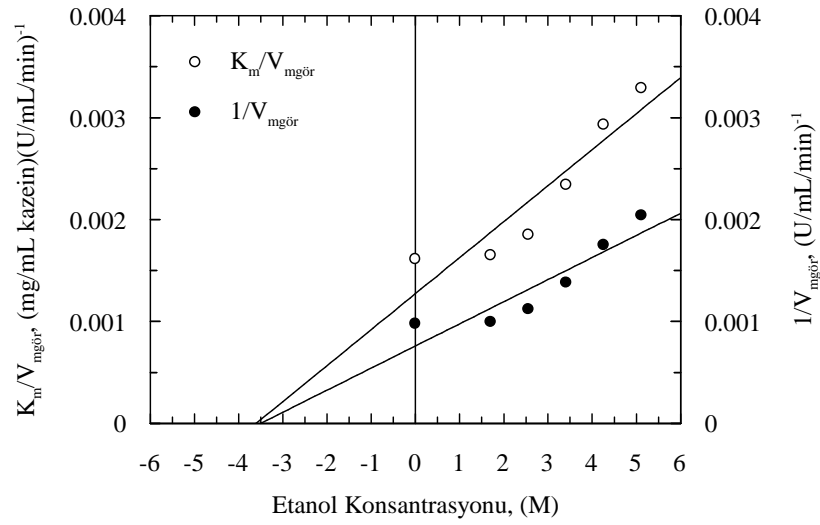
Tablo 4. 29: %30 Etanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.67 ± 0.06
V_m (μ g tirozin /mL/dak)	493.64 ± 20.65
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	2.66 ± 0.10
İntersept	$2.04 \times 10^{-3} \pm 8.51 \times 10^{-5}$
Eğim	$3.29 \times 10^{-3} \pm 2.00 \times 10^{-4}$

4.20, 4.22, 4.24, 4.26, 4.28 no'lu tablolarda ve 4.21, 4.23, 4.25, 4.27 ve 4.29 no'lu tablolarda verilen ortalama K_m değerlerine en yakın deney numaralarına ait deney seti seçilerek etanolun çalışılan tüm konsantrasyonları için Şekil 4.31'de gösterilen Lineweaver–Burk diyagramı oluşturulmuştur. Şekil 4.37'de görülen Lineweaver–Burk diyagramının etanolun alkalen proteaz üzerinde non–kompetitif tip inhibisyon oluşturduğunu göstermektedir. İnhibisyonun kısmi ya da gerçek non–kompetitif inhibisyon olduğunu görmek ve K_i inhibisyon sabitini hesaplayabilmek için Lineweaver–Burk diyagramından elde edilen intersept ve eğimler çalışılan inhibitör (organik czc) konsantrasyonuna karşı işaretilenerek Şekil 4.38'de gösterilen ikincil çizimler elde edilmiştir. İkinil izimler lineer doğrular verdiğinden etanolun artan konsantrasyonları varlığında enzimin gerçek (basit) non–kompetitif inhibisyona uğradığı belirlenmiştir. Elde edilen doğruların eğiminden, yatay ve düşey eksen üzerindeki interseptlerinden yararlanılarak K_i değeri hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 4.30'da verilmiştir.



Şekil 4. 37: Etanolün artan konsantrasyonları varlığında oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramı



Şekil 4. 38: Artan etanol konsantrasyonları varlığında Şekil 4.37'deki doğruların eğim ve interseptlerinin etanol konsantrasyonuna karşı işaretlenmesiyle oluşturulan ikincil çizim

Tablo 4. 30: Artan etanol konsantrasyonu varlığında ikincil çizimlerden yararlanılarak hesaplanan α , β ve K_i değeri

	$[I]-K_m/V_{mgör}$ $r= 0.9252$	$[I]-1/V_{mgör}$ $r= 0.9168$
İntersept	0.00127	0.00076
Eğim	0.00035	0.00022
K_i , (M)	3.63	3.46

Etanolün artan konsantrasyonları varlığında alkalen proteaz enziminin belirlenmiş kinetik parametreleri (k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri) (3.4) no'lu denklemden, termodinamik parametreleri ise (2.40), (2.41) ve (2.42) no'lu denklemlerden yararlanılarak hesaplanmış ve sırasıyla tablo 4.31 ve 4.33'de parametreler verilmiştir.

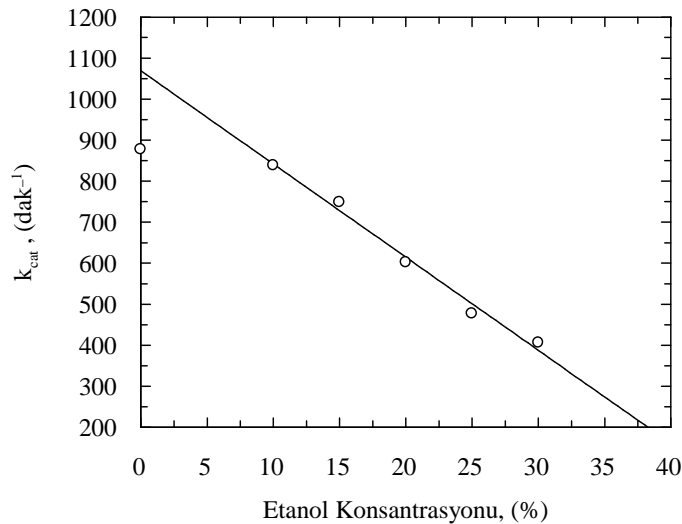
Tablo 4. 31: Artan etanol konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri

% Etanol	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ mol tirozin/mL/min)	k_{cat} (dak) ⁻¹	k_{cat}/K_m (dak) ⁻¹ (mg/mL kazein) ⁻¹
0	1.67	5.62	832.59	498.56
10	1.67	5.57	838.85	502.31
15	1.67	4.97	748.50	448.22
20	1.69	4.00	602.41	356.46
25	1.68	3.17	477.43	285.91
30	1.67	2.66	406.57	243.46

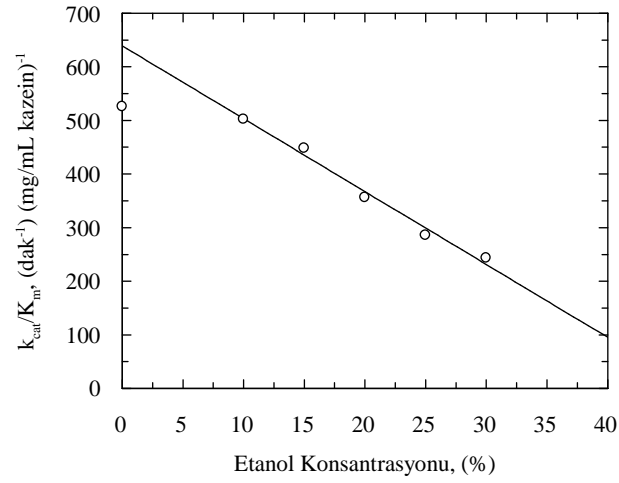
Tablo 4. 32: Artan etanol konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin termodinamik parametreleri

% Etanol	$\Delta G^\#$ (kJ/mol)	$\Delta G^\#_{E-T}$ (kJ/mol)	ΔG_{E-S} (kJ/mol)
0	67.65	-15.66	1.29
10	67.64	-15.67	1.29
15	67.92	-15.39	1.29
20	68.47	-14.84	1.32
25	69.06	-14.25	1.29
30	69.49	-13.85	1.29

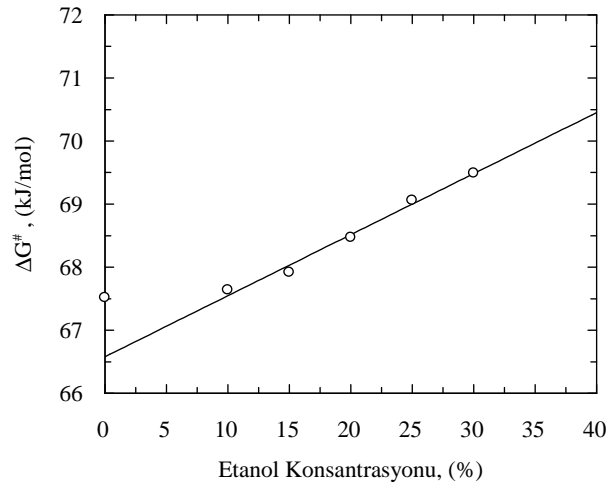
Çalışılan etanol konsantrasyonlarına karşı enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri işaretlendiğinin ve aralarında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Enzimin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin artan etanol konsantrasyonu ile lineer olarak azaldığı görülmüştür (Şekil 4.39 ve 4.40). Termodinamik parametreleri olan $\Delta G^\#$ ve $\Delta G^\#_{E-T}$ değerlerinin ise lineer olarak arttığı görülmüştür (Şekil 4.41 ve 4.42). Etanolün enzim üzerindeki gerçek non-kompetitif inhibisyon etkisi nedeniyle çalışılan etanol konsantrasyonlarında K_m değeri değişmediğinden ΔG_{E-S} değeri de değişmediği için K_m ve ΔG_{E-S} 'nin etanol konsantrasyonlarına karşı grafikleri oluşturulmamıştır.



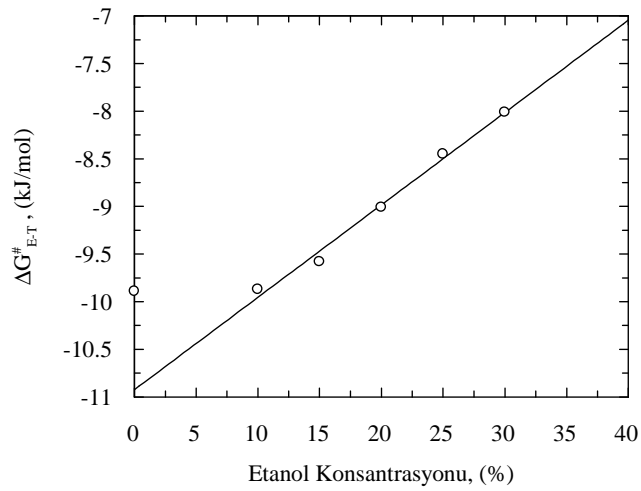
Şekil 4. 39: Alkalin proteazın k_{cat} değerinin artan etanol konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = -0.9943$)



Şekil 4. 40: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerinin artan etanol konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = -0.9934$)



Şekil 4. 41: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger değerinin artan etanol konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = 0.9942$)



Şekil 4. 42: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger_{E-T} değerinin artan etanol konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = 0.9943$)

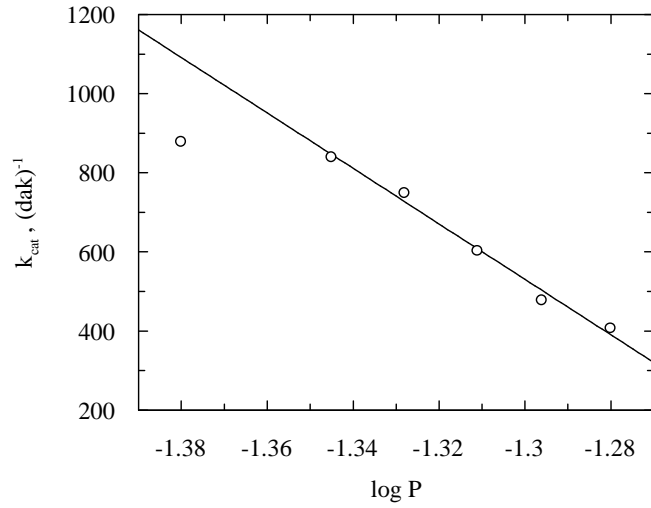
4.1.3.4.2.1 Etanol varlığında enzimatik katalizi etkileyen faktörlerin enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri ile ilişkilendirilmesi

Artan etanol konsantrasyonu ile ilişkili log P değerleri (2.43) no'lu eşitlikten yararlanılarak hesaplanmıştır. Buna göre etanolün çalışılan konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerleri tablo 4.33'te verilmiştir.

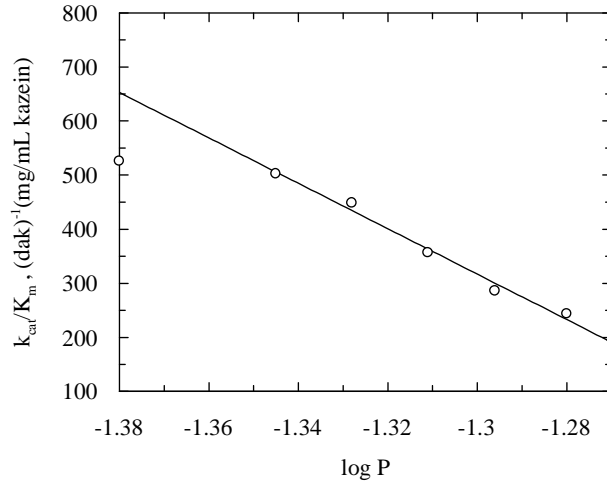
Tablo 4. 33: Artan etanol konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri

Etanol Konsantrasyonu, (%)	Log P
0	-1.380
10	-1.345
15	-1.328
20	-1.311
25	-1.296
30	-1.280

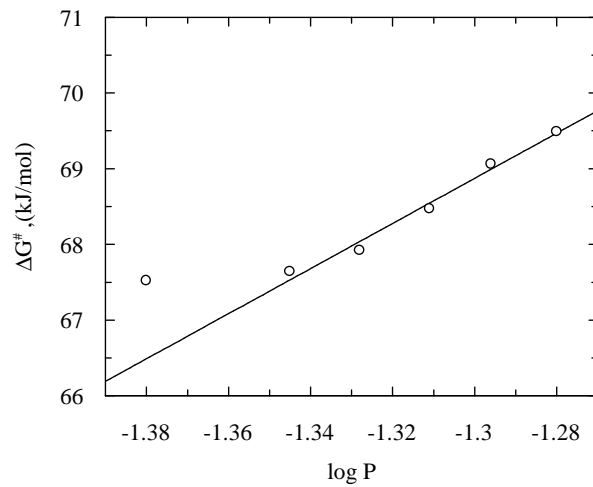
Çalışılan etanol konsantrasyonları ile ilişkili log P değerlerine karşılık gelen enzimin k_{cat} , k_{cat}/K_m , ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger değerleri arasında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Enzimin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin artan etanol konsantrasyonlarına karşılık gelen Log P değerleri ile lineer olarak azaldığı ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger değerlerinin ise lineer olarak arttığı görülmüştür (Şekil 4.43, 4.44, 4.45 ve 4.46). Etanolün enzim üzerindeki gerçek non-kompetitif inhibisyon etkisi nedeniyle enzimin çalışılan bütün etanol konsantrasyonlarında K_m değişmediğinden ΔG_{E-S} de sadece K_m değeri ile bağlantılı olduğundan K_m 'e karşı log P ve ΔG_{E-S} 'e karşı log P diyagramları oluşturulmamıştır.



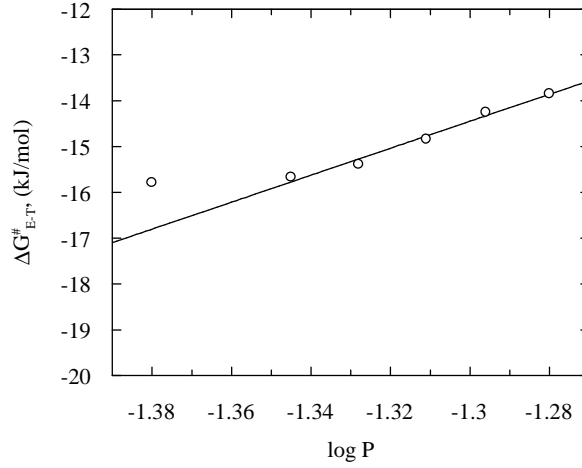
Şekil 4. 43: Alkale proteazın k_{cat} değerinin artan etanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9952$)



Şekil 4. 44: Alkale proteazın k_{cat}/K_m değerlerinin artan etanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9949$)



Şekil 4. 45: Alkale proteazın $\Delta G^\#$ değerlerinin artan etanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r = 0.9923$)



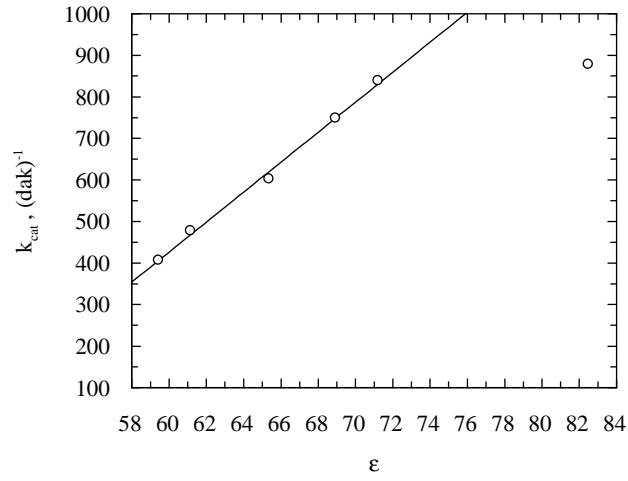
Şekil 4. 46: Alkalin proteazın $\Delta G_{E-T}^{\#}$ değerleri ile artan etanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9923$)

Etanolün artan konsantrasyonu ile ilişkili dielektrik sabitleri şekil 2.31 ve (2.7) no'lu tablodan yararlanılarak hesaplanmıştır. Buna göre çalışılan konsantrasyonlar ile ilişkili dielektrik sabitleri tablo 4.34'te verilmiştir.

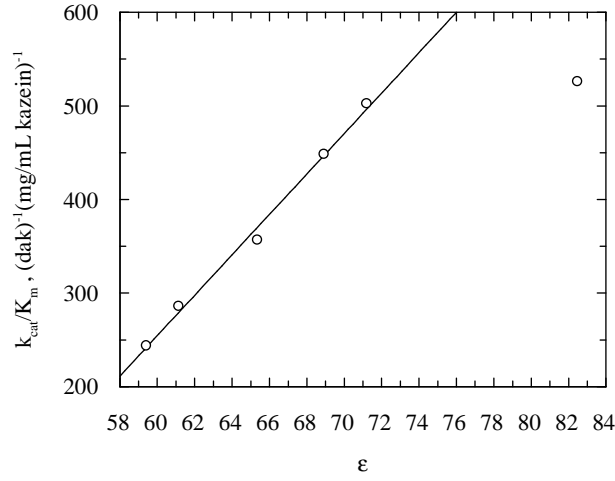
Tablo 4. 34: Artan etanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri

Etanol Konsantrasyonu, (%)	Dielektrik sabiti
0	82.49
10	71.22
15	68.93
20	65.37
25	61.15
30	59.43
100	23.48

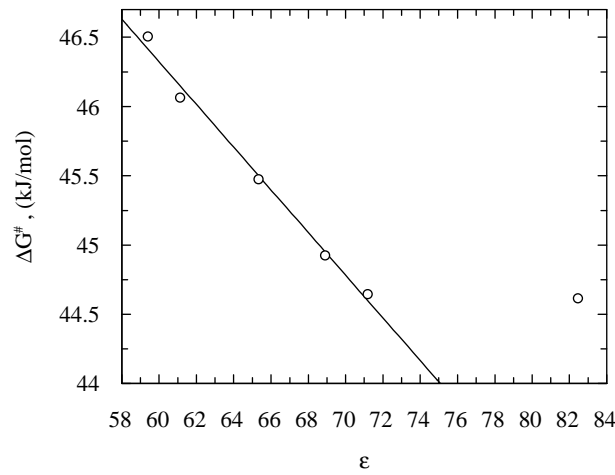
Çalışılan etanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitlerine karşılık gelen enzimin k_{cat} , k_{cat}/K_m , $\Delta G^{\#}$ ve $\Delta G_{E-T}^{\#}$ değerleri arasında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Enzimin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin artan etanol konsantrasyonlarına karşılık gelen dielektrik sabiti değerleriyle lineer olarak arttığı, $\Delta G^{\#}$ ve $\Delta G_{E-T}^{\#}$ değerlerinin ise lineer olarak azaldığı görülmüştür (Şekil 4.47, 4.48, 4.49 ve 4.50). Etanolün enzim üzerindeki gerçek non-kompetitif inhibisyon etkisi nedeniyle enzimin çalışılan bütün etanol konsantrasyonlarında K_m değeri değişmediğinden ΔG_{E-S} de sadece K_m ile bağlantılı olduğundan K_m ve ΔG_{E-S} 'in dielektrik sabitleri ile değişimi olmadığı için diyagramlar da oluşturulmamıştır.



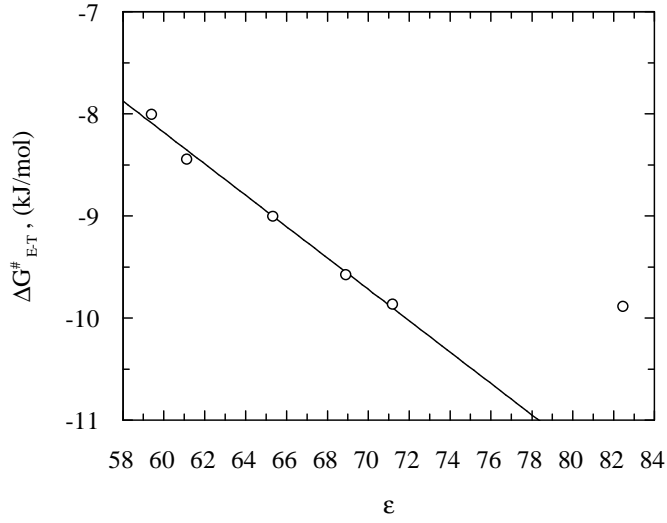
Şekil 4. 47: Alkale proteazın k_{cat} değerleri ile artan etanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9982$)



Şekil 4. 48: Alkale proteazın k_{cat}/K_m değerleri ile artan etanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9971$)



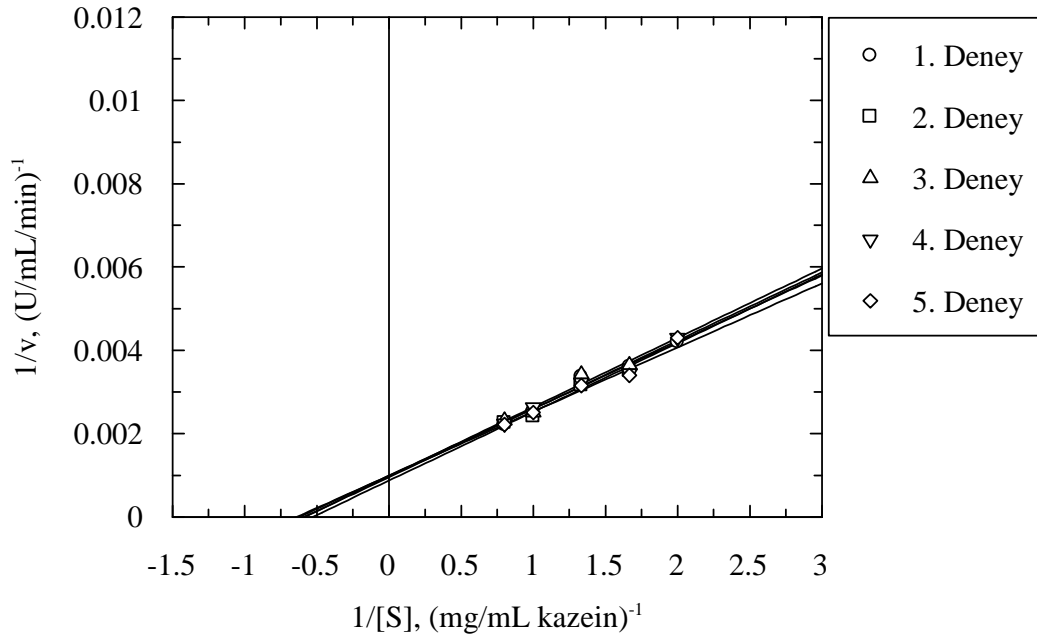
Şekil 4. 49: Alkale proteazın ΔG^\ddagger değerleri ile artan etanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9964$)



Şekil 4. 50: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-T}^{\#}$ değerleri ile artan etanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9963$)

4.1.3.4.3 n-propanol varlığında enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

n-propanol için %5, 10, 12.5 15 ve %20 konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Çalışılan konsantrasyonlarda enzimin kinetik parametrelerini belirlemek için oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramları şekil 4.51, 4.52, 4.53, 4.54 ve 4.55’te gösterilmiştir. Kinetik parametrelerin belirlenmesinde başlangıç hızı ölçümleri Folin-Ciocalteu reaktifi içeren yöntemle yapılmıştır. Çalışılan n-propanol konsantrasyonlarında elde edilen Lineweaver-Burk diyagramlarının eğimleri ve interseptleri ile bunlardan hesaplanan K_m ve V_m değerleri sırasıyla tablo 4.35, 4.37, 4.39, 4.41, 4.43’te verilmiştir. Hesaplanan K_m ve V_m değerleri ile Lineweaver-Burk diyagramlarının intersept ve eğimlerinin ortalamaları, standart sapmaları ile birlikte tablo 4.36, 4.38, 4.40, 4.42 ve 4.44’te verilmiştir.



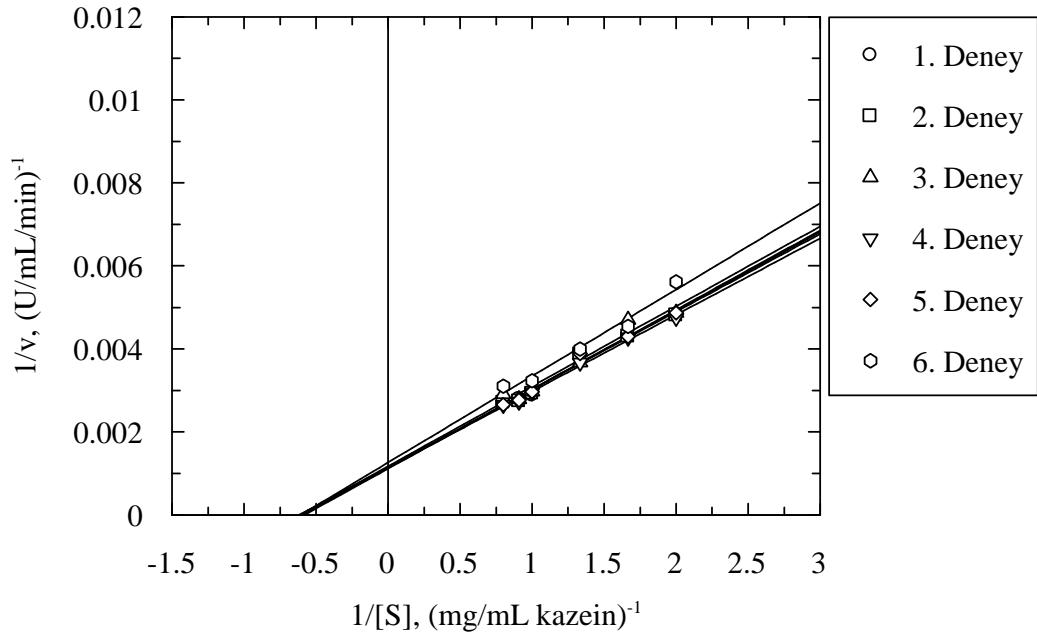
Şekil 4. 51: %5 n-propanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 35: %5 n-propanol varlığında enzimin Şekil 4.51’deki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00096	0.00164	1.71	1041.67	5.75	0.9873
2	0.00099	0.00154	1.56	1010.1	5.57	0.986
3	0.00098	0.00166	1.69	1020.41	5.63	0.9683
4	0.00100	0.00160	1.60	1000.00	5.52	0.9864
5	0.00087	0.00165	1.89	1149.43	6.34	0.9859

Tablo 4. 36: %5 n-propanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.69 ± 0.06
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	1044.32 ± 27.17
Dönüştürülen V_m (μ mol tirozin/mL/dak)	5.61 ± 0.15
İntersept	$9.60 \times 10^{-4} \pm 2.34 \times 10^{-5}$
Eğim	$1.62 \times 10^{-3} \pm 2.20 \times 10^{-5}$



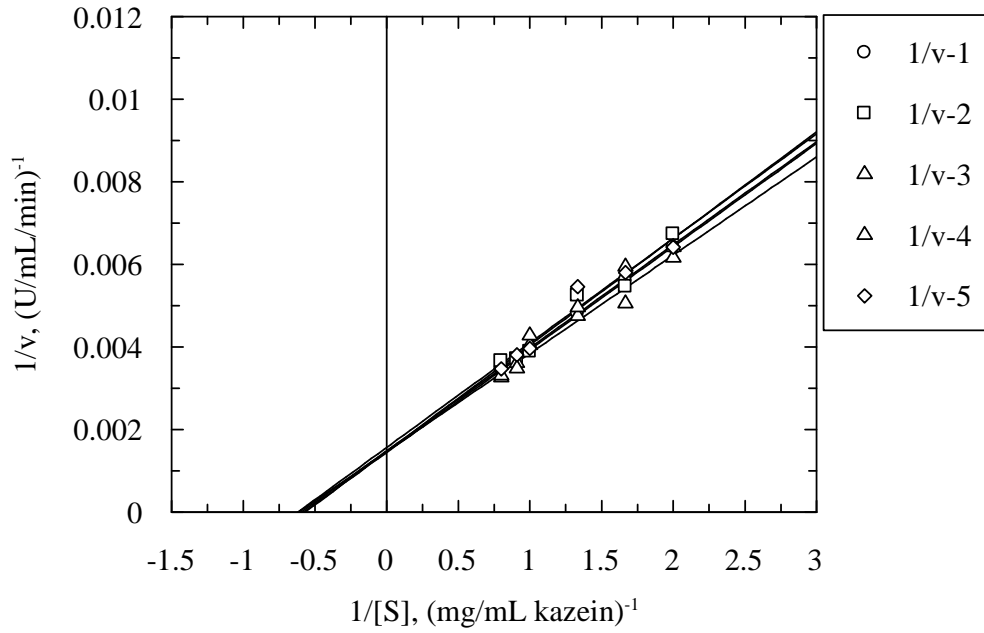
Şekil 4. 52: % 10 n-propanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 37: % 10 n-propanol varlığında enzimin Şekil 4.52’deki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ g tirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00114	0.00189	1.66	877.19	4.84	0.9874
2	0.00116	0.00187	1.61	862.07	4.76	0.9896
3	0.00118	0.00193	1.64	847.46	4.68	0.9766
4	0.00114	0.00184	1.61	877.19	4.84	0.9819
5	0.00112	0.00191	1.71	892.86	4.93	0.9967
6	0.00127	0.00208	1.64	787.40	4.35	0.9859

Tablo 4. 38: % 10 n-propanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.65 ± 0.04
V_m (μ g tirozin /mL/dak)	857.36 ± 15.34
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	4.73 ± 0.20
İntersept	$1.17 \times 10^{-3} \pm 2.20 \times 10^{-5}$
Eğim	$1.92 \times 10^{-3} \pm 3.44 \times 10^{-5}$



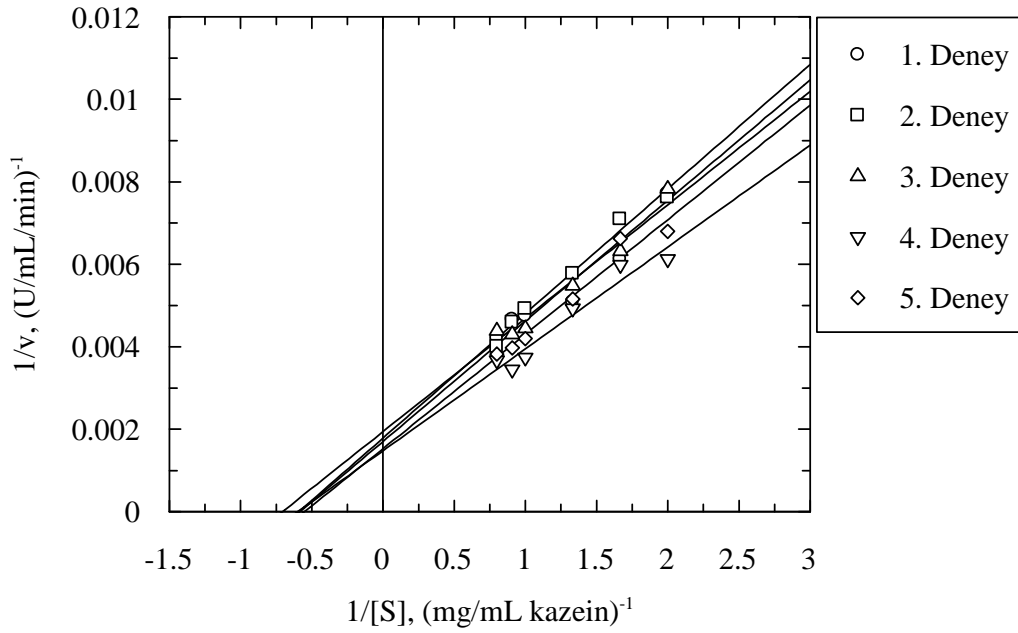
Şekil 4. 53: % 12.5 n-propanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 39: % 12.5 n-propanol varlığında enzimin Şekil 4.53’deki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00144	0.0025	1.74	694.44	3.83	0.9996
2	0.00147	0.00258	1.76	680.27	3.75	0.9819
3	0.00146	0.00238	1.63	684.93	3.78	0.9811
4	0.00148	0.0025	1.69	675.68	3.73	0.9726
5	0.00157	0.00253	1.61	636.94	3.51	0.9762

Tablo 4. 40: % 12.5 n-propanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.68 ± 0.03
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	674.45 ± 9.02
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	3.72 ± 0.05
İntersept	$1.45 \times 10^{-3} \pm 2.25 \times 10^{-5}$
Eğim	$2.45 \times 10^{-3} \pm 3.29 \times 10^{-5}$



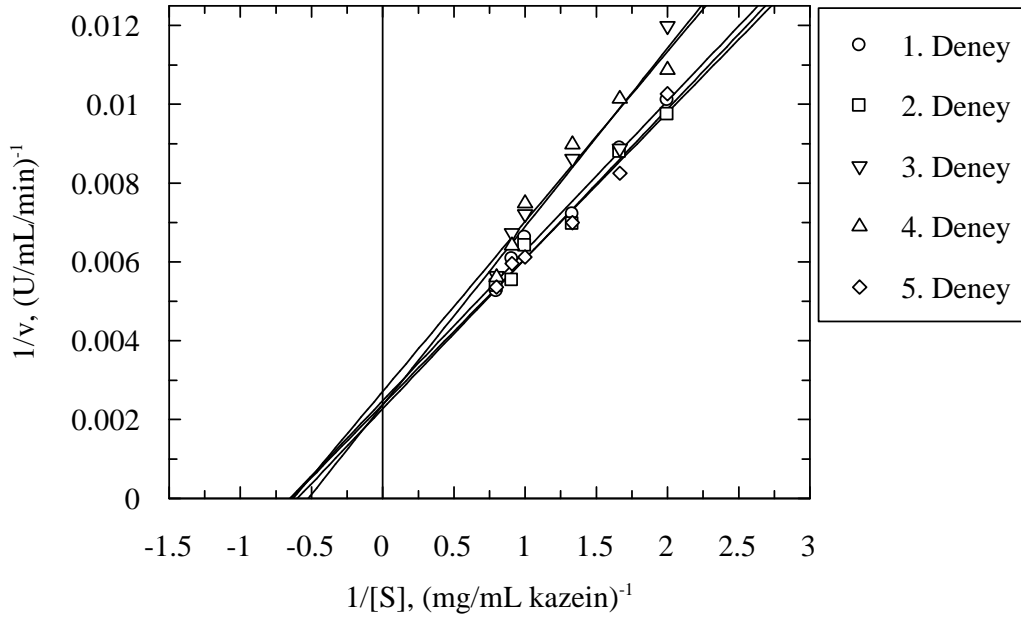
Şekil 4. 54: % 15 n-propanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 41: % 15 n-propanol varlığında enzimin Şekil 4.54’teki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00194	0.00275	1.42	515.46	2.84	0.976
2	0.00179	0.00302	1.69	558.66	3.08	0.9917
3	0.00170	0.00292	1.72	588.24	3.25	0.9838
4	0.00148	0.00247	1.67	675.68	3.73	0.9699
5	0.00153	0.00278	1.82	653.59	3.61	0.9815

Tablo 4. 42: % 15 n-propanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.66 ± 0.07
V_m (μ g tirozin /mL/dak)	598.33 ± 27.06
Dönüştürülen V_m (μ mol tirozin/mL/dak)	3.30 ± 0.16
İntersept	$1.69 \times 10^{-3} \pm 8.43 \times 10^{-5}$
Eğim	$2.79 \times 10^{-3} \pm 9.32 \times 10^{-5}$



Şekil 4. 55: %20 n-propanol varlığında alkalin proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

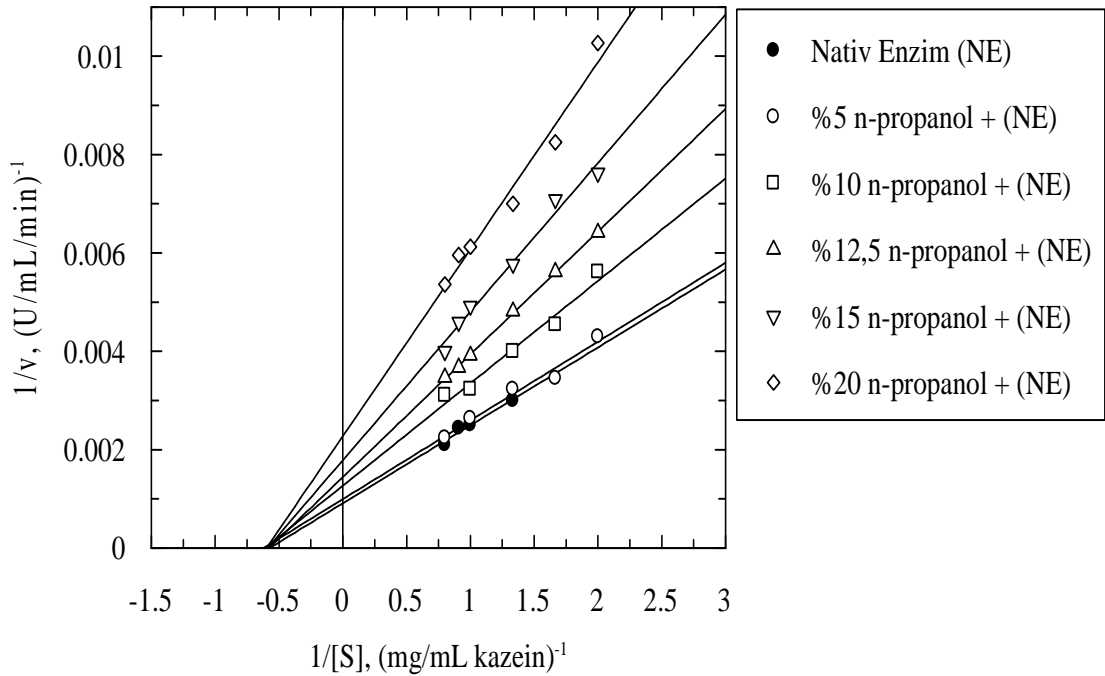
Tablo 4. 43: 20% n-propanol varlığında enzimin Şekil 4.55’teki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00227	0.00382	1.68	440.53	2.43	0.9815
2	0.00248	0.00380	1.53	403.23	2.22	0.9902
3	0.00238	0.00370	1.55	420.17	2.31	0.9893
4	0.00236	0.00453	1.92	423.73	2.34	0.9643
5	0.00271	0.00431	1.59	369.00	2.04	0.9744

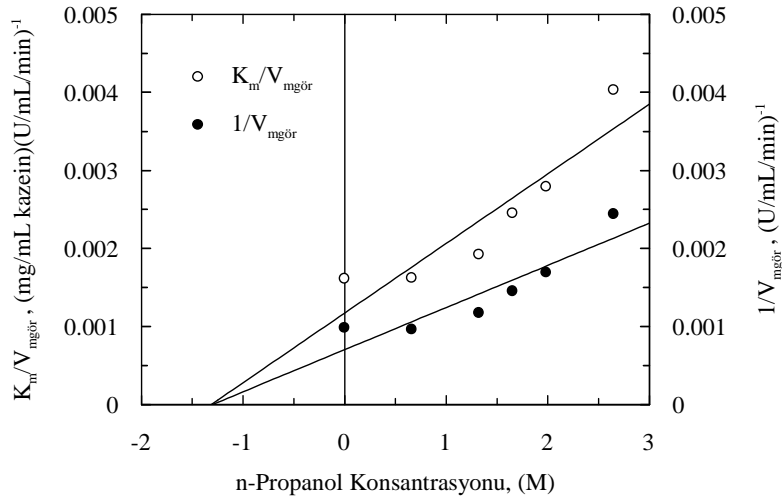
Tablo 4. 44: 20% n-propanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.66 ± 0.07
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	411.33 ± 11.07
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	2.27 ± 0.07
İntersept	$2.44 \times 10^{-3} \pm 7.53 \times 10^{-5}$
Eğim	$4.03 \times 10^{-3} \pm 1.63 \times 10^{-4}$

4.35, 4.37, 4.39, 4.41 ve 4.43 no'lu tablolarında ve 4.36, 4.38, 4.40, 4.42 ve 4.44 no'lu tablolarında verilen ortalama K_m değerlerine en yakın deney numaralarına ait deney seti seçilerek n-propanolün çalışılan tüm konsantrasyonları için şekil 4.56'da gösterilen Lineweaver-Burk diyagramı oluşturulmuştur. Şekil 4.56'da n-propanolün artan konsantrasyonları varlığında çizilen Lineweaver–Burk diyagramı, n-propanolün alkalen proteaz üzerinde non–kompetitif tip inhibisyon oluşturduğunu göstermektedir. İnhibisyonun kısmi ya da gerçek non–kompetitif inhibisyon olduğunu görmek ve K_i inhibisyon sabitini hesaplayabilmek için Lineweaver–Burk diyagramından elde edilen intersept ve eğimler çalışılan inhibitör (n-propanol) konsantrasyonuna karşı işaretlenerek Şekil 4.57'de gösterilen ikincil çizimler elde edilmiştir. İkincil çizimlerden elde edilen lineer doğrular n-propanolün artan konsantrasyonları varlığında enzimin gerçek (basit) non–kompetitif inhibisyona uğradığını göstermiştir. Elde edilen doğruların eğiminden, yatay ve dikey eksen üzerindeki interseptlerinden yararlanılarak K_i değeri hesaplanmış ve sonuçlar 4.45'te verilmiştir.



Şekil 4. 56: n-propanolün artan konsantrasyonları varlığında oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramı



Şekil 4. 57: Artan n-propanol konsantrasyonları varlığında Şekil 4.56'daki doğruların eğim ve interseptlerinin n-propanol konsantrasyonuna karşı işaretlenmesiyle oluşturulan ikincil çizim

Tablo 4. 45: Artan n-propanol konsantrasyonu varlığında ikincil çizimlerden yararlanılarak hesaplanan α , β ve K_i değeri

	[I]- $K_m/V_{mgör}$ $r= 0.9135$	[I]- $1/V_{mgör}$ $r= 0.9100$
İntersept	0.00117	0.00070
Eğim	0.00089	0.00054
K_i (M)	1.31	1.30

n-propanolün artan konsantrasyonları varlığında alkalen proteaz enziminin belirlenmiş kinetik parametreleri (k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri) (3.4) no'lu denklemden, termodinamik parametreleri ise (2.40), (2.41) ve (2.42) no'lu denklemlerden yararlanılarak hesaplanmış ve sırasıyla tablo 4.46 ve 4.47'de verilmiştir.

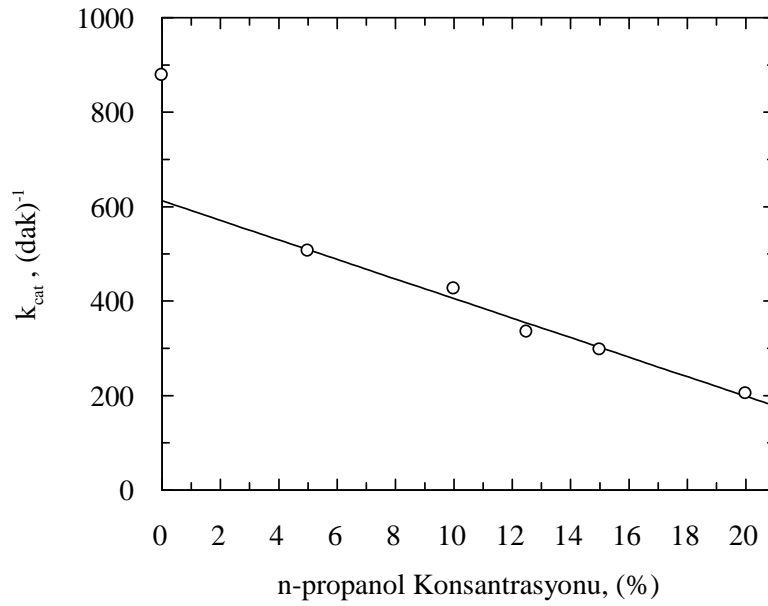
Tablo 4. 46: Artan n-propanol konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri

% n-propanol	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ mol tirozin/mL/min)	k_{cat} (dak) ⁻¹	k_{cat}/K_m (dak) ⁻¹ (mg/mL kazein) ⁻¹
0	1.67	5.62	832.59	498.56
5	1.69	5.61	506.31	299.59
10	1.68	4.73	426.13	252.46
12.5	1.68	3.72	335.12	199.48
15	1.66	3.30	297.29	179.09
20	1.66	2.27	204.52	123.20

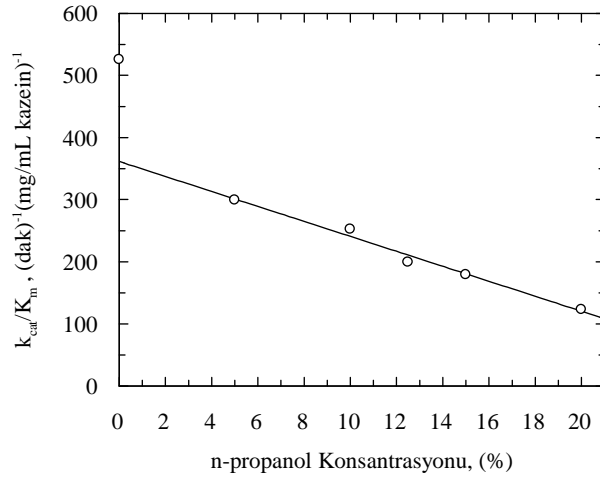
Tablo 4. 47: Artan n-propanol konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin termodinamik parametreleri

% n-propanol	$\Delta G^\#$ (kJ/mol)	$\Delta G_{E-T}^\#$ (kJ/mol)	ΔG_{E-S} (kJ/mol)
0	67.65	-15.66	1.29
5	68.91	-14.40	1.32
10	69.34	-13.96	1.31
12.5	69.95	-13.36	1.31
15	70.25	-13.06	1.28
20	71.19	-12.12	1.28

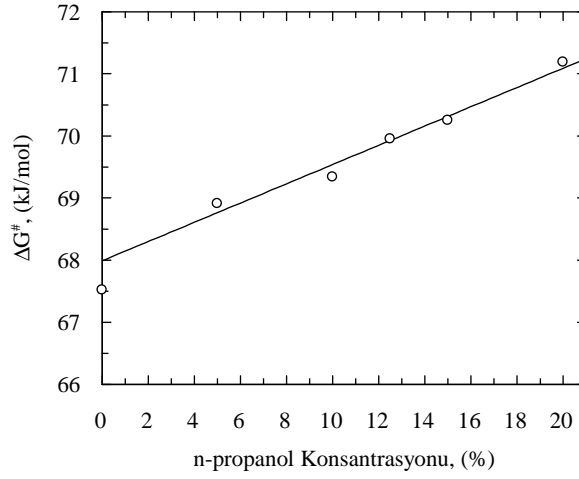
Çalışılan n-propanol konsantrasyonlarına karşı enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri işaretlendiği ve aralarında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Enzimin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin artan n-propanol konsantrasyonu ile lineer olarak azaldığı; termodinamik parametreler olan $\Delta G^\#$ ve $\Delta G_{E-T}^\#$ değerlerinin ise lineer olarak arttığı görülmüştür (Şekil 4.58, 4.59, 4.60 ve 4.61). n-propanolün enzim üzerindeki gerçek non-kompetitif inhibisyon etkisi nedeniyle çalışılan n-propanol konsantrasyonlarında K_m değişmediğinden ΔG_{E-S} değeri de değişmediği K_m ve ΔG_{E-S} 'in n-propanol konsantrasyonlarına karşı grafikleri oluşturulmamıştır.



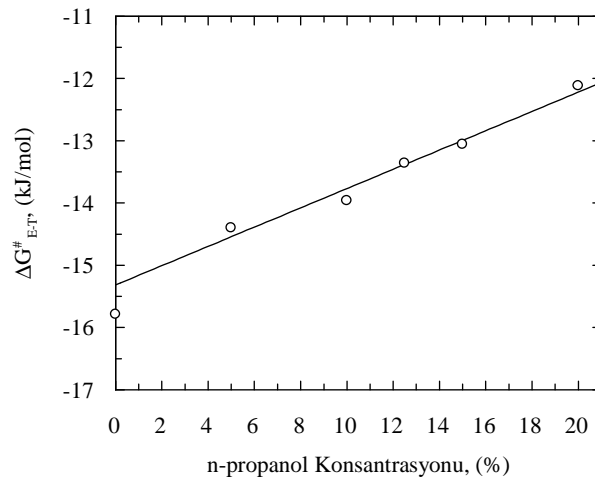
Şekil 4. 58: Alkalin proteazın k_{cat} değerinin artan n-propanol konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = -0.9922$)



Şekil 4. 59: Alkale proteazın k_{cat}/K_m değerlerinin artan n-propanol konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = -0.9918$)



Şekil 4. 60: Alkale proteazın ΔG^\ddagger değerlerinin artan n-propanol konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = 0.9876$)



Şekil 4. 61: Alkale proteazın ΔG^\ddagger_{E-T} değerlerinin artan n-propanol konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = 0.9882$)

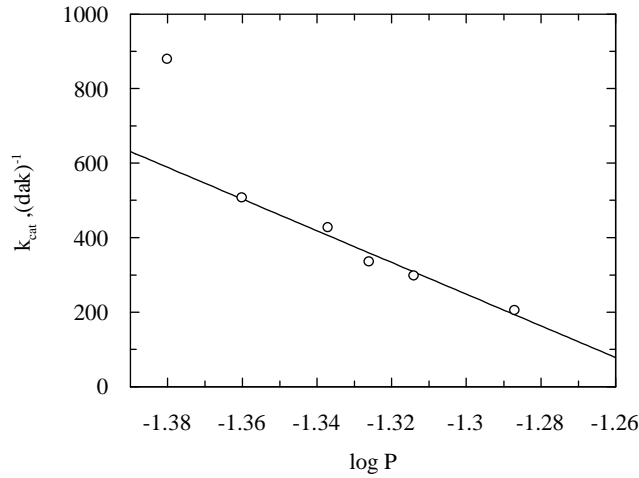
4.1.3.4.3.1 n-propanol varlığında enzimatik katalizi etkileyen faktörlerin enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri ile ilişkilendirilmesi

Artan n-propanol konsantrasyonu ile ilişkili log P değerleri (2.43) no'lu eşitlikten yararlanılarak hesaplanmıştır. Buna göre n-propanol çalışılan konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerleri tablo 4.48'de verilmiştir.

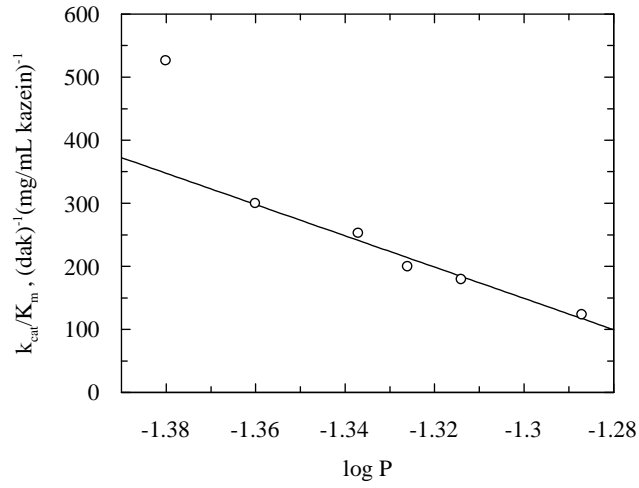
Tablo 4. 48: Artan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri

n-propanol Konsantrasyonu, (%)	Log P
0	-1.380
5	-1.360
10	-1.337
12.5	-1.326
15	-1.314
20	-1.287

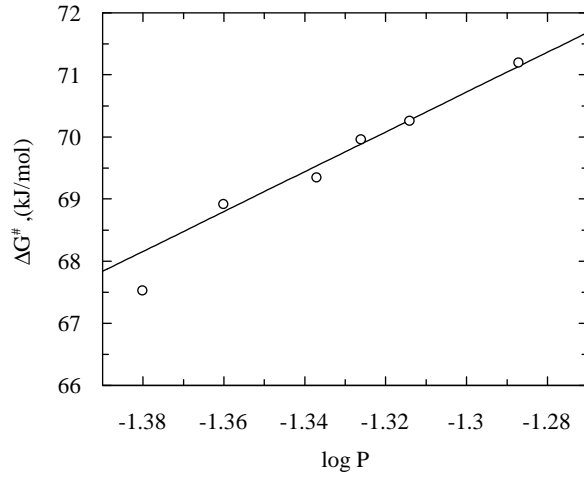
Çalışılan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili log P değerlerine karşılık gelen enzimin k_{cat} , k_{cat}/K_m , ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger değerleri arasında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Enzimin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin artan n-propanol konsantrasyonlarına karşılık gelen log P değerleriyle lineer olarak azaldığı, ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger değerlerinin ise lineer olarak arttığı görülmüştür (Şekil 4.62, 4.63, 4.64, 4.65). n-propanolün enzim üzerindeki gerçek non-kompetitif inhibisyon etkisi nedeniyle enzimin çalışılan bütün n-propanol konsantrasyonlarında K_m değeri değişmediğinden ΔG_{E-S} 'de sadece K_m ile bağlantılı olduğundan ΔG_{E-S} ve K_m 'e karşı log P diyagramları oluşturulmamıştır.



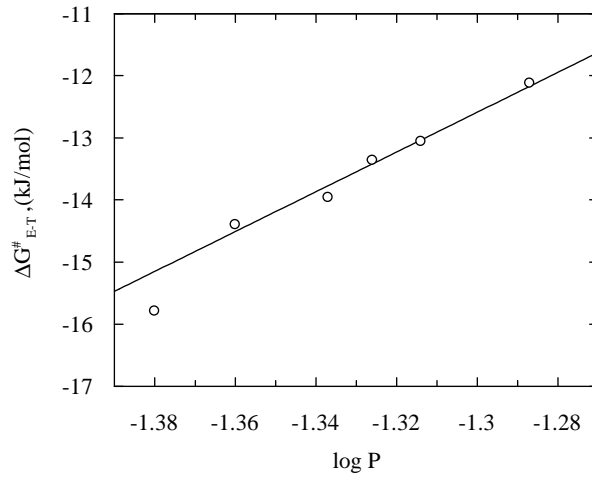
Şekil 4. 62: Alkalen proteazın k_{cat} değerinin artan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9886$)



Şekil 4. 63: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerinin artan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9884$)



Şekil 4. 64: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger değerinin artan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r = 0.9906$)



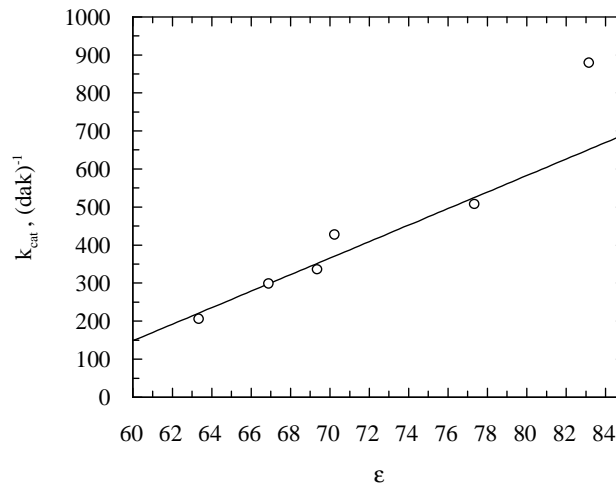
Şekil 4. 65: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger_{E-T} değerinin artan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9905$)

n-propanolün artan konsantrasyonu ile ilişkili dielektrik sabitleri şekil 2.32 ve (2.8) no'lu tablodan yararlanılarak hesaplanmıştır. Buna göre çalışılan konsantrasyonlar ile ilişkili dielektrik sabitleri tablo 4.49'da verilmiştir.

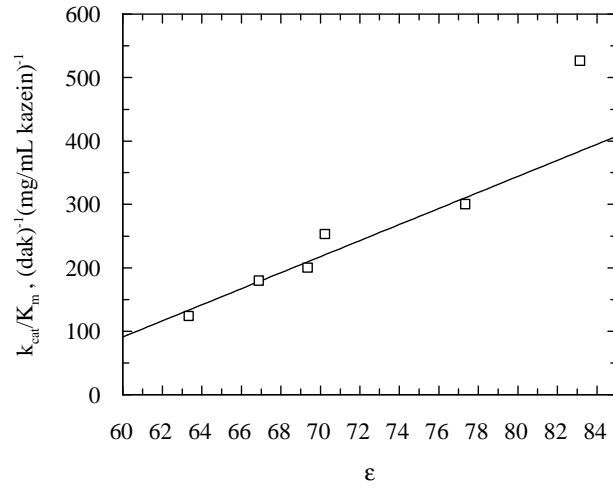
Tablo 4. 49: Artan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri

n-propanol Konsantrasyonu, (%)	Dielektrik sabit
0	83.18
5	77.36
10	70.26
12.5	69.38
15	66.91
20	63.37
100	19.57

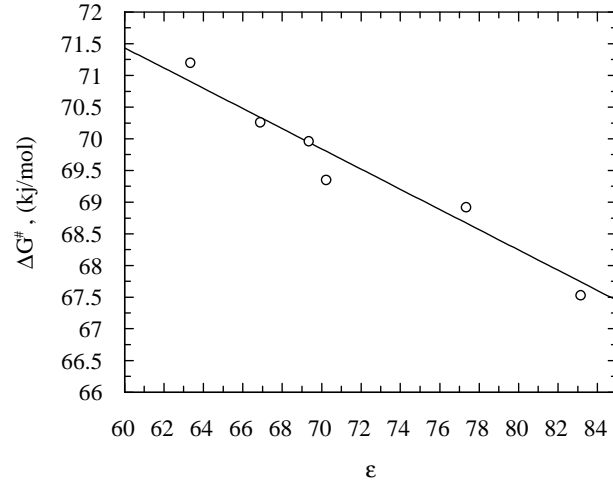
Çalışılan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitlerine karşılık gelen enzimin k_{cat} , k_{cat}/K_m , ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger ve ΔG_{E-S} değerleri arasında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. ve aralarında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Enzimin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin artan n-propanol konsantrasyonlarına karşılık gelen dielektrik sabiti değerleriyle lineer olarak arttığı, ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger değerlerinin ise lineer olarak azaldığı görülmüştür (Şekil 4.66, 4.67, 4.68, 4.69). n-propanolün enzim üzerindeki gerçek non-kompetitif inhibisyon etkisi nedeniyle enzimin çalışılan bütün n-propanol konsantrasyonlarında K_m değeri değişmediğinden ΔG_{E-S} 'de sadece K_m ile bağlantılı olduğundan ΔG_{E-S} ve K_m 'e karşı dielektrik sabiti diyagramları oluşturulmamıştır



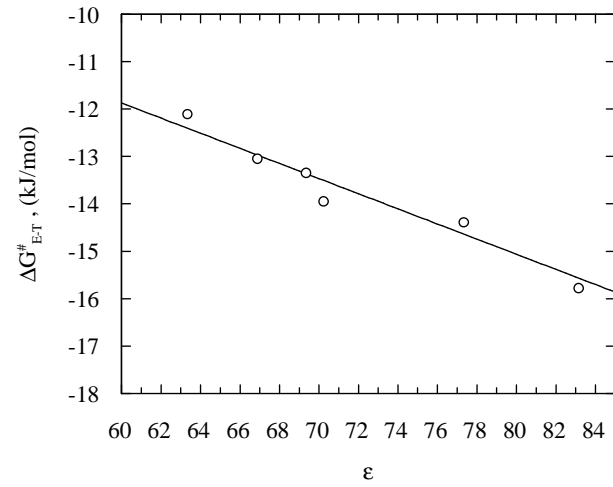
Şekil 4. 66: Alkalen proteazın k_{cat} değerleri ile artan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9628$)



Şekil 4. 67: Alkalin proteazın k_{cat}/K_m değerleri ile artan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9630$)



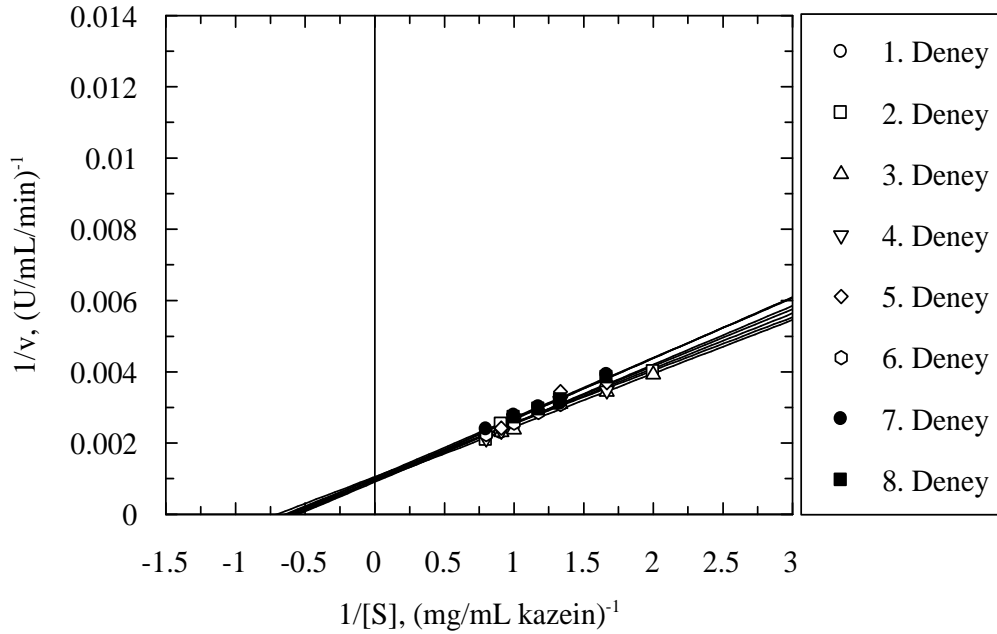
Şekil 4. 68: Alkalin proteazın $\Delta G^\#$ değerleri ile artan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9393$)



Şekil 4. 69: Alkalin proteazın $\Delta G^\#_{E-T}$ değerleri ile artan n-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9407$)

4.1.3.4.4 i-propanol varlığında enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

i-propanol için %10, 15, 20, 25 ve %30 konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Çalışılan konsantrasyonlarda enzimin kinetik parametrelerini belirlemek için oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramları şekil 4.70, 4.71, 4.72, 4.73 ve 4.74’te gösterilmiştir. Kinetik parametrelerin belirlenmesinde başlangıç hızı ölçümleri Folin-Ciocalteu reaktifi içeren yöntem ile yapılmıştır. Çalışılan i-propanol konsantrasyonlarında elde edilen Lineweaver-Burk diyagramlarının eğimleri ve interseptleri ile bunlardan hesaplanan K_m ve V_m değerleri sırasıyla tablo 4.50, 4.52, 4.54, 4.56, 4.58’de verilmiştir. Hesaplanan K_m ve V_m değerleri ile Lineweaver-Burk diyagramlarının intersept ve eğimlerinin ortalamaları, standart sapmaları ile birlikte tablo 4.51, 4.53, 4.55, 4.57 ve 4.59’da verilmiştir.



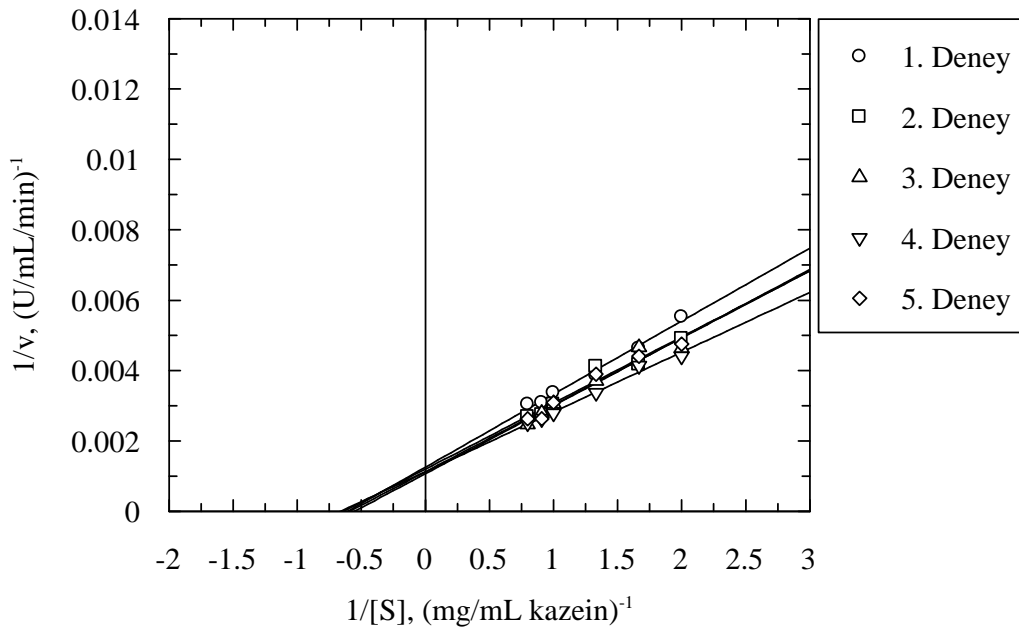
Şekil 4. 70: %10 i-propanol varlığında alkalin proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 50: % 10 i-propanol varlığında enzimin Şekil 4.70'teki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00091	0.00165	1.81	1098.90	6.07	0.9812
2	0.00105	0.00149	1.42	952.38	5.26	0.9760
3	0.00095	0.00150	1.58	1052.63	5.81	0.9896
4	0.00100	0.00155	1.55	1000.00	5.52	0.9929
5	0.00095	0.00171	1.80	1052.63	5.81	0.9793
6	0.00096	0.00160	1.67	1041.67	5.75	0.9995
7	0.00103	0.00168	1.63	970.87	5.36	0.9848
8	0.00098	0.00170	1.73	1020.41	5.63	0.9966

Tablo 4. 51: %10 i-propanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.65 ± 0.05
V_m (μ g tirozin /mL/dak)	1023.69 ± 47.69
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	5.64 ± 0.09
İntersept	$9.79 \times 10^{-4} \pm 2.14 \times 10^{-5}$
Eğim	$1.61 \times 10^{-3} \pm 3.13 \times 10^{-5}$



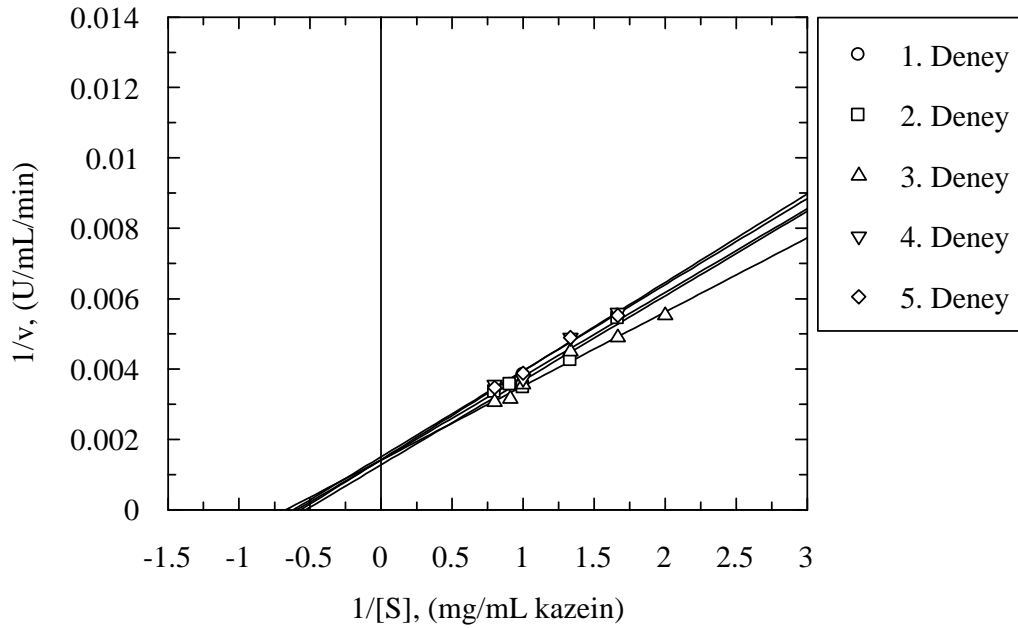
Şekil 4. 71: %15 i-propanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı

Tablo 4. 52: %15 i-propanol varlığında enzimin Şekil 4.71'deki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	r
1	0.00125	0.00208	1.66	800.00	4.41	0.9931
2	0.00120	0.00188	1.57	833.33	4.60	0.9723
3	0.00107	0.00193	1.80	934.58	5.16	0.9710
4	0.00113	0.00170	1.50	884.96	4.88	0.9923
5	0.00112	0.00190	1.69	892.86	4.93	0.9812

Tablo 4. 53: %15 i-propanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.65 ± 0.05
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	869.15 ± 52.81
Dönüştürülen V_m , (μ moltirozin/mL/dak)	5.69 ± 0.13
İntersept	$1.15 \times 10^{-3} \pm 2.51 \times 10^{-5}$
Eğim	$1.90 \times 10^{-3} \pm 4.80 \times 10^{-5}$



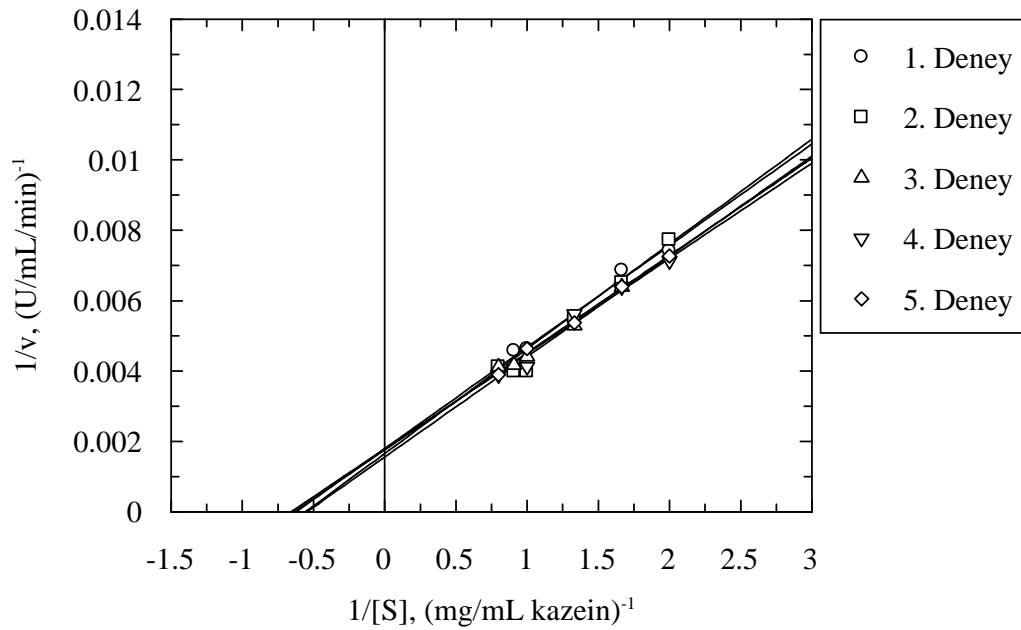
Şekil 4. 72: %20 i-propanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı

Tablo 4. 54: %20 i-propanol varlığında enzimin Şekil 4.72'deki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ g tirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00141	0.00238	1.69	709.22	3.91	0.9858
2	0.00128	0.0024	1.88	781.25	4.31	0.9753
3	0.00141	0.0021	1.49	709.22	3.91	0.988
4	0.00143	0.00252	1.76	699.3	3.86	0.9868
5	0.00151	0.00245	1.62	662.25	3.65	0.9948

Tablo 4. 55: %20 i-propanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.69 ± 0.06
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	712.25 ± 43.15
Dönüştürülen V_m , (μ mol tirozin/mL/dak)	3.93 ± 0.11
İntersept	$1.41 \times 10^{-3} \pm 3.69 \times 10^{-5}$
Eğim	$2.37 \times 10^{-3} \pm 7.17 \times 10^{-5}$



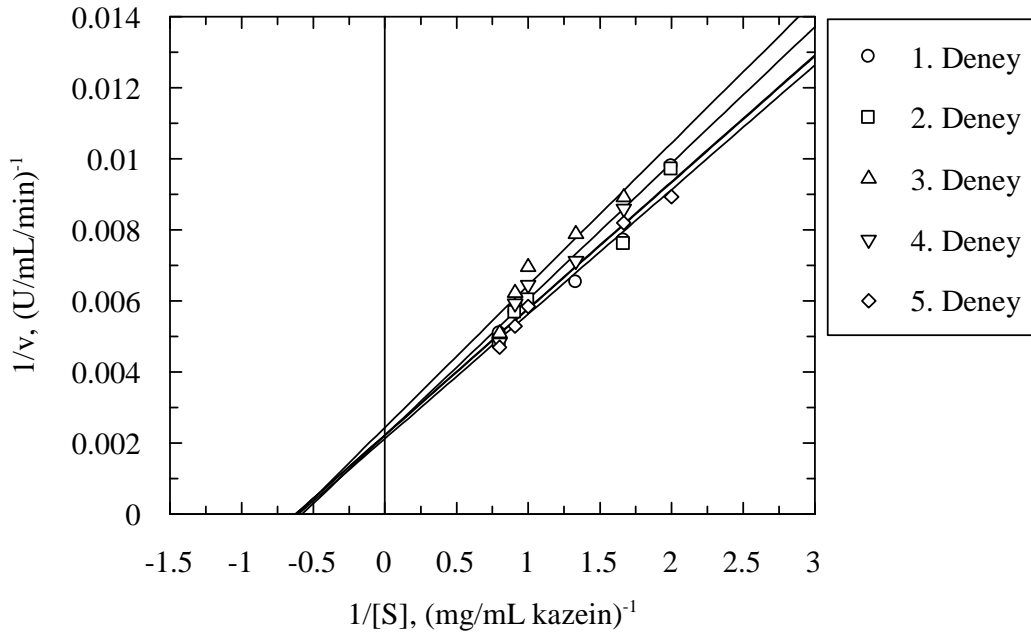
Şekil 4. 73: %25 i-propanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı

Tablo 4. 56: %25 i-propanol varlığında enzimin Şekil 4.73'teki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/min)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.0018	0.00289	1.61	555.56	3.07	0.9923
2	0.00166	0.00298	1.79	602.41	3.32	0.9970
3	0.00178	0.00271	1.52	561.80	3.10	0.9919
4	0.00156	0.00285	1.83	641.03	3.54	0.9889
5	0.00176	0.00276	1.32	568.18	3.14	0.9952

Tablo 4. 57: 25% i-propanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.66 ± 0.06
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	585.79 ± 35.80
Dönüştürülen V_m (μ mol tirozin/mL/dak)	3.23 ± 0.09
İntersept	$1.71 \times 10^{-3} \pm 4.50 \times 10^{-5}$
Eğim	$2.84 \times 10^{-3} \pm 4.77 \times 10^{-5}$



Şekil 4. 74: %30 i-propanol varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı

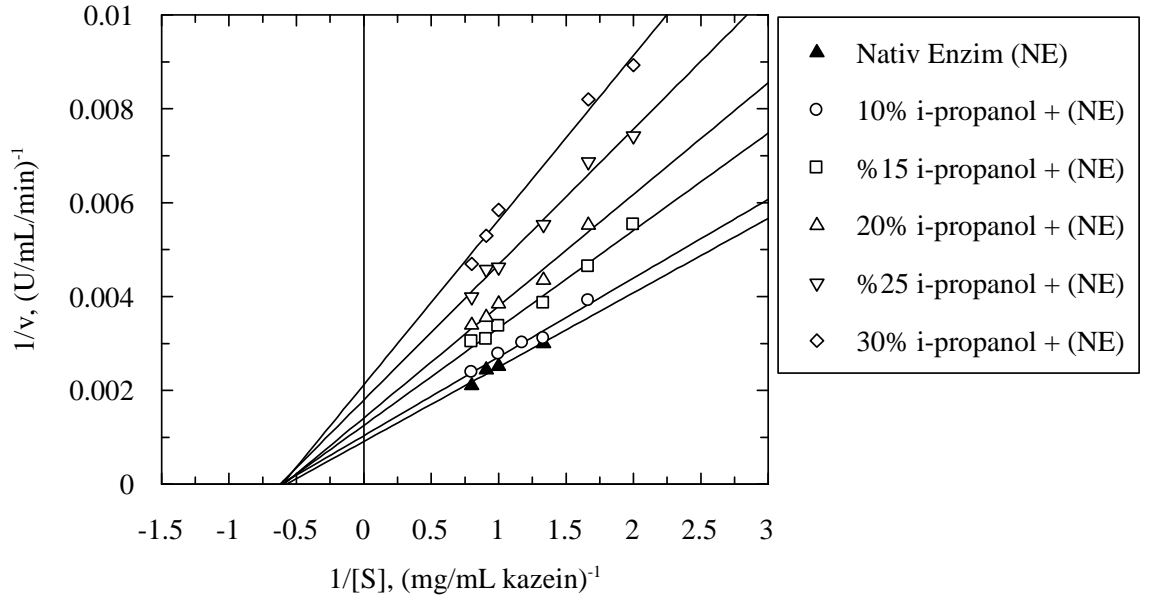
Tablo 4. 58: %30 i-propanol varlığında enzimin Şekil 4.74'teki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00221	0.00356	1.61	452.98	2.50	0.9769
2	0.00223	0.00357	1.60	449.35	2.48	0.9799
3	0.00244	0.0040	1.64	409.49	2.26	0.9627
4	0.00221	0.00383	1.73	452.98	2.50	0.9705
5	0.00212	0.00351	1.66	471.09	2.60	0.9925

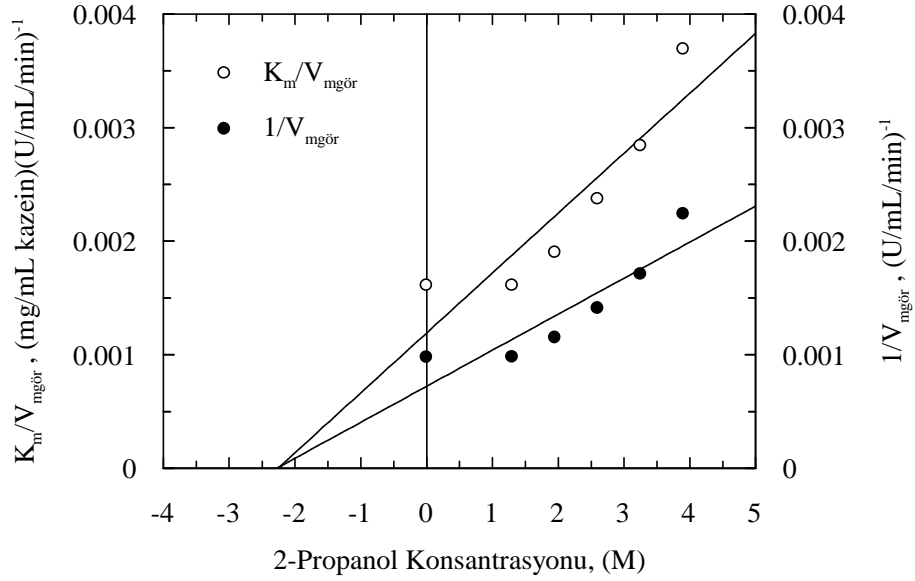
Tablo 4. 59: %30 i-propanol varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamanın standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.65 ± 0.02
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	446.99 ± 22.66
Dönüştürülen V_m (μ mol tirozin/mL/dak)	2.47 ± 0.06
İntersept	$2.24 \times 10^{-3} \pm 5.30 \times 10^{-5}$
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	$3.69 \times 10^{-3} \pm 9.47 \times 10^{-5}$

4.50, 4.52, 4.54, 4.56 ve 4.58 no'lu tablolarda ve 4.51, 4.53, 4.55, 4.57 ve 4.59 no'lu tablolarda verilen ortalama K_m değerlerine yakın deney numaralarına ait deney seti seçilerek i-propanolün çalışılan tüm konsantrasyonları için Şekil 4.75'te gösterilen Lineweaver-Burk diyagramı oluşturulmuştur. Şekil 4.75'te i-propanolün artan konsantrasyonları varlığında çizilen Lineweaver-Burk diyagramı, i-propanolün alkalen proteaz üzerinde non-kompetitif tip inhibisyon oluşturduğunu göstermektedir. İnhibisyonun kısmi ya da gerçek non-kompetitif inhibisyon olduğunu görmek ve K_i inhibisyon sabitini hesaplayabilmek için Lineweaver-Burk diyagramından elde edilen intersept ve eğimler çalışılan inhibitör (i-propanol) konsantrasyonuna karşı işaretlenerek Şekil 4.76'da gösterilen ikincil çizimler elde edilmiştir. İkincil çizimlerden elde edilen lineer doğrular i-propanolün artan konsantrasyonları varlığında enzimin gerçek (basit) non-kompetitif inhibisyona uğradığını göstermiştir. Elde edilen doğruların eğiminden, yatay ve düşey eksenlerdeki interseptlerinden yararlanılarak K_i değeri hesaplanmış ve sonuçlar tablo 4.60'da verilmiştir.



Şekil 4. 75: i-propanolün artan konsantrasyonları varlığında oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramı



Şekil 4. 76: Artan i-propanol konsantrasyonları varlığında Şekil 4.75’teki doğruların eğim ve interseptlerinin i-propanol konsantrasyonuna karşı işaretlenmesiyle oluşturulan ikincil çizim

Tablo 4. 60: Artan i-propanol konsantrasyonu varlığında ikincil çizimlerden yararlanılarak hesaplanan α , β ve K_i değeri

	$[I]-K_m/V_{mgör}$ $r= 0.9079$	$[I]-1/V_{mgör}$ $r= 0.9028$
İntersept	0.00119	0.00072
Eğim	0.00053	0.00032
K_i (M)	2.24	2.25

i-propanolün artan konsantrasyonları varlığında alkalen proteaz enziminin belirlenmiş kinetik parametreleri (k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri) (3.4) no'lu denklemden, termodinamik parametreleri ise (2.37), (2.38) ve (2.39) no'lu denklemlerden yararlanılarak hesaplanmış ve sırasıyla tablo 4.61 ve 4.62'de verilmiştir.

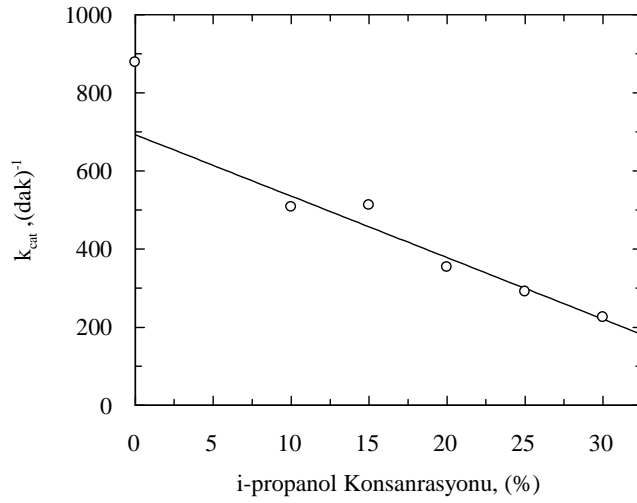
Tablo 4. 61: Artan i-propanol konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri

% i-propanol	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ mol tirozin/mL/min)	k_{cat} (dak) ⁻¹	k_{cat}/K_m (dak) ⁻¹ (mg/mL kazein) ⁻¹
0	1.67	5.62	832.59	498.56
10	1.65	5.64	508.11	307.82
15	1.65	5.69	512.63	310.68
20	1.69	3.93	354.09	209.52
25	1.66	3.23	291.00	175.30
30	1.65	2.47	225.52	136.68

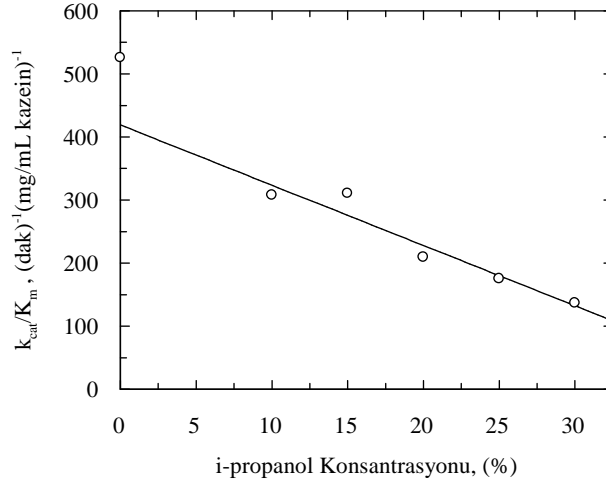
Tablo 4. 62: Artan i-propanol konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin termodinamik parametreleri

% i-propanol	$\Delta G^\#$ (kJ/mol)	$\Delta G_{E-T}^\#$ (kJ/mol)	ΔG_{E-S} (kJ/mol)
0	67.65	-15.66	1.29
10	68.90	-14.41	1.26
15	68.88	-14.43	1.26
20	69.81	-13.50	1.32
25	70.30	-13.01	1.28
30	70.98	-12.36	1.26

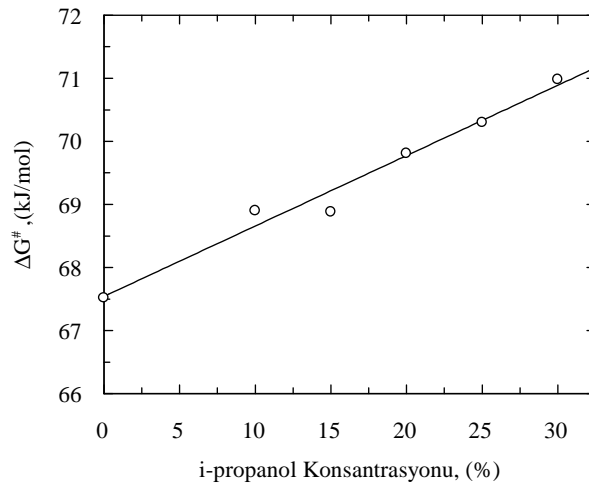
Çalışılan i-propanol konsantrasyonlarına karşı enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri işaretlendiğinin ve aralarında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Enzimin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin artan i-propanol konsantrasyonu ile lineer olarak azaldığı; termodinamik parametreler olan $\Delta G^\#$ ve $\Delta G_{E-T}^\#$ değerlerinin ise lineer olarak arttığı görülmüştür (Şekil 4.77, 4.78, 4.79 ve 4.80). i-propanolün enzim üzerindeki gerçek non-kompetitif inhibisyon etkisi nedeniyle çalışılan i-propanol konsantrasyonlarında K_m değişmediğinden ΔG_{E-S} değeri de değişmediği K_m ve ΔG_{E-S} 'in i-propanol konsantrasyonlarına karşı grafikleri oluşturulmamıştır.



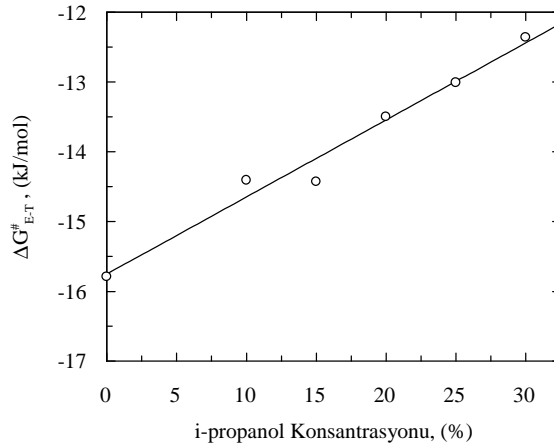
Şekil 4. 77: Alkalin proteazın k_{cat} değerinin artan i-propanol konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = -0.9653$)



Şekil 4. 78: Alkalin proteazın k_{cat}/K_m değerinin artan i-propanol konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = -0.9618$)



Şekil 4. 79: Alkalin proteazın ΔG^\ddagger değerinin artan i-propanol konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = 0.9720$)



Şekil 4. 80: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-T}^{\#}$ değerinin artan i-propanol konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= 0.9722$)

4.1.3.4.4.1 i-propanol varlığında enzimatik katalizi etkileyen faktörlerin enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri ile ilişkilendirilmesi

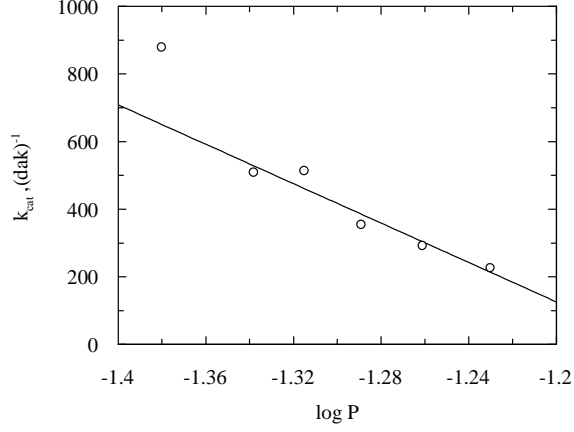
Artan i-propanol konsantrasyonu ile ilişkili log P değerleri (2.43) no'lu eşitlikten yararlanılarak hesaplanmıştır. Buna göre i-propanol çalışılan konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerleri tablo 4.63'te verilmiştir.

Tablo 4. 63: Artan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri

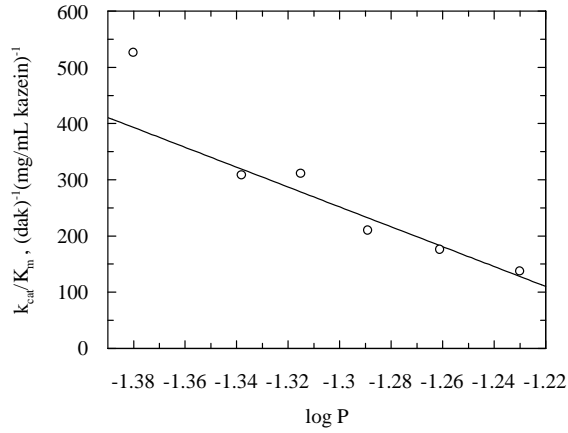
i-propanol Konsantrasyonu, (%)	Log P
0	-1.380
10	-1.338
15	-1.315
20	-1.289
25	-1.261
30	-1.230

Çalışılan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili log P değerlerine karşılık gelen enzimin k_{cat} , k_{cat}/K_m , $\Delta G^{\#}$ ve $\Delta G_{E-T}^{\#}$ değerleri arasında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Enzimin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin artan i-propanol konsantrasyonuna karşılık gelen log P değerleriyle lineer olarak azaldığı; termodinamik parametrelerin ($\Delta G^{\#}$ ve $\Delta G_{E-T}^{\#}$) ise lineer olarak arttığı görülmüştür (Şekil 4.81, 4.82, 4.83 ve 4.84). i-propanolün enzim üzerindeki gerçek non-kompetitif inhibisyon etkisi nedeniyle

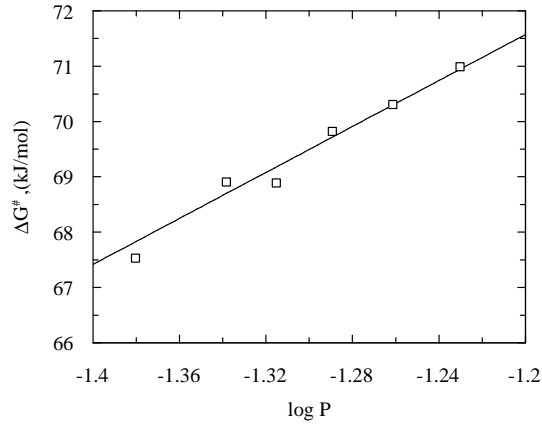
çalışılan i-propanol konsantrasyonlarında K_m değişmediğinden ΔG_{E-S} değeri de değişmediği K_m ve ΔG_{E-S} 'in log P değerlerine karşı grafikleri oluşturulmamıştır.



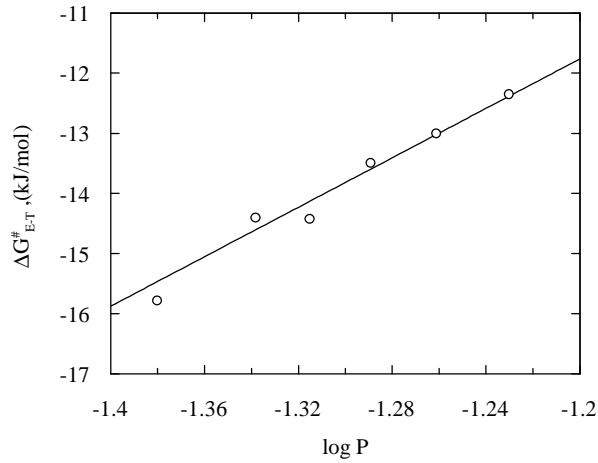
Şekil 4. 81: Alkalen proteazın k_{cat} değerinin artan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9678$)



Şekil 4. 82: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerinin artan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9634$)



Şekil 4. 83: Alkalen proteazın $\Delta G^\#$ değerinin artan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9788$)



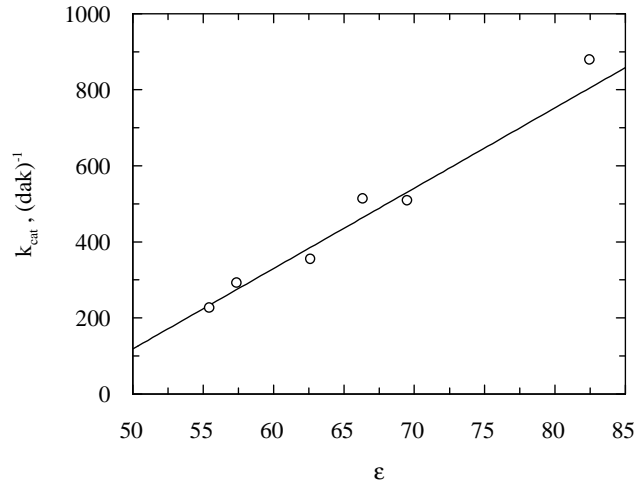
Şekil 4. 84: Alkalin proteazın $\Delta G_{E-T}^{\#}$ değerinin artan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9757$)

i-propanolün artan konsantrasyonu ile ilişkili dielektrik sabitleri şekil 2.33 ve (2.9) no'lu tablodan yararlanılarak hesaplanmıştır. Buna göre çalışılan konsantrasyonlar ile ilişkili dielektrik sabitleri tablo 4.64'te verilmiştir.

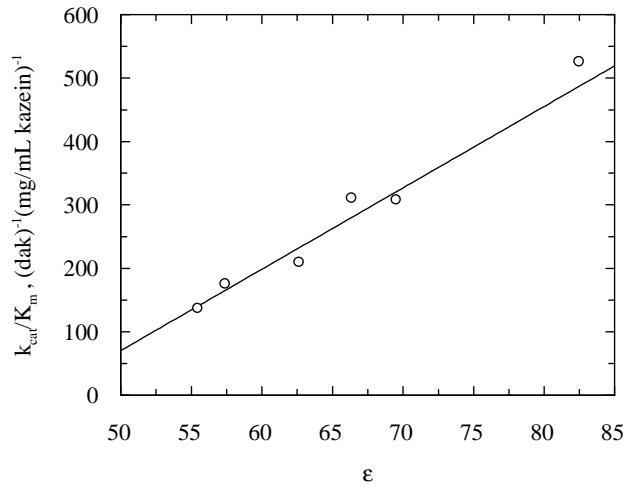
Tablo 4. 64: Artan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri

i-propanol Konsantrasyonu, (%)	Dielektrik sabiti
0	82.49
10	69.52
15	66.36
20	62.65
25	57.4
30	55.47
100	17.44

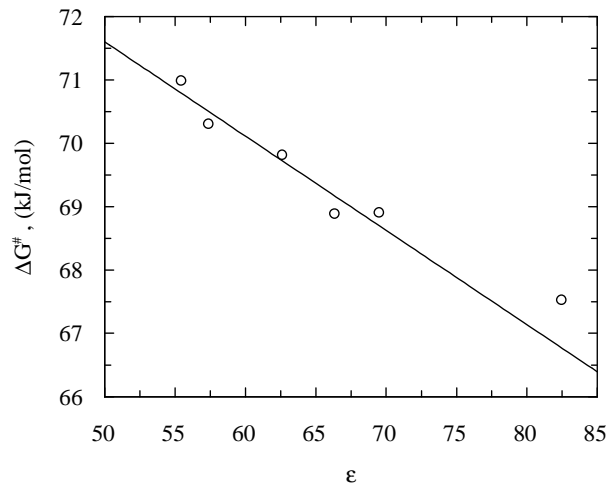
Çalışılan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitlerine karşılık gelen enzimin k_{cat} , k_{cat}/K_m , $\Delta G^{\#}$ ve $\Delta G_{E-T}^{\#}$ değerleri arasında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Enzimin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin artan i-propanol konsantrasyonuna karşılık gelen dielektrik sabiti değerleri ile lineer olarak arttığı; termodinamik parametreler olan $\Delta G^{\#}$ ve $\Delta G_{E-T}^{\#}$ değerlerinin ise lineer olarak azaldığı görülmüştür (Şekil 4.85, 4.86, 4.87 ve 4.88). i-propanolün enzim üzerindeki gerçek non-kompetitif inhibisyon etkisi nedeniyle çalışılan i-propanol konsantrasyonlarında K_m değişmediğinden ΔG_{E-S} değeri de değişmediği K_m ve ΔG_{E-S} 'in dielektrik sabiti değerlerine karşı grafikleri oluşturulmamıştır.



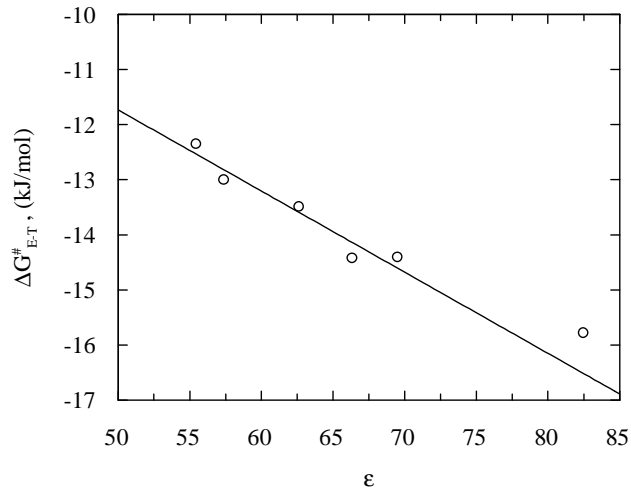
Şekil 4. 85: Alkalen proteazın k_{cat} değerleri ile artan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9678$)



Şekil 4. 86: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerleri ile artan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9640$)



Şekil 4. 87: Alkalen proteazın $\Delta G^{\#}$ değerleri ile artan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9678$)



Şekil 4. 88: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-T}^{\#}$ değerleri ile artan i-propanol konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9688$)

4.1.3.5 Organik çözücü yokluğunda alkalen proteaz enziminin Folin-Ciocalteau reaktifi içermeyen yöntem ile k_m ve v_m değerlerinin belirlenmesi

Alkalen proteaz enziminin organik çözücü içermeyen ortamdaki K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi için bölüm 3.7.2’de belirtilen protokol uygulanmıştır. Farklı başlangıç substrat konsantrasyonları ve bunlara karşılık gelen başlangıç hızlarının resiprokalleri $1/v$ ’ye karşı $1/[S]$ işaretlenerek Lineweaver–Burk diyagramı oluşturulmuş; enzimin K_m ve V_m değerleri sırasıyla 1.67 mg/mL kazein ve 10.22 μmol tirozin/mL/dak olarak hesaplanmıştır.

4.1.3.5.1 Alkalen proteaz enziminin k_{cat} değeri (turn-over katsayısı) ve katalitik performansının (k_{cat}/K_m) belirlenmesi

Bacillus clausii GMBAE 42 soyunun ürettiği alkalen proteazla kazein hidrolizi reaksiyonuna ilişkin katalitik hız sabiti (k_{cat}) 1759.00 dak^{-1} olarak hesaplanmıştır. Enzimin katalitik performansını ifade eden k_{cat}/K_m oranı 1048.44 $(\text{dak})^{-1}(\text{mg/mL kazein})^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

4.1.3.5.2 Alkalen proteaz enziminin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

Alkalen proteaz enzimiyle kazein hidroliz reaksiyonuna ilişkin aktivasyon serbest enerjisi (ΔG^\ddagger), geçiş hali serbest enerjisi (ΔG_{E-T}^\ddagger) ve substrat bağlama serbest enerjisi (ΔG_{E-S}) (termodinamik parametreleri) (2.40), (2.41) ve (2.42) no'lu denklemlerden yararlanılarak sırasıyla 65.78 kJ/mol, -17.53 kJ/mol ve 1.31 kJ/mol olarak hesaplanmıştır.

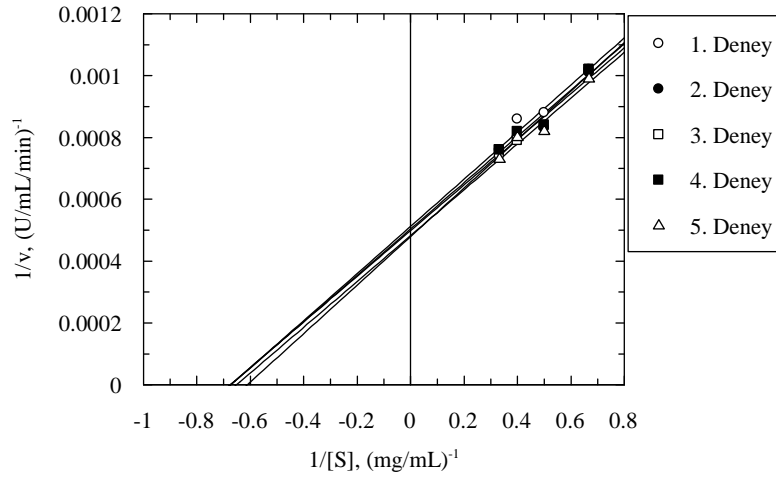
4.1.3.6 Organik çözücü varlığında Folin-Ciocalteu reaktifi içermeyen yöntem ile alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi ve organik çözücülerin enzim üzerinde yarattıkları zorunlu olmayan aktivasyon etkilerinin belirlenmesi

1,4-dioksan, N,N'-DMF, asetonitril ve DMSO'nun artan konsantrasyonları varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi Folin-Ciocalteu reaktifi içermeyen yöntem ile bölüm 3.7.4'te belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. 1,4-dioksan, N,N'-DMF, asetonitrilin artan konsantrasyonları varlığında Şekil 4.6, 4.7 ve 4.8'de görüldüğü gibi aktivasyon gözlemlendiği için bu çözücülerin artan konsantrasyonları varlığında aktivasyon kinetiği çalışılmıştır. Şekil 4.9'da görülen DMSO'nun artan konsantrasyonları varlığında %20 konsantrasyona kadar aktivasyon gözlemlendiğinden bu konsantrasyon aralığında aktivasyon; %20 konsantrasyonundan itibaren ise inhibisyon gözlemlendiğinden %30 konsantrasyonundan itibaren inhibisyon kinetiği çalışılmıştır.

4.1.3.6.1 1,4-Dioksan varlığında enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

1,4-dioksan için %2.5, 5, 10 ve 15 konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Bu konsantrasyonlar için oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramları şekil 4.89, 4.90,

4.91 ve 4.92’de gösterilmiştir. Çalışılan 1,4–dioksan konsantrasyonları varlığında Folin-Ciocalteu reaktifi içermeyen yöntem ile belirlenen K_m ve V_m değerleri ile oluşturulan doğruların interseptleri ve eğimleri sırasıyla tablo 4.65, 4.67, 4.69 ve 4.70’te verilmiştir. Hesap ile bulunan K_m ve V_m değerlerinin ortalamaları ile doğruların y eksenini kestiği noktalar olan interseptleri ve eğimlerinin ortalamaları, standart sapmaları ile birlikte tablo 4.66, 4.68, 4.70 ve 4.72’de verilmiştir.



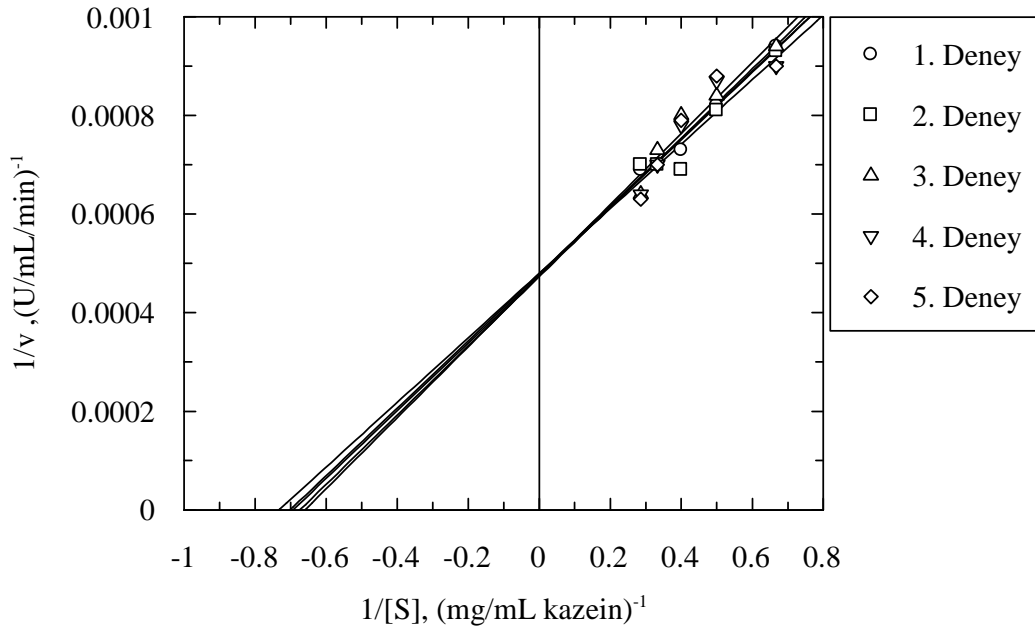
Şekil 4. 89: %2.5 1,4–dioksan varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 65: %2.5 1,4–dioksan varlığında enzimin Şekil 4.89’deki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deneý No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00051	0.00076	1.49	1960.78	10.82	0.9653
2	0.0005	0.00074	1.48	2000.00	11.04	0.9714
3	0.00048	0.00078	1.63	2083.33	11.50	0.9790
4	0.00050	0.00075	1.50	2000.00	11.04	0.9722
5	0.00048	0.00074	1.54	2083.33	11.50	0.9763

Tablo 4. 66: %2.5 1,4–dioksan varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.53 ± 0.03
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	2025.49 ± 24.66
Dönüştürülen V_m , (μ moltirozin/mL/dak)	11.18 ± 0.14
İntersept	$4.94 \times 10^{-4} \pm 6.00 \times 10^{-6}$
Eğim	$7.54 \times 10^{-4} \pm 7.48 \times 10^{-6}$



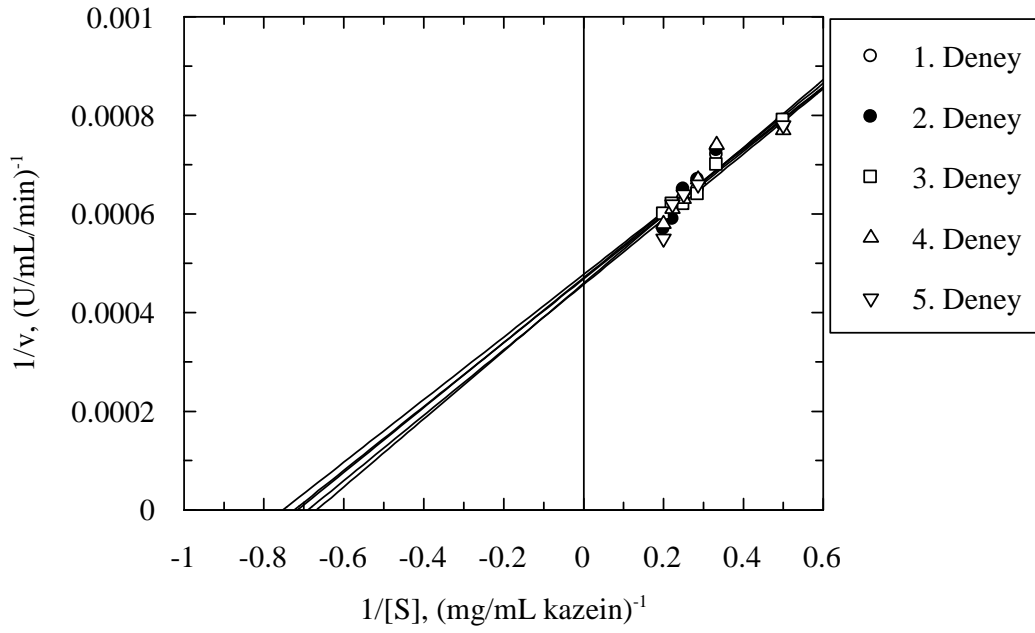
Şekil 4. 90: %5 1,4–dioksan varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 67: %5 1,4–dioksan varlığında enzimin Şekil 4.90’deki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00048	0.00069	1.44	2083.33	11.50	0.9909
2	0.00048	0.00065	1.35	2083.33	11.50	0.9533
3	0.00048	0.00072	1.50	2083.33	11.50	0.9649
4	0.00048	0.00068	1.42	2083.33	11.50	0.9401
5	0.00047	0.00070	1.49	2127.66	11.74	0.9210

Tablo 4. 68: %5 1,4–dioksan varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.44 ± 0.03
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	2092.20 ± 8.87
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	11.55 ± 0.05
İntersept	$4.78 \times 10^{-4} \pm 2.00 \times 10^{-6}$
Eğim	$6.88 \times 10^{-4} \pm 1.16 \times 10^{-5}$



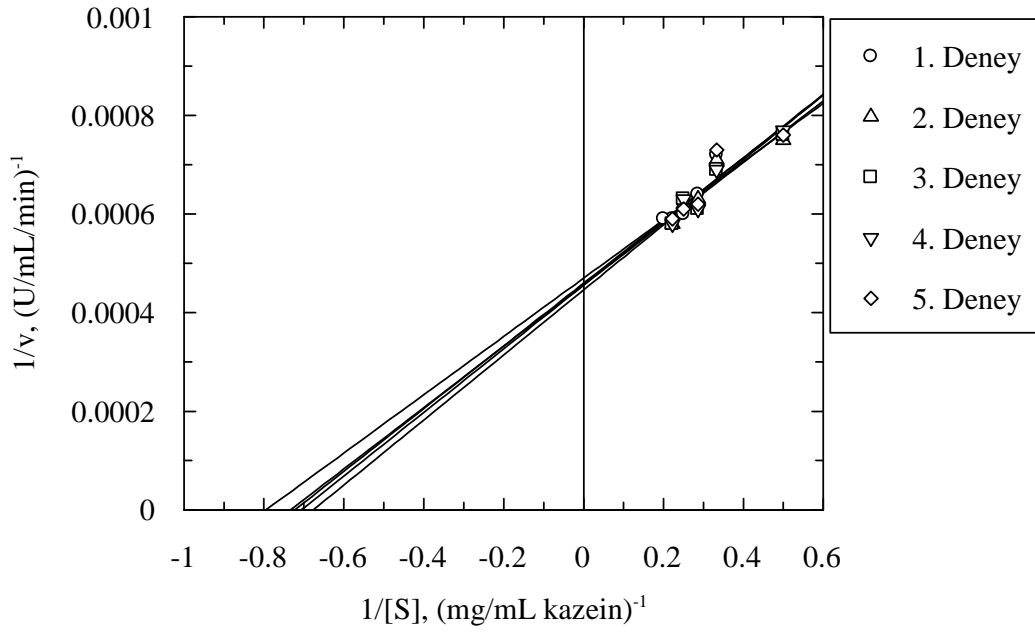
Şekil 4. 91: %10 1,4–dioksan varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 69: 10% 1,4–dioksan varlığında enzimin Şekil 4.91’deki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00047	0.00066	1.4	2127.66	11.74	0.9733
2	0.00046	0.00069	1.50	2173.91	12.00	0.9357
3	0.00047	0.00065	1.38	2127.66	11.74	0.9879
4	0.00048	0.00063	1.31	2083.33	11.50	0.9250
5	0.00046	0.00066	1.43	2173.91	12.00	0.9568

Tablo 4. 70: %10 1,4–dioksan varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.41 ± 0.03
V_m (μ g tirozin /mL/dak)	2137.30 ± 17.00
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	11.80 ± 0.09
İntersept	$4.68 \times 10^{-4} \pm 3.74 \times 10^{-6}$
Eğim	$6.58 \times 10^{-4} \pm 9.70 \times 10^{-6}$



Şekil 4. 92: % 15 1,4–dioksan varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

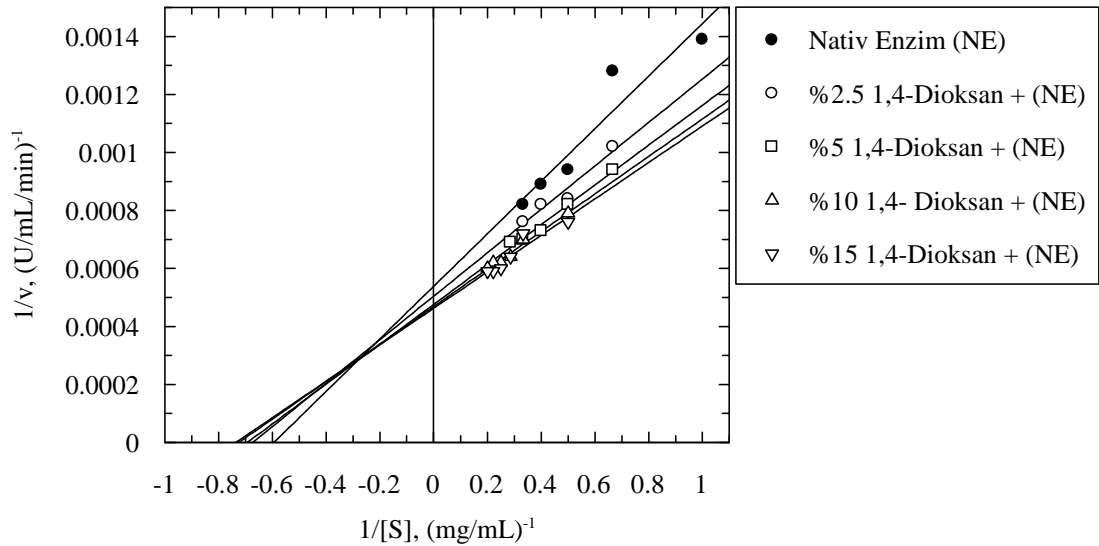
Tablo 4. 71: % 15 1,4–dioksan varlığında enzimin Şekil 4.92’deki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00046	0.00063	1.37	2173.91	12.00	0.9395
2	0.00047	0.00059	1.26	2127.66	11.74	0.9297
3	0.00046	0.00062	1.35	2173.91	12.00	0.9530
4	0.00045	0.00066	1.47	2222.22	12.26	0.9606
5	0.00046	0.00064	1.39	2173.91	12.00	0.9032

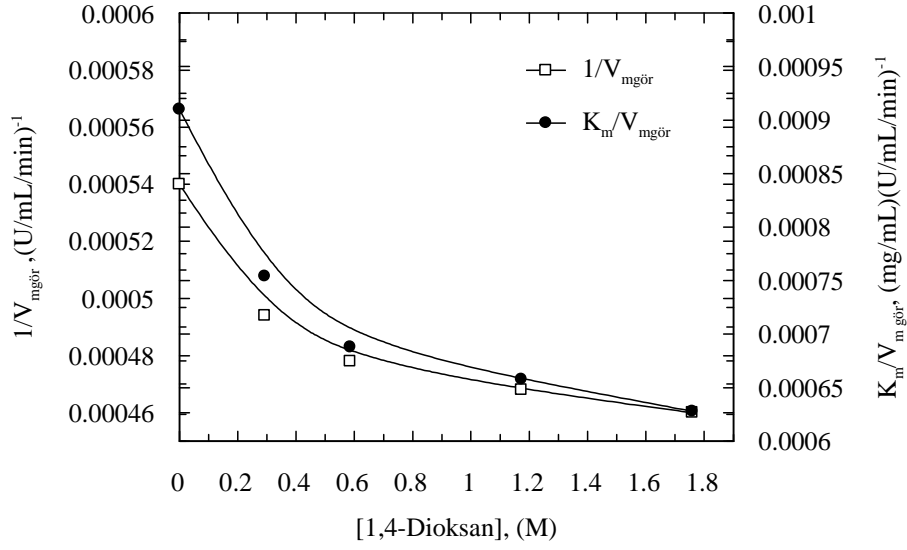
Tablo 4. 72: % 15 1,4–dioksan varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.37 ± 0.03
V_m (μ g tirozin /mL/dak)	2174.32 ± 14.95
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	12.00 ± 0.08
İntersept	$4.60 \times 10^{-4} \pm 3.16 \times 10^{-6}$
Eğim	$6.28 \times 10^{-4} \pm 1.16 \times 10^{-5}$

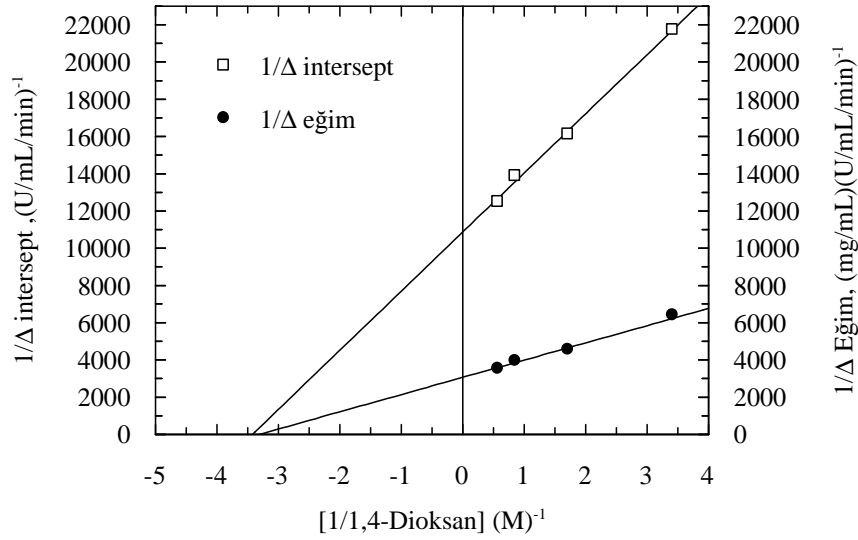
4.65, 4.67, 4.69 ve 4.71 no'lu tablolarla 4.66, 4.68, 4.70 ve 4.72 no'lu tablolarda verilen ortalama K_m değerlerine en yakın deney numaralarına ait veriler kullanılarak 1,4-dioksanın çalışılan tüm konsantrasyonları için Şekil 4.93'te gösterilen Lineweaver-Burk diyagramı oluşturulmuştur. Şekil 4.93'te 1,4-dioksanın artan konsantrasyonları varlığında zilen Lineweaver-Burk diyagramı, 1,4-dioksanın alkalen proteaz üzerinde zorunlu olmayan aktivasyon etkisi oluşturduğunu göstermektedir. K_A aktivasyon sabitini ve α ve β parametrelerini hesaplayabilmek için Lineweaver-Burk diyagramından elde edilen intersept ve eğimlerden yararlanılarak; bölüm 2.4.2'de belirtildiği gibi; Şekil 4.94 ve 4.95'te gösterilen ikincil ve ncl zimele gidilmiştir. Şekil 4.94'te gösterilen ikincil zimden zorunlu olmayan aktivasyonda görülen hiperboller elde edildiğinden Şekil 4.95'te gösterilen ncl zimler oluşturulmuş ve lineer doğrular elde edilmiştir. Elde edilen doğruların; 2.27 no'lu Şekilde gösterildiği gibi (2.38) ve (2.39) no'lu eşitliklerden yararlanılarak ncl zimden elde edilen doğruların eğiminden, yatay ve düşey eksenler üzerindeki interseptlerinden yararlanılarak K_A , α ve β parametreleri hesaplanmışve sonuçlar tablo 4.73'te verilmiştir.



Şekil 4. 93: 1,4-dioksanın artan konsantrasyonları varlığında oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramı



Şekil 4. 94: 1,4-dioksanın artan konsantrasyonları varlığında Şekil 4.93'teki doğruların eğim ve interseptlerinin 1,4-dioksan konsantrasyonuna karşı işaretlenmesiyle oluşturulan ikincil çizim



Şekil 4. 95: 1,4-dioksanın artan konsantrasyonları varlığında oluşturulan üçüncül çizim

Tablo 4. 73: 1,4-dioksanın artan konsantrasyonları varlığında üçüncül çizimlerden yararlanılarak hesaplanan α , β ve K_A değerleri.

	$1/[A]-1/\Delta \text{İntersept}$ $r= 0.9983$	$1/[A]-1/\Delta \text{Eğim}$ $r= 0.9971$
İntersept	10872.27	3067.71
Eğim	3175.53	925.38
β	1.20	-
α	-	0.77
$K_A \text{ (M)}$	0.44	0.47

1,4–dioksanın artan konsantrasyonları varlığında alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri olan k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri (3.4) no’lu denklemden, termodinamik parametreleri ise (2.40), (2.41) ve (2.42) no’lu denklemlerden yararlanılarak belirlenmiş ve tablo 4.74’te kinetik parametreler, tablo 4.75’te termodinamik parametreler verilmiştir.

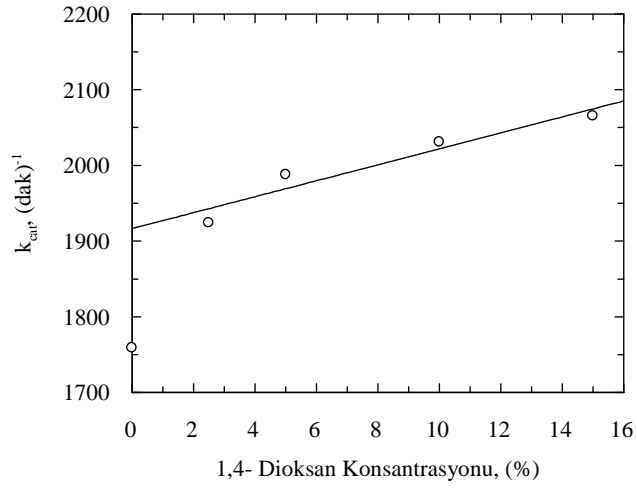
Tablo 4. 74: Artan 1,4–dioksan konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri

% 1,4-Dioksan	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μmol tirozin/mL/min)	k_{cat} (dak)⁻¹	k_{cat}/K_m (dak)⁻¹(mg/mL kazein)⁻¹
0	1.68	10.22	1759.00	1048.44
2.5	1.53	11.18	1924.26	1257.69
5	1.44	11.55	1988.00	1380.54
10	1.41	11.80	2031.01	1440.41
15	1.37	12.00	2065.43	1507.60

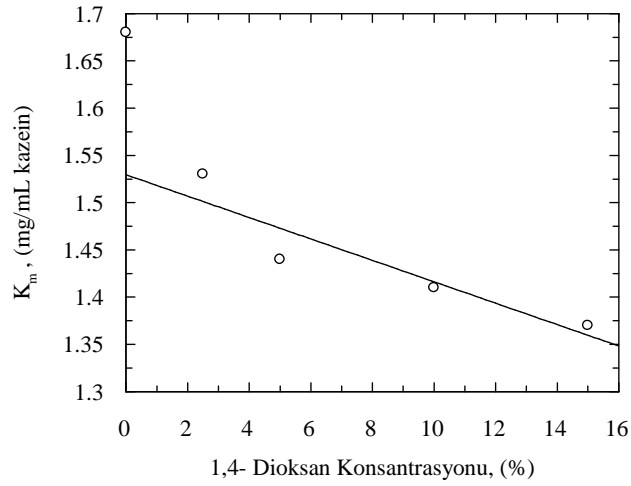
Tablo 4. 75: Artan 1,4–dioksan konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin termodinamik parametreleri

% 1,4-Dioksan	$\Delta G^\#$ (kJ/mol)	$\Delta G^\#_{E-T}$ (kJ/mol)	ΔG_{E-S} (kJ/mol)
0	65.78	-17.53	1.31
2.5	65.54	-17.77	1.07
5	65.46	-17.85	0.92
10	65.41	-17.90	0.87
15	65.36	-17.95	0.79

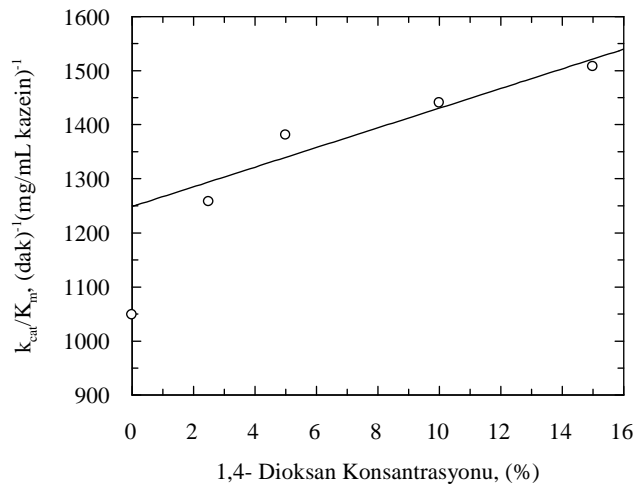
Çalışılan 1,4–dioksan konsantrasyonlarına karşı enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri işaretlendiğinde aralarında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Şekil 4.96 ve 4.98 enzimin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin artan 1,4–dioksan konsantrasyonu ile lineer olarak arttığını göstermektedir. Şekil 4.97, 4.99, 4.100 ve 4.101 sırasıyla enzimin K_m değerinin, $\Delta G^\#$, $\Delta G^\#_{E-T}$ ve ΔG_{E-S} değerlerinin ise 1,4-dioksan konsantrasyonu ile lineer olarak azaldığını göstermektedir. Bu artış ve azalışlar 1,4-dioksanın enzim üzerindeki zorunlu olmayan aktivasyonunun kinetik ve termodinamik göstergeleridir.



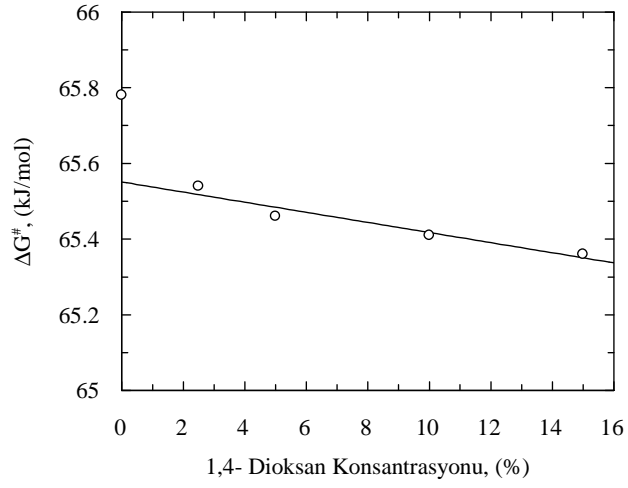
Şekil 4. 96: Alkalen proteazın k_{cat} değerinin artan 1,4-dioksan konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r = -0.9602$)



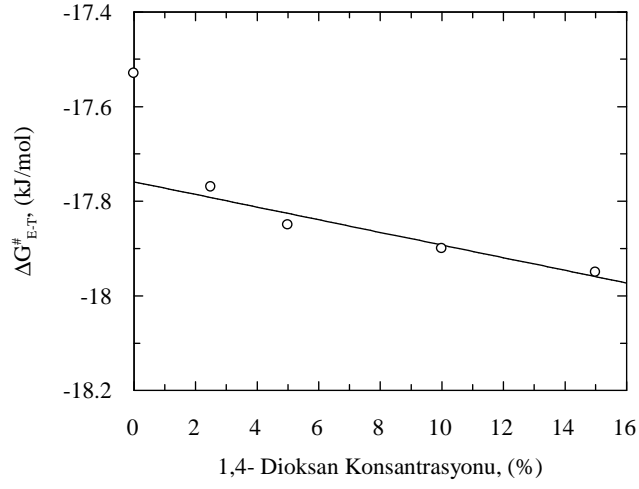
Şekil 4. 97: Alkalen proteazın K_m değerinin artan 1,4-dioksan konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r = -0.9229$)



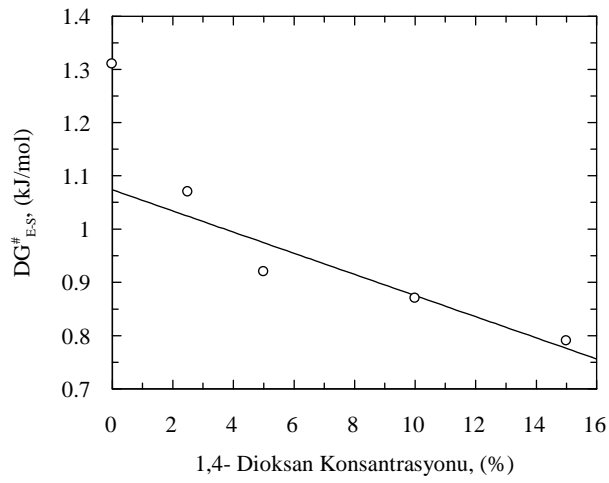
Şekil 4. 98: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerinin artan 1,4-dioksan konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r = 0.9500$)



Şekil 4. 99: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger değerinin artan 1,4-dioksan konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = -0.9646$)



Şekil 4. 100: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger_{E-T} değerinin artan 1,4-dioksan konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = -0.9646$)



Şekil 4. 101: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger_{E-S} değerinin artan 1,4-dioksan konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = -0.9343$)

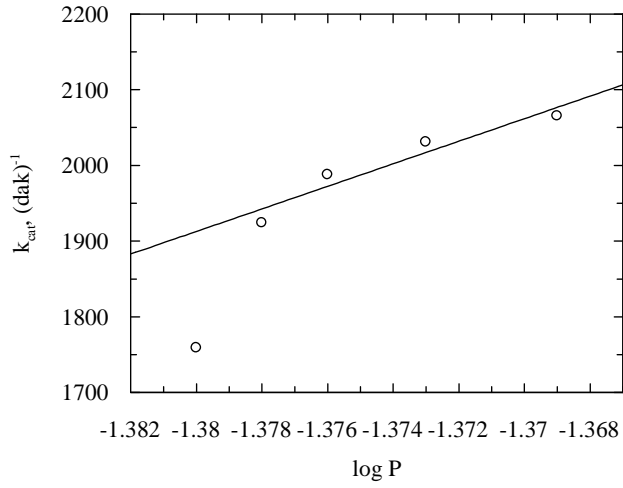
4.1.3.6.1.1 1,4–Dioksan varlığında enzimatik katalizi etkileyen faktörlerin enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri ile ilişkilendirilmesi

Artan 1,4–dioksan konsantrasyonu ile ilişkili log P değerleri (2.43) no'lu eşitlikten yararlanılarak hesaplanmıştır. Buna göre 1,4–dioksanın çalışılan konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerleri tablo 4.76'da verilmiştir.

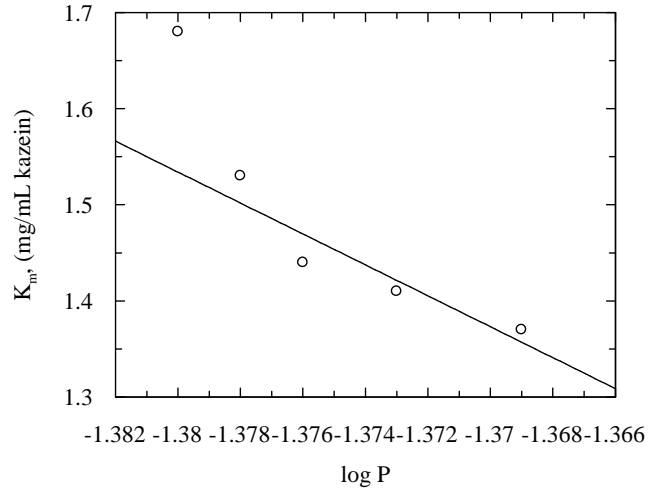
Tablo 4. 76: Artan 1,4–dioksan konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri

1,4-Dioksan Konsantrasyonu, (%)	Log P
0	-1.380
2.5	-1.378
5	-1.376
10	-1.373
15	-1.369

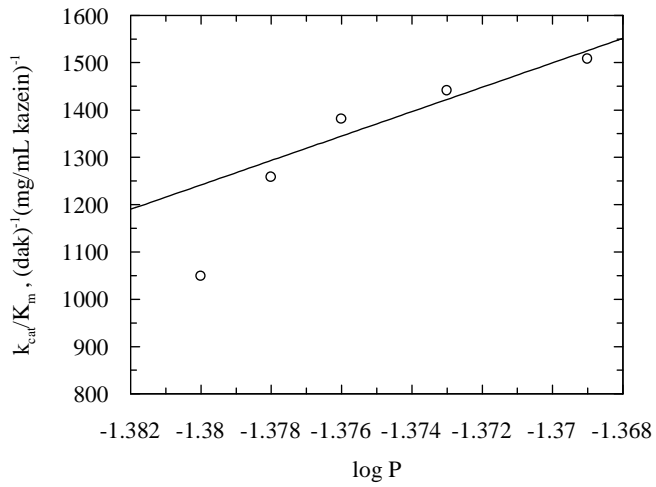
Çalışılan 1,4–dioksan konsantrasyonları ile ilişkili log P değerlerine karşı enzimin kinetik (k_{cat} , K_m , k_{cat}/K_m) ve termodinamik parametreleri ($\Delta G^\#$, $\Delta G_{E-T}^\#$ ve ΔG_{E-S}) işaretlendiğinde aralarında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Log P değerlerine karşılık gelen kinetik parametrelerin grafikleri şekil 4.102, 4.103 ve 4.104'da, termodinamik parametrelere karşılık gelen grafikler şekil 4.105, 4.106 ve 4.107'de gösterilmiştir. Artan 1,4–dioksan konsantrasyonlarında enzimin kinetik parametreleri olan k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri artan 1,4-dioksan konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı için bu konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerleri ile kinetik parametreler arasında lineer olarak artan ilişki gözlenmiştir. Zorunlu olmayan aktivatör varlığında enzimin K_m değeri azaldığından artan 1,4–dioksan konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri ile K_m değerleri arasında doğrusal olarak azalan ilişki vardır. Artan 1,4–dioksan konsantrasyonu varlığında enzimin termodinamik parametreleri azaldığından, bu konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerleri ile termodinamik parametreler $\Delta G^\#$, $\Delta G_{E-T}^\#$ ve ΔG_{E-S} arasında lineer olarak azalan ilişkiler belirlenmiştir.



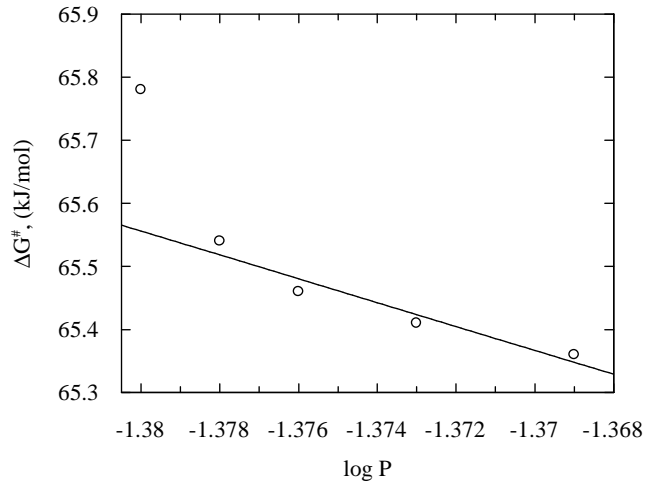
Şekil 4. 102: Artan 1,4–dioksan konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin k_{cat} değerlerinin değişimi ($r= 0.9586$)



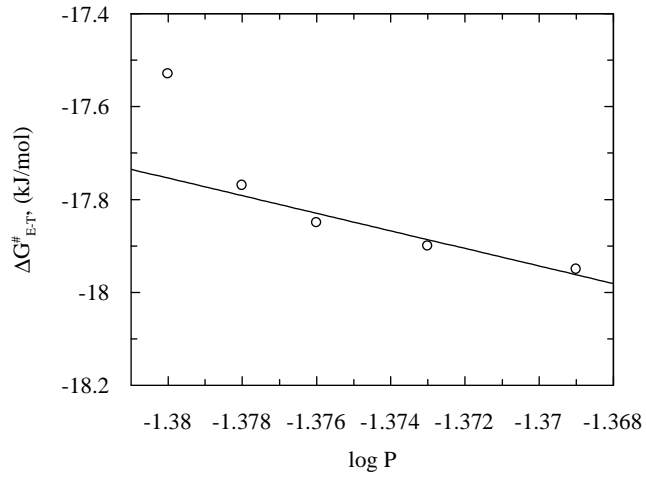
Şekil 4. 103: Artan 1,4–dioksan konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin K_m değerlerinin değişimi ($r= -0.9263$)



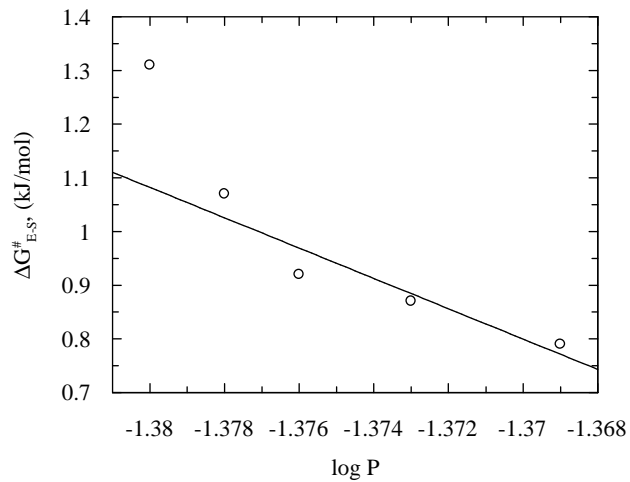
Şekil 4. 104: Artan 1,4–dioksan konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin k_{cat}/K_m değerlerinin değişimi ($r= 0.9517$)



Şekil 4. 105: Artan 1,4–dioksan konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin ΔG^{\ddagger} değerlerinin değişimi ($r = -0.9649$)



Şekil 4. 106: Artan 1,4–dioksan konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin $\Delta G^{\ddagger}_{E-T}$ değerlerinin değişimi ($r = 0.9649$)



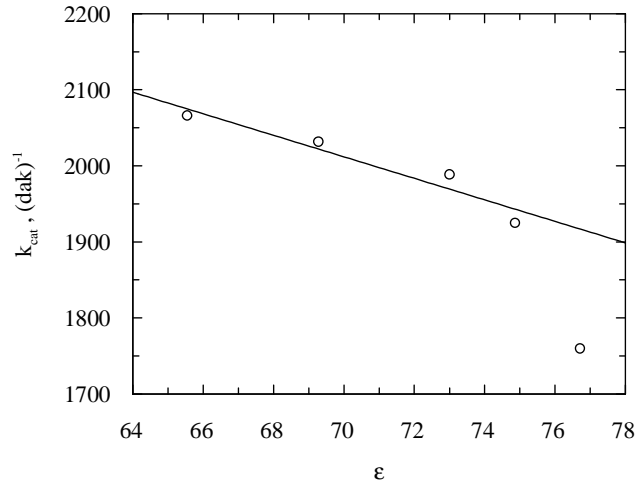
Şekil 4. 107: Artan 1,4–dioksan konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin $\Delta G^{\ddagger}_{E-S}$ değerlerinin değişimi ($r = -0.9389$)

1,4–dioksanın 25 °C’deki dielektrik sabiti 2.209 ve α değeri 0.170×10^{-2} olarak, suyun 25 °C’deki dielektrik sabiti 78.54 ve α değeri 0.20×10^{-2} olarak verilmiştir [90]. (2.48) no’lu eşitlikten yararlanılarak 1,4–dioksanın 30 °C’deki dielektrik sabiti 2.165 olarak hesaplanmıştır. 1,4–dioksanın çalışılan %2.5, 5, 10 ve %15 konsantrasyonlarındaki dielektrik sabitleri (2.46) no’lu eşitlikten yararlanılarak hesaplanmış ve 4.77 no’lu tabloda verilmiştir.

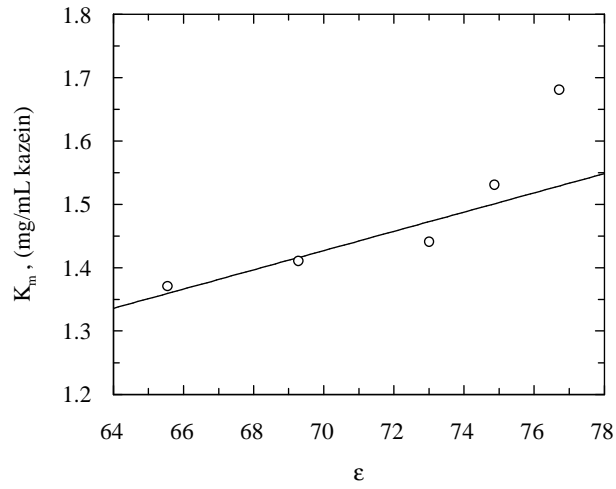
Tablo 4. 77: Artan 1,4–dioksan konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri

1,4–Dioksan Konsantrasyonu, (%)	Dielektrik sabiti
0	76.75
2.5	74.88
5	73.02
10	69.29
15	65.56

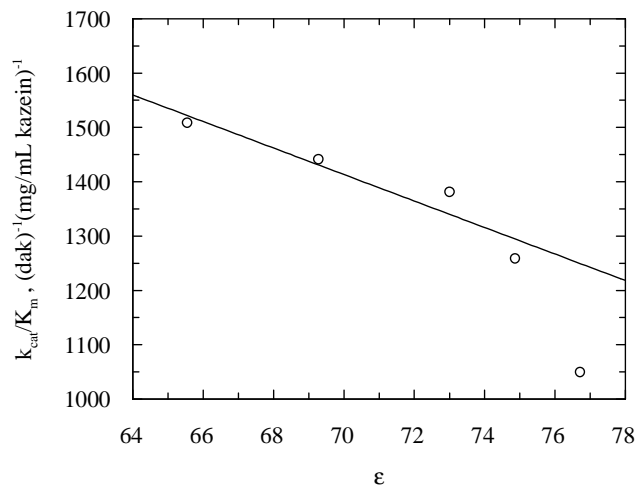
Çalışılan 1,4–dioksan konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitlerine karşı enzimin kinetik (k_{cat} , K_m , k_{cat}/K_m) ve termodinamik parametreleri (ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger ve ΔG_{E-S}) işaretlenmiş ve aralarında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Dielektrik sabitlerine karşılık gelen kinetik parametrelerin grafikleri şekil 4.108, 4.109 ve 4.110’da, termodinamik parametrelere karşılık gelen grafikler şekil 4.111, 4.112 ve 4.113’te gösterilmiştir. Artan 1,4–dioksan konsantrasyonlarında enzimin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri artmasına karşın, dielektrik sabitleri azaldığından k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri ile dielektrik sabitleri arasında lineer olarak azalan ilişkiler gözlenmiştir (Şekil 4.108 ve 4.109). 1,4–dioksan konsantrasyonlarında enzimin K_m değeri azaldığından K_m ile dielektrik sabitleri arasında lineer olarak artan bir ilişki görülmüştür (Şekil 4.109). Artan 1,4–dioksan konsantrasyonlarında enzimin termodinamik parametreleri azalıp, bu konsantrasyonlar ile ilişkili dielektrik sabitleri de azaldığından, dielektrik sabitleri ile termodinamik parametreler arasında lineer olarak artan ilişkiler belirlenmiştir (Şekil 4.111, 4.112, 4.113).



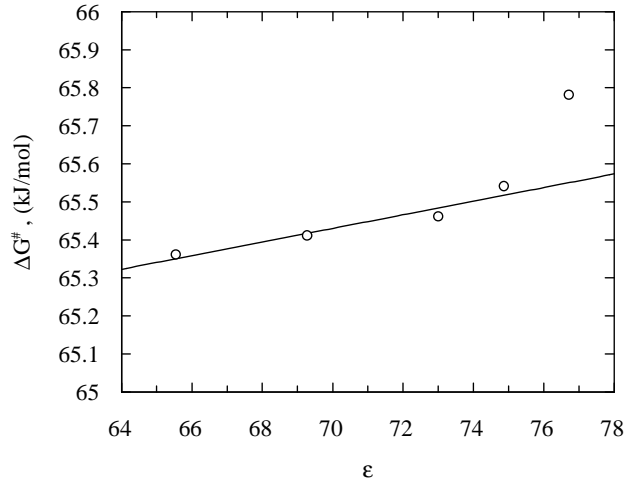
Şekil 4. 108: Alkalin proteazın k_{cat} değeri ile artan 1,4-dioksan konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9601$)



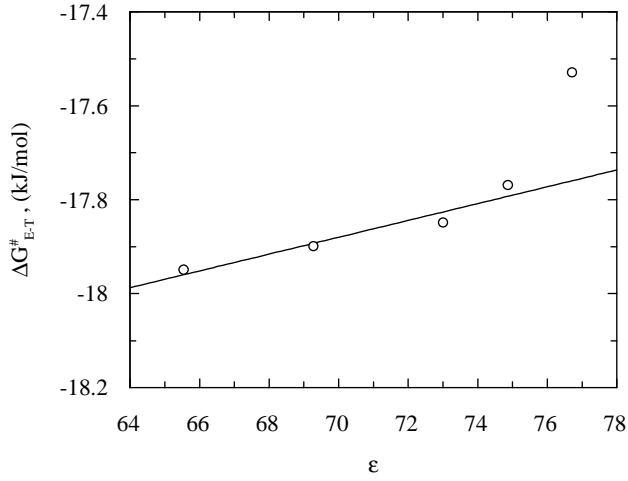
Şekil 4. 109: Alkalin proteazın K_m değerleri ile artan 1,4-dioksan konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r = 0.9227$)



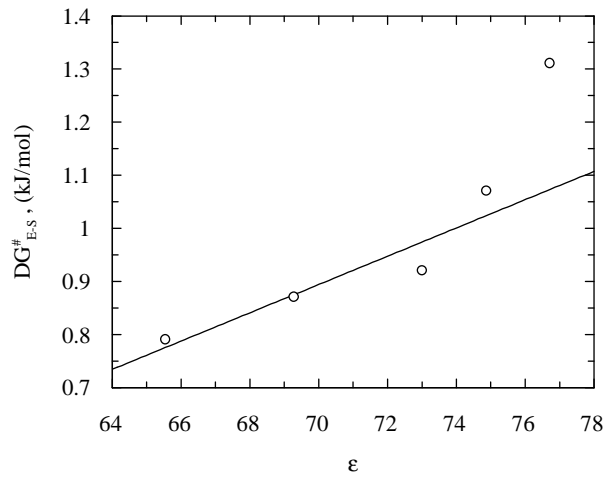
Şekil 4. 110: Alkalin proteazın k_{cat}/K_m değerleri ile artan 1,4-dioksan konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9499$)



Şekil 4. 111: Alkalen proteazın $\Delta G^{\#}$ değerleriyle artan 1,4-dioksan konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9499$)



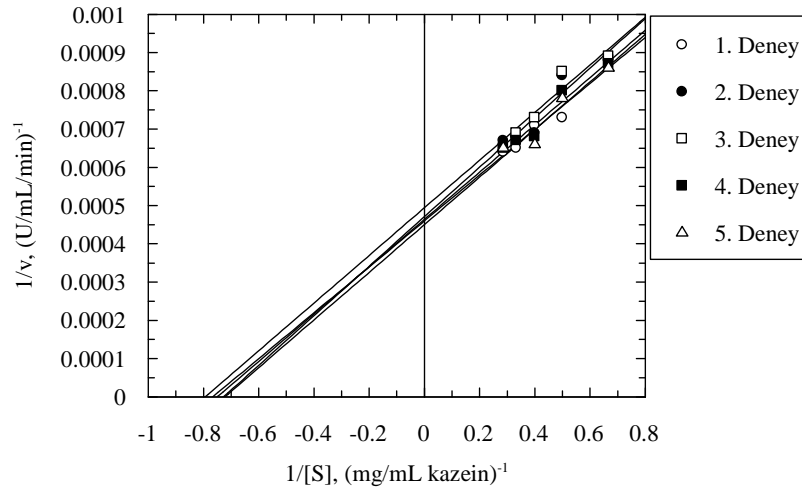
Şekil 4. 112: Alkalen proteazın $\Delta G^{\#}_{E-T}$ değerleriyle artan 1,4-dioksan konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9499$)



Şekil 4. 113: Alkalen proteazın $\Delta G^{\#}_{E-S}$ değerleriyle artan 1,4-dioksan konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9499$)

4.1.3.6.2 N,N'-DMF varlığında enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

N,N'-DMF için %2.5, 5, 7.5, 10 ve %15 konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Bu konsantrasyonlar için oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramları şekil 4.114, 4.115, 4.116, 4.117 ve 4.118'de gösterilmiştir. Çalışılan N,N'-DMF konsantrasyonları varlığında Folin-Ciocalteu reaktifi içermeyen yöntem ile belirlenen K_m ve V_m değerleri ile oluşturulan doğruların interseptleri ve eğimleri sırasıyla tablo 4.78, 4.80, 4.82, 4.84 ve 4.86'da verilmiştir. Hesap ile bulunan K_m ve V_m değerlerinin ortalamaları ile doğruların y eksenini kestiği noktalar olan interseptleri ve eğimlerinin ortalamaları, standart sapmaları ile birlikte tablo 4.79, 4.81, 4.83, 4.85 ve 4.87'de verilmiştir.



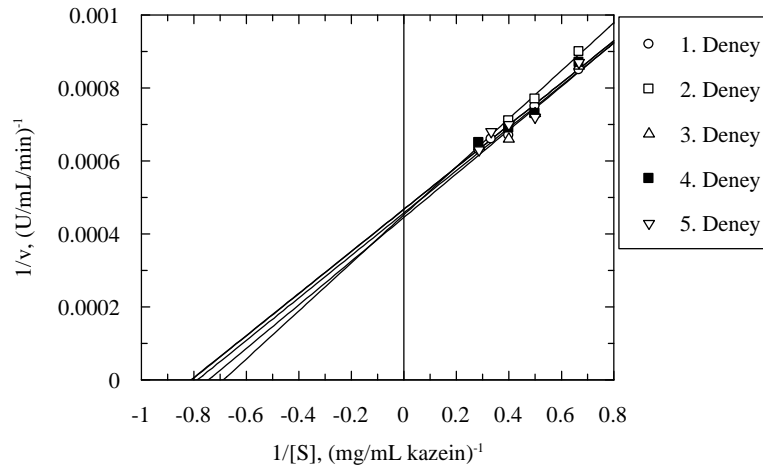
Şekil 4. 114: %2.5 N,N'-DMF varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı

Tablo 4. 78: %2.5 N,N'-DMF varlığında enzimin Şekil 4.114'deki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deneý No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ molgtirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00045	0.00065	1.44	2222.22	12.26	0.9794
2	0.00047	0.00065	1.38	2127.66	11.74	0.9512
3	0.00049	0.00062	1.27	2040.82	11.26	0.9417
4	0.00046	0.00062	1.35	2173.91	12.00	0.9750
5	0.00046	0.00060	1.30	2173.91	12.00	0.9609

Tablo 4. 79: %2.5 N,N'-DMF varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.35 ± 0.03
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	2147.70 ± 30.62
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	11.85 ± 0.17
İntersept	$4.66 \times 10^{-4} \pm 6.78 \times 10^{-6}$
Eğim	$6.28 \times 10^{-4} \pm 9.69 \times 10^{-6}$



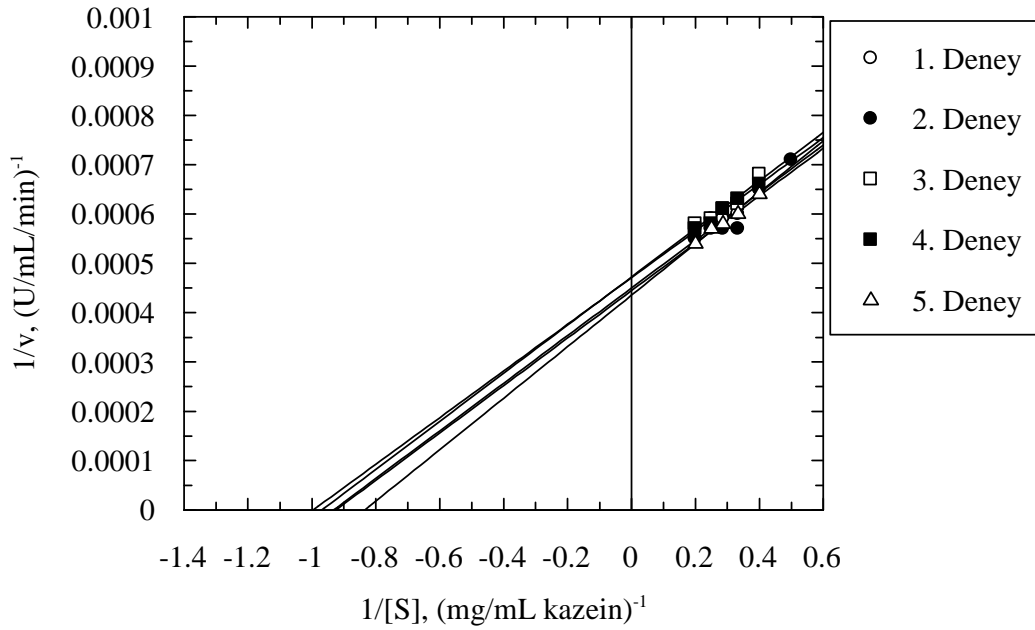
Şekil 4. 115: %5 N,N'-DMF varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı

Tablo 4. 80: %5 N,N'-DMF varlığında enzimin K_m ve V_m değerleri Şekil 4.115'teki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deneş No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00046	0.00058	1.26	2173.91	12.00	0.9914
2	0.00045	0.00066	1.47	2222.22	12.26	0.9724
3	0.00045	0.0006	1.33	2222.22	12.26	0.9952
4	0.00047	0.00058	1.23	2127.66	11.74	0.9749
5	0.00047	0.00058	1.23	2127.66	11.74	0.9684

Tablo 4. 81: %5 N,N'-DMF varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.30 ± 0.04
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	2174.74 ± 21.15
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	12.00 ± 0.12
İntersept	$4.60 \times 10^{-4} \pm 4.47 \times 10^{-6}$
Eğim	$6.00 \times 10^{-4} \pm 1.55 \times 10^{-6}$



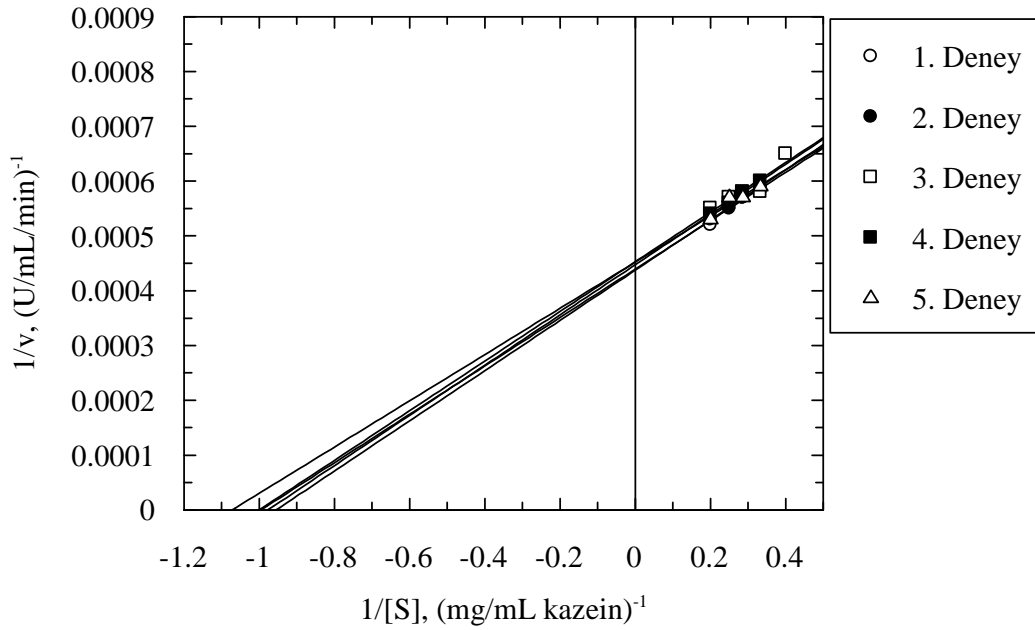
Şekil 4. 116: %7.5 N,N'-DMF varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı

Tablo 4. 82: %7.5 N,N'-DMF varlığında enzimin Şekil 4.116'daki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00045	0.00048	1.07	2222.22	12.26	0.9841
2	0.00044	0.00052	1.18	2272.73	12.54	0.9263
3	0.00047	0.00049	1.04	2127.66	11.74	0.9584
4	0.00047	0.00047	1.00	2127.66	11.74	0.9887
5	0.00044	0.00048	1.09	2272.73	12.54	0.9942

Tablo 4. 83: %7.5 N,N'-DMF varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.07 ± 0.03
V_m (μ g tirozin /mL/dak)	2204.60 ± 32.74
Dönüştürülen V_m (μ mol tirozin/mL/dak)	12.17 ± 0.18
İntersept	$4.54 \times 10^{-4} \pm 6.78 \times 10^{-6}$
Eğim	$4.88 \times 10^{-4} \pm 8.60 \times 10^{-6}$



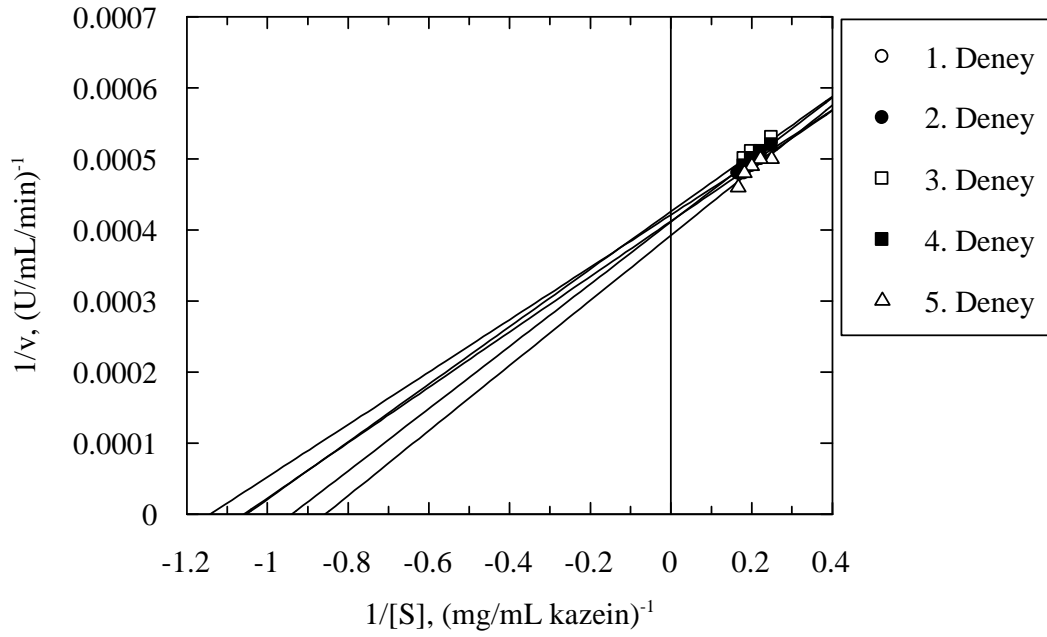
Şekil 4. 117: %10 N,N'-DMF varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı

Tablo 4. 84: %10 N,N'-DMF varlığında enzimin 4.117'deki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deneý No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ g tirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00044	0.00044	1.00	2272.73	12.54	0.9445
2	0.00044	0.00046	1.05	2272.73	12.54	0.9982
3	0.00045	0.00045	1.00	2222.22	12.26	0.9199
4	0.00045	0.00046	1.02	2222.22	12.26	0.9982
5	0.00045	0.00042	0.93	2222.22	12.26	0.9429

Tablo 4. 85: %10 N,N'-DMF varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerle ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.00 ± 0.02
V_m (μ g tirozin /mL/dak)	2242.42 ± 12.37
Dönüştürülen V_m , (μ moltirozin/mL/dak)	12.38 ± 0.07
İntersept	$4.46 \times 10^{-4} \pm 2.45 \times 10^{-6}$
Eğim	$4.46 \times 10^{-4} \pm 7.48 \times 10^{-6}$



Şekil 4. 118: % 15 N,N'-DMF varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver-Burk diyagramı

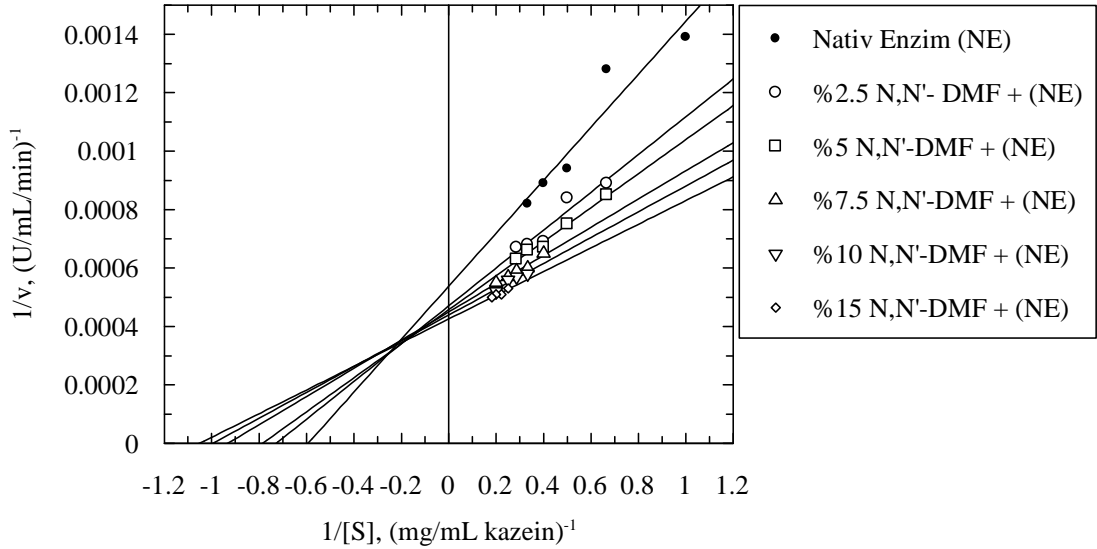
Tablo 4. 86: % 15 N,N'-DMF varlığında enzimin 4.118'deki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deneý No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ g tirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00042	0.00037	0.88	2380.95	13.14	0.914
2	0.00041	0.00039	0.95	2439.02	13.46	0.9654
3	0.00043	0.00041	0.95	2325.58	12.84	0.9442
4	0.00041	0.00044	1.07	2439.02	13.46	0.9951
5	0.00039	0.00046	1.18	2564.10	14.15	0.8986

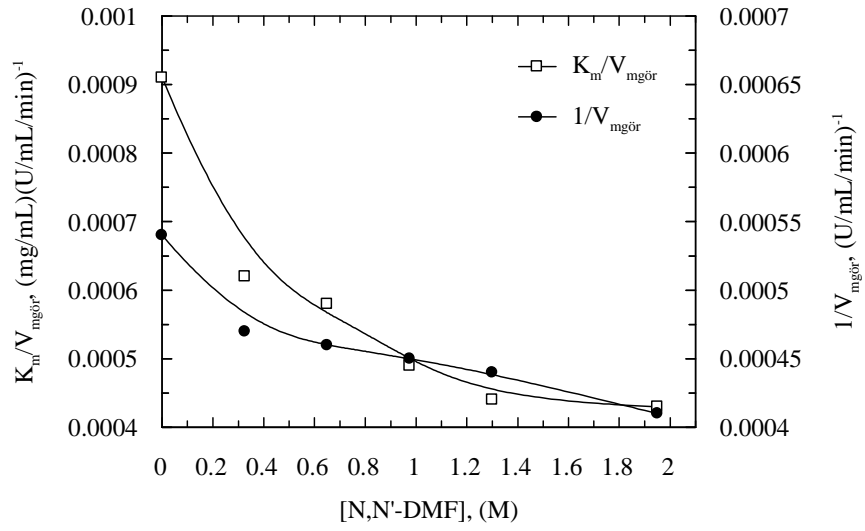
Tablo 4. 87: % 15 N,N'-DMF varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	0.96 ± 0.04
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	2396.15 ± 12.37
Dönüştürülen V_m , (μ moltirozin/mL/dak)	13.22 ± 0.15
İntersept	$4.12 \times 10^{-4} \pm 7.42 \times 10^{-6}$
Eğim	$4.14 \times 10^{-4} \pm 1.82 \times 10^{-6}$

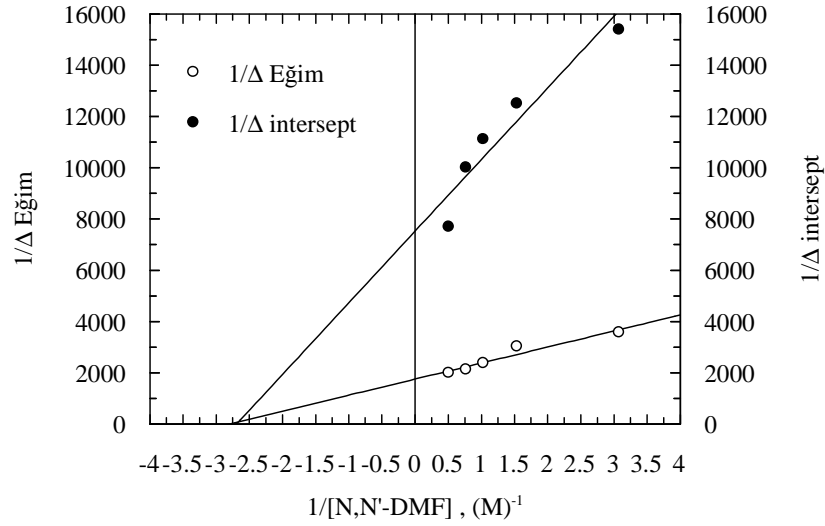
4.78, 4.80, 4.82, 4.84 ve 4.86 no'lu tablolarda 4.79, 4.81, 4.83, 4.85 ve 4.87 no'lu tablolarda verilen ortalama K_m değerlerine en yakın deney numaralarına ait veriler kullanılarak N,N'-DMF'nin çalışılan tüm konsantrasyonları için Şekil 4.119'da gösterilen Lineweaver-Burk diyagramı oluşturulmuştur. Şekil 4.119'da N,N'-DMF'nin artan konsantrasyonları varlığında çizilen Lineweaver-Burk diyagramı, N,N'-DMF'nin 1,4-dioksanda olduğu gibi alkalen proteaz üzerinde zorunlu olmayan aktivasyon etkisi oluşturduğunu göstermektedir. K_A aktivasyon sabitini ve α ve β parametrelerini hesaplayabilmek için Lineweaver-Burk diyagramından elde edilen intersept ve eğimlerden yararlanılarak; bölüm 2.4.2'de belirtildiği gibi; Şekil 4.120 ve 4.121'de gösterilen ikincil ve üçüncül çizimlere gidilmiştir. Şekil 4.120'de gösterilen ikincil çizimden zorunlu olmayan aktivasyonda görülen hiperboller elde edildiğinden ve Şekil 4.121'de gösterilen üçüncül çizimler oluşturulmuş ve lineer doğrular elde edilmiştir. 2.27 no'lu şekilde gösterildiği gibi (2.38) ve (2.39) no'lu eşitliklerden yararlanılarak üçüncül çizimle elde edilen doğruların eğiminden, yatay ve düşey eksenler üzerindeki interseptlerinden yararlanılarak K_A , α ve β parametreleri hesaplanmış ve sonuçlar tablo 4.88'de verilmiştir.



Şekil 4. 119: N,N'-DMF'nin artan konsantrasyonları varlığında oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramı



Şekil 4. 120: N,N'-DMF'nin artan konsantrasyonları varlığında Şekil 4.20'deki doğruların eğim ve interseptlerinin N,N'-DMF'nin konsantrasyonuna karşı işaretlenmesiyle oluşturulan ikincil çizim



Şekil 4. 121: N,N'-DMF'nin artan konsantrasyonları varlığında oluşturulan üçüncül çizim

Tablo 4. 88: N,N'-DMF'nin artan konsantrasyonları varlığında üçüncül çizimlerden yararlanılarak hesaplanan α , β ve K_A değerleri

	$1/[A]-1/\Delta$ İntersept $r= 0.9590$	$1/[A]-1/\Delta$ Eğim $r= 0.9631$
İntersept	7525.67	1755.12
Eğim	2793.60	625.50
β	1.33	-
α	-	0.49
K_A, (M)	1.01	0.97

N,N'-DMF'nin artan konsantrasyonları varlığında alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri olan k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri (3.4) no'lu denklemden, termodinamik parametreleri ise (2.40), (2.41) ve (2.42) no'lu denklemlerden yararlanılarak belirlenmiş ve tablo 4.89'da kinetik parametreler, tablo 4.90'da termodinamik parametreler verilmiştir.

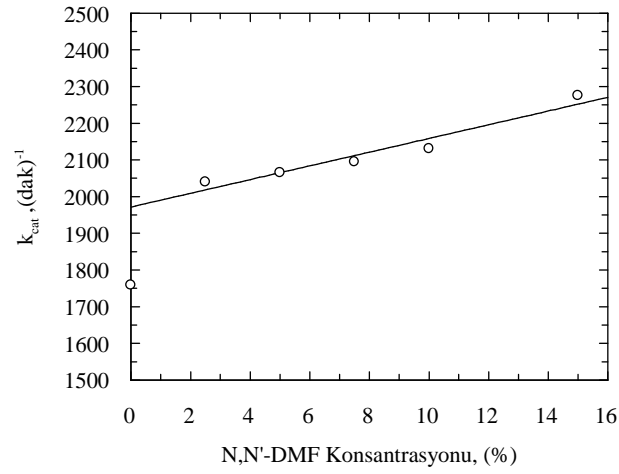
Tablo 4. 89: Artan N,N'-DMF konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri

% N,N'-DMF	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ mol tirozin/mL/min)	k_{cat} (dak) ⁻¹	k_{cat}/K_m (dak) ⁻¹ (mg/mL kazein) ⁻¹
0	1.68	10.22	1759.00	1048.44
2.5	1.35	11.85	2039.61	1510.80
5	1.30	12.00	2065.39	1588.82
7.5	1.07	12.17	2094.73	1957.61
10	1.00	12.38	2130.82	2130.81
15	0.96	13.22	2275.40	2370.19

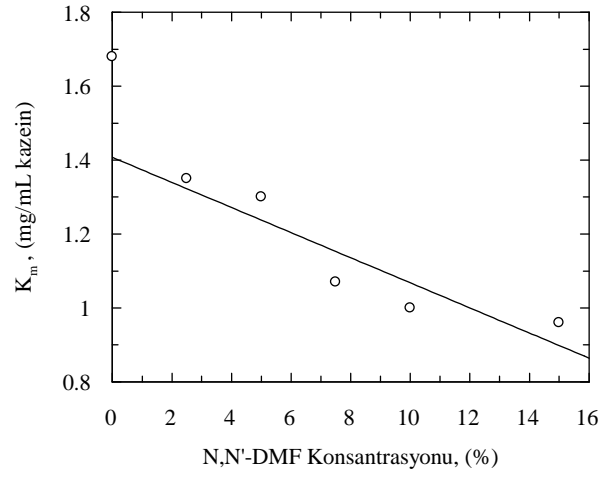
Tablo 4. 90: Artan N,N'-DMF konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin termodinamik parametreleri

% N,N'-DMF	ΔG^\ddagger (kJ/mol)	ΔG^\ddagger_{E-T} (kJ/mol)	ΔG_{E-S} (kJ/mol)
0	65.78	-17.53	1.31
2.5	65.40	-17.91	0.76
5	65.36	-17.97	0.66
7.5	65.33	-17.98	0.17
10	65.29	-18.02	0.00
15	65.12	-18.19	-0.10

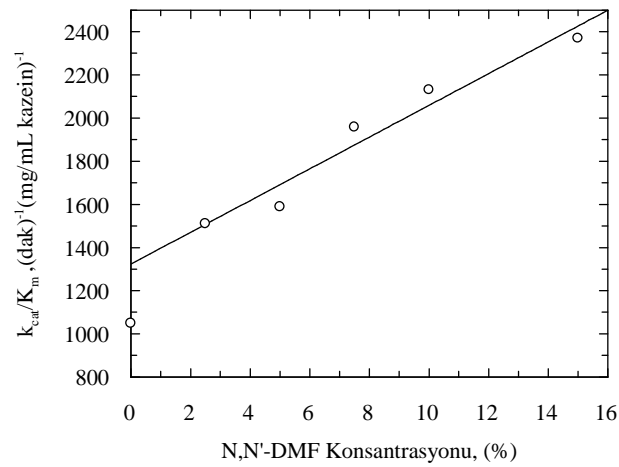
Çalışılan N,N'-DMF konsantrasyonlarına karşı enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri işaretlendiğinde aralarında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Şekil 4.122 ve 4.124 enzimin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin artan N,N'-DMF konsantrasyonları ile lineer olarak arttığı görülmektedir. Şekil 4.123, 4.125, 4.126 ve 4.127 sırasıyla enzimin K_m değerinin, ΔG^\ddagger , ΔG^\ddagger_{E-T} ve ΔG_{E-S} değerlerinin ise artan N,N'-DMF konsantrasyonu ile lineer olarak azaldığını göstermektedir. Bu artış ve azalışlar N,N'-DMF'in enzim üzerindeki zorunlu olmayan aktivasyonunun kinetik ve termodinamik göstergeleridir.



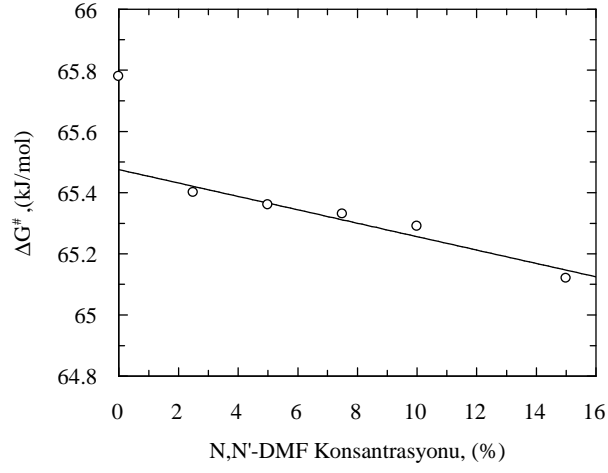
Şekil 4. 122: Alkalen proteazın k_{cat} değerinin artan N,N'-DMF konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= 0.9695$)



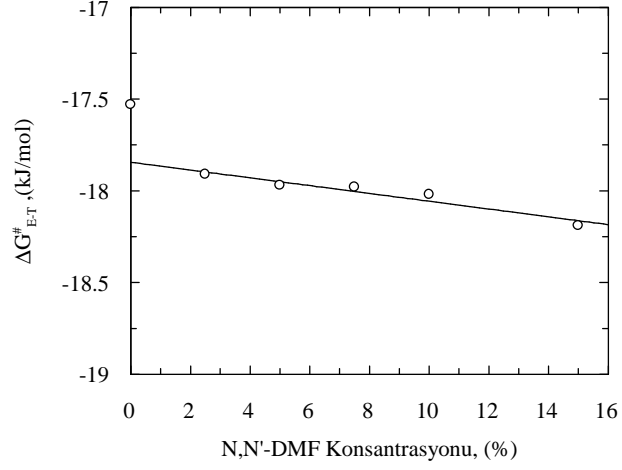
Şekil 4. 123: Alkalen proteazın K_m değerinin artan N,N'-DMF konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= -0.9179$)



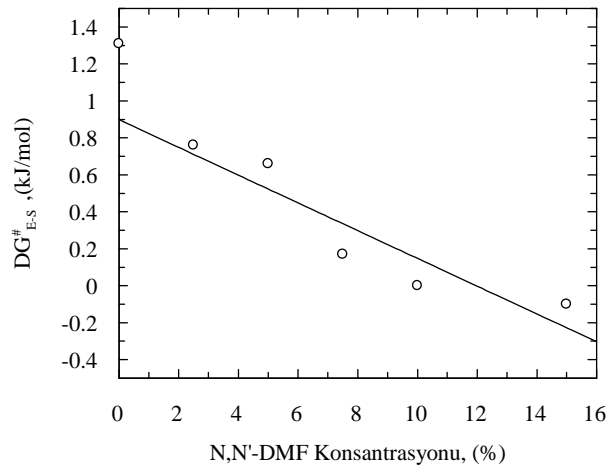
Şekil 4. 124: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerinin artan N,N'-DMF konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= 0.9753$)



Şekil 4. 125: Alkalen proteazın ΔG^{\ddagger} değerinin artan N,N'-DMF konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = -0.9712$)



Şekil 4. 126: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-T}^{\ddagger}$ değerinin artan N,N'-DMF konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = -0.9645$)



Şekil 4. 127: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-S}^{\ddagger}$ değerinin artan N,N'-DMF konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = -0.9260$)

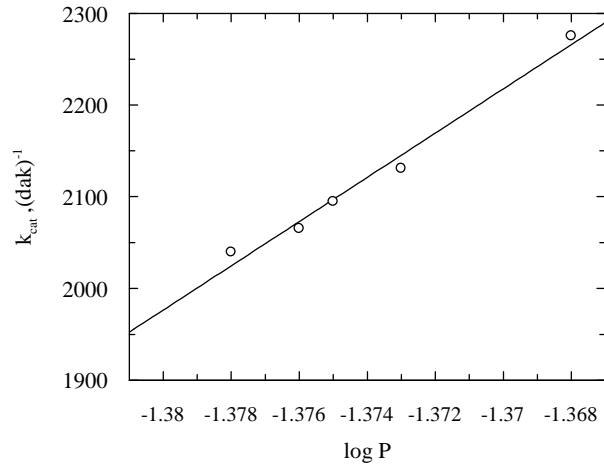
4.1.3.6.2.1 N,N'-DMF varlığında enzimatik katalizi etkileyen faktörlerin enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri ile ilişkilendirilmesi

Artan N,N'-DMF konsantrasyonu ile ilişkili log P değerleri (2.43) no'lu eşitlikten yararlanılarak hesaplanmıştır. Buna göre N,N'-DMF'in çalışılan konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerleri tablo 4.91'de verilmiştir.

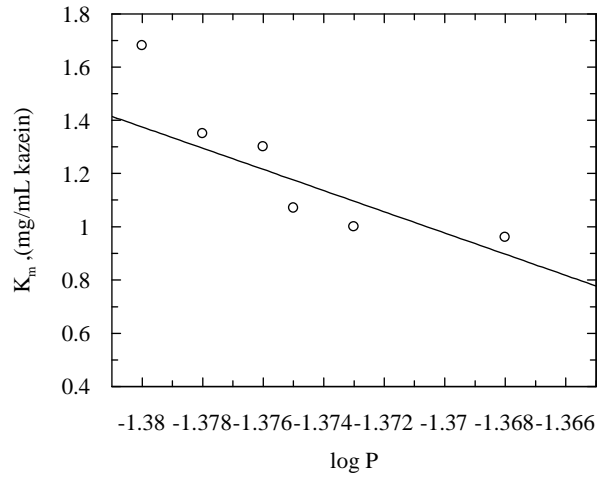
Tablo 4. 91: Artan N,N'-DMF konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri

N,N' – DMF Konsantrasyonu, (%)	Log P
0	-1.380
2.5	-1.378
5	-1.376
7.5	-1.375
10	-1.373
15	-1.368

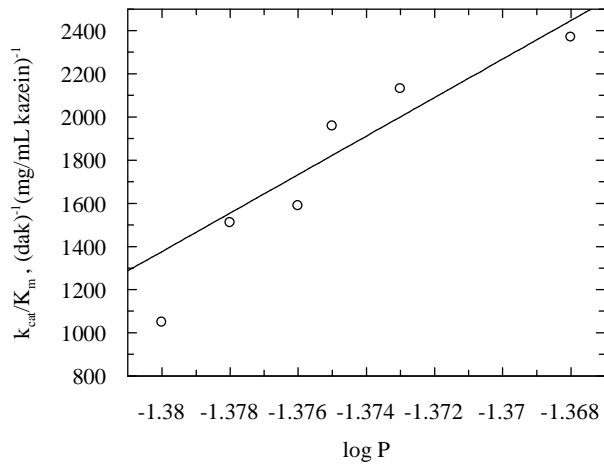
Çalışılan N,N'-DMF konsantrasyonları ile ilişkili log P değerlerine karşı enzimin kinetik (k_{cat} , K_m , k_{cat}/K_m) ve termodinamik parametreleri ($\Delta G^\#$, $\Delta G_{E-T}^\#$ ve ΔG_{E-S}) işaretlendiğinde aralarında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Log P değerlerine karşılık gelen kinetik parametrelerin grafikleri Şekil 4.128, 4.129 ve 4.130'da, termodinamik parametrelere karşılık gelen grafikler şekil 4.131, 4.132 ve 4.133'te gösterilmiştir. Artan N,N'-DMF konsantrasyonlarında enzimin kinetik parametreleri olan k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri artan N,N'-DMF konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı için bu konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerleri ile kinetik parametreler arasında lineer olarak artan ilişki gözlenmiştir. N,N'-DMF'in artan konsantrasyonlarında enzimin K_m değeri azaldığından artan N,N'-DMF konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri ile K_m değerleri arasında doğrusal olarak azalan ilişki vardır. Artan N,N'-DMF konsantrasyonunda enzimin termodinamik parametreleri azaldığından, bu konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerleri ile termodinamik parametreler $\Delta G^\#$, $\Delta G_{E-T}^\#$ ve ΔG_{E-S} arasında lineer olarak azalan ilişkiler belirlenmiştir.



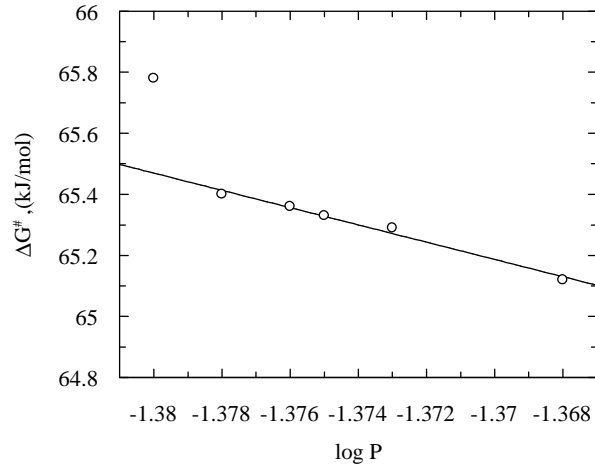
Şekil 4. 128: Artan N,N'-DMF konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin k_{cat} değerlerinin değişimi ($r= 0.9914$)



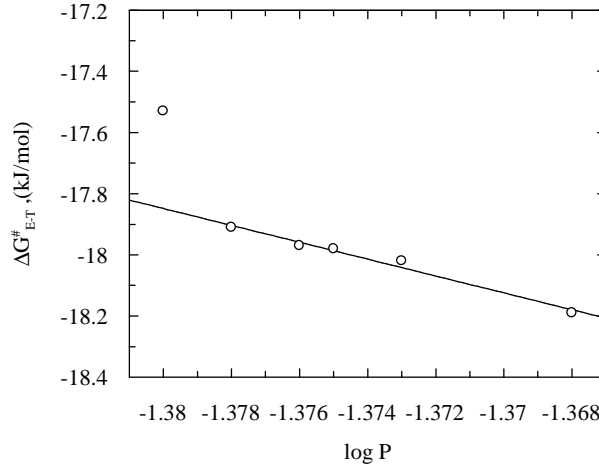
Şekil 4. 129: Artan N,N'-DMF konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin K_m değerlerinin değişimi ($r= -0.8527$)



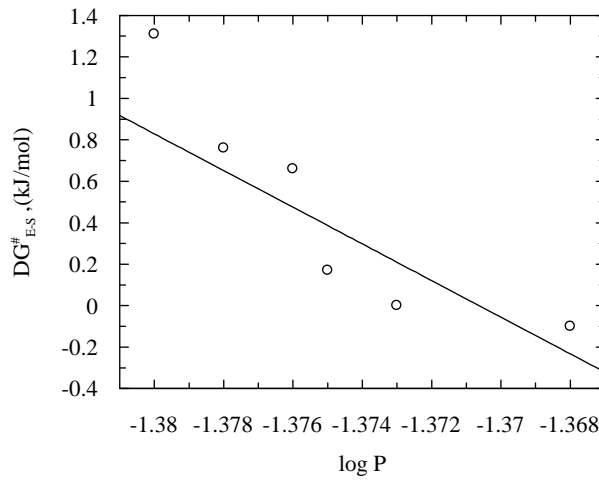
Şekil 4. 130: Artan N,N'-DMF konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin k_{cat}/K_m değerlerinin değişimi ($r= 0.9373$)



Şekil 4. 131: Artan N,N'-DMF konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin $\Delta G^\#$ değerlerinin değişimi ($r = -0.9933$)



Şekil 4. 132: Artan N,N'-DMF konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin $\Delta G^\#_{E-T}$ değerlerinin değişimi ($r = -0.9913$)



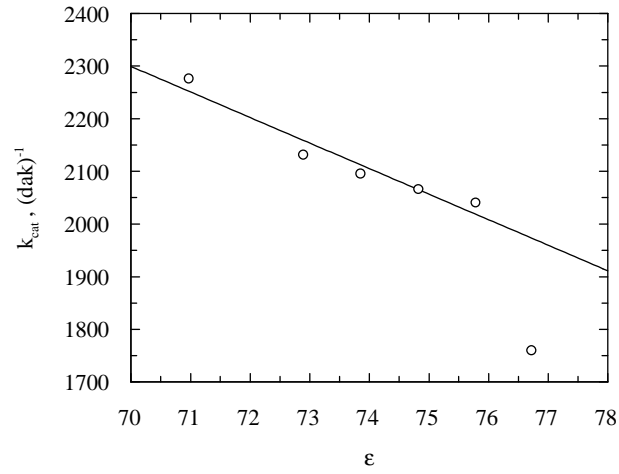
Şekil 4. 133: Artan N,N'-DMF konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin $\Delta G^\#_{E-S}$ değerlerinin değişimi ($r = -0.8638$)

N,N'-DMF'nin 30 °C'deki dielektrik sabiti 38.27 olarak, suyun 25 °C'deki dielektrik sabiti 78.54 ve α değeri 0.20×10^{-2} olarak verilmiştir [90,100]. N,N'-DMF'nin çalışılan %2.5, 5, 7.5 10 ve %15 konsantrasyonlarındaki dielektrik sabitleri (2.46) no'lu eşitlikten yararlanılarak hesaplanmış ve tablo 4.92'de verilmiştir.

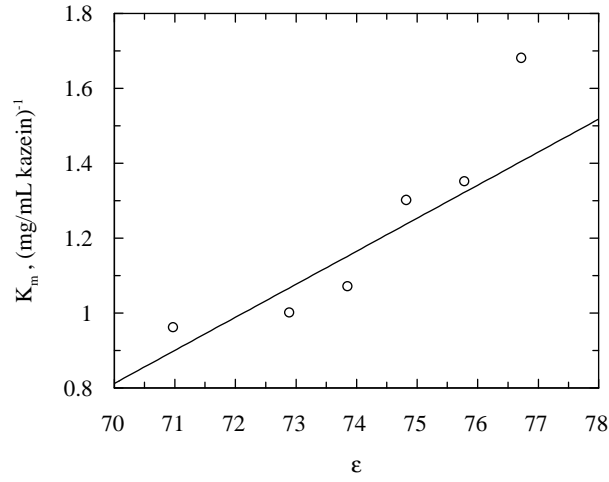
Tablo 4. 92: Artan N,N'-DMF konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri

N,N'-DMF Konsantrasyonu, (%)	Dielektrik sabiti
0	76.75
2.5	75.79
5	74.83
7.5	73.86
10	72.90
15	70.98

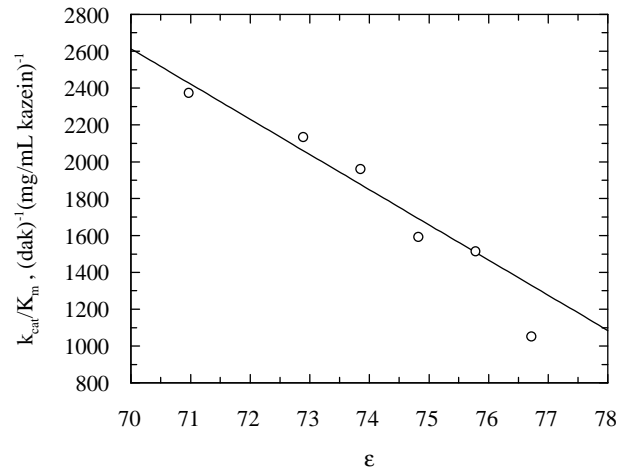
Çalışılan N,N'-DMF konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitlerine karşı enzimin kinetik (k_{cat} , K_m , k_{cat}/K_m) ve termodinamik parametreleri (ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger ve ΔG_{E-S}) işaretlenmiş ve aralarında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Dielektrik sabitlerine karşılık gelen kinetik parametrelerin grafikleri şekil 4.134, 4.135 ve 4.136'da, termodinamik parametrelere karşılık gelen grafikler şekil 4.137, 4.138 ve 4.139'da gösterilmiştir. Artan N,N'-DMF konsantrasyonlarında enzimin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri artmasına karşın dielektrik sabitleri azaldığından k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri ile dielektrik sabitleri arasında lineer olarak azalan ilişkiler gözlenmiştir (Şekil 4.134 ve 4.136). Artan N,N'-DMF konsantrasyonlarında enzimin K_m değerleri değeri azaldığından K_m ile dielektrik sabitleri arasında lineer olarak azalan ilişki gözlenmiştir (Şekil 4.136). Artan N,N'-DMF konsantrasyonlarında enzimin termodinamik parametreleri azalır, bu konsantrasyonlar ile ilişkili dielektrik sabitleri de azaldığından, dielektrik sabitleri ile termodinamik parametreler lineer olarak artan ilişkiler belirlenmiştir (Şekil 4.137, 4.138, 4.139).



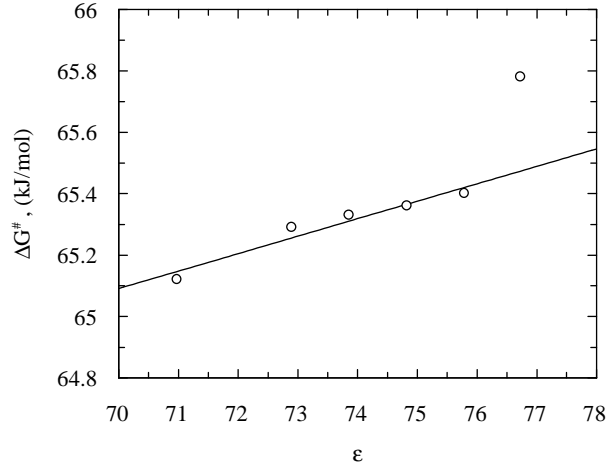
Şekil 4. 134: Alkalen proteazın k_{cat} değerleri ile artan N,N'-DMF konsantrasyonlarıyla ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9692$)



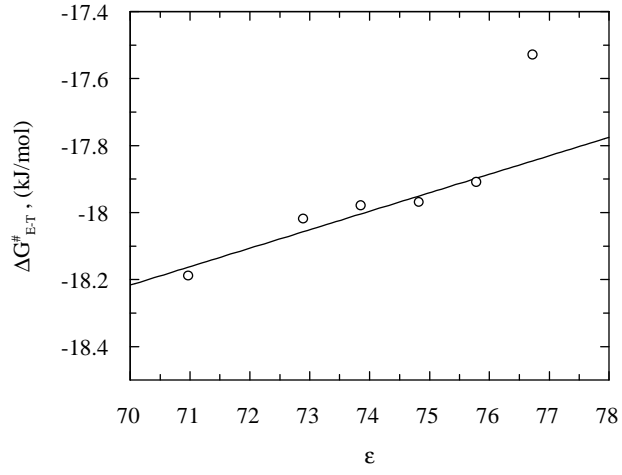
Şekil 4. 135: Alkalen proteazın K_m değerleri ile artan N,N'-DMF konsantrasyonlarıyla ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r = 0.9185$)



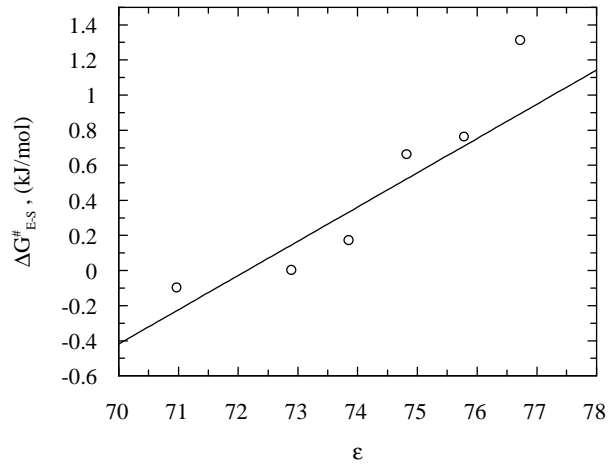
Şekil 4. 136: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerleri ile artan N,N'-DMF konsantrasyonlarıyla ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9756$)



Şekil 4. 137: Alkalen proteazın $\Delta G^{\#}$ değerleri ile artan N,N'-DMF konsantrasyonlarıyla ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r=0.9709$)



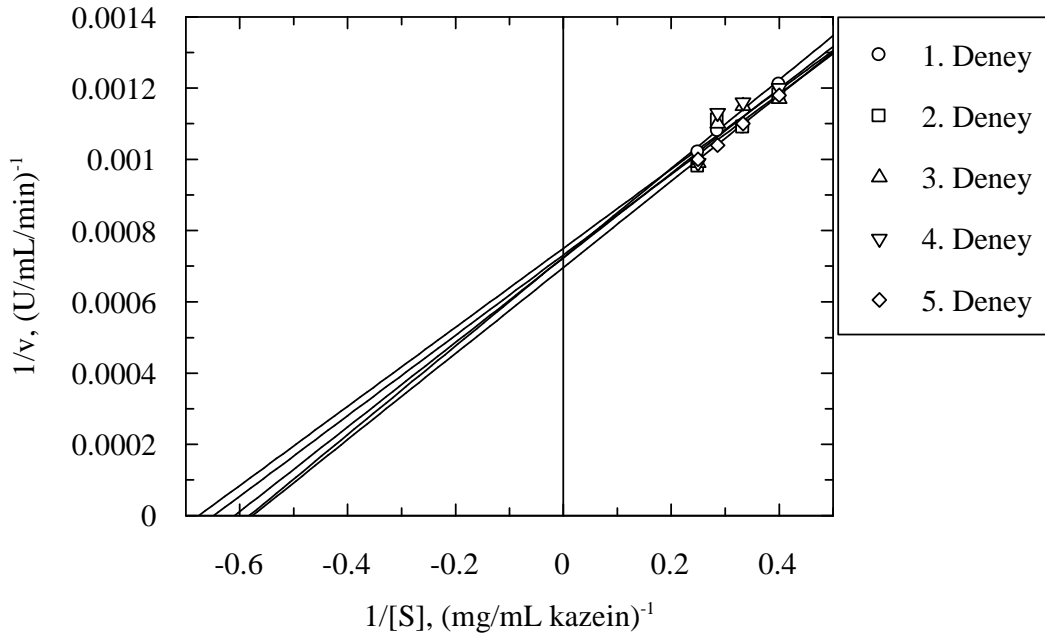
Şekil 4. 138: Alkalen proteazın $\Delta G^{\#}_{E-T}$ değerleri ile artan N,N'-DMF konsantrasyonlarıyla ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r=0.9649$)



Şekil 4. 139: Alkalen proteazın $\Delta G^{\#}_{E-S}$ değerleri ile artan N,N'-DMF konsantrasyonlarıyla ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r=0.9267$)

4.1.3.5.3 Asetonitril varlığında enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

Şekil 4.7’de görüldüğü gibi asetonitril varlığında aktivasyon %30 konsantrasyonundan sonra görüldüğü için asetonitril varlığında %32.5, 35, 37.5, 40, 42.5 ve %45 konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Bu konsantrasyonlar için oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramları şekil 4.140, 4.141, 4.142, 4.143, 4.144 ve 4.145’te gösterilmiştir. Çalışılan asetonitril konsantrasyonları varlığında Folin-Ciocalteu reaktifi içermeyen yöntem ile belirlenen K_m ve V_m değerleri ile oluşturulan doğruların interseptleri ve eğimleri sırasıyla tablo 4.93, 4.95, 4.97, 4.99, 4.101 ve 4.103’te verilmiştir. Hesap ile bulunan K_m ve V_m değerlerinin ortalamaları ile doğruların y eksenini kestiği noktalar olan interseptleri ve eğimlerinin ortalamaları, standart sapmaları ile birlikte tablo 4.94, 4.96, 4.98, 4.100, 4.102 ve 4.104’te verilmiştir.



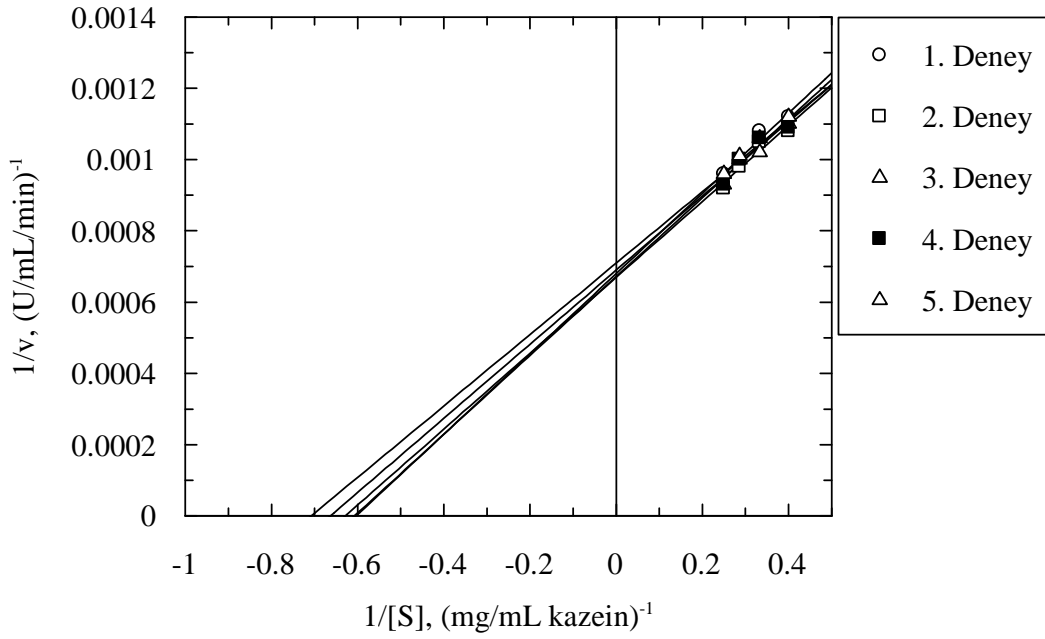
Şekil 4. 140: %32.5 Asetonitril varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 93: %32.5 Asetonitril varlığında enzimin Şekil 4.140'taki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deneý No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00072	0.00119	1.65	1388.89	7.67	0.9664
2	0.00073	0.00113	1.55	1369.86	7.56	0.8828
3	0.00075	0.00111	1.48	1333.33	7.36	0.8925
4	0.00073	0.00124	1.70	1369.86	7.56	0.8837
5	0.0007	0.00121	1.73	1428.57	7.88	0.9998

Tablo 4. 94: %32.5 Asetonitril varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapmalarını içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.62 ± 0.05
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	1378 ± 14.49
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	7.61 ± 0.09
İntersept	$7.26 \times 10^{-4} \pm 8.12 \times 10^{-6}$
Eğim	$1.18 \times 10^{-4} \pm 2.44 \times 10^{-6}$



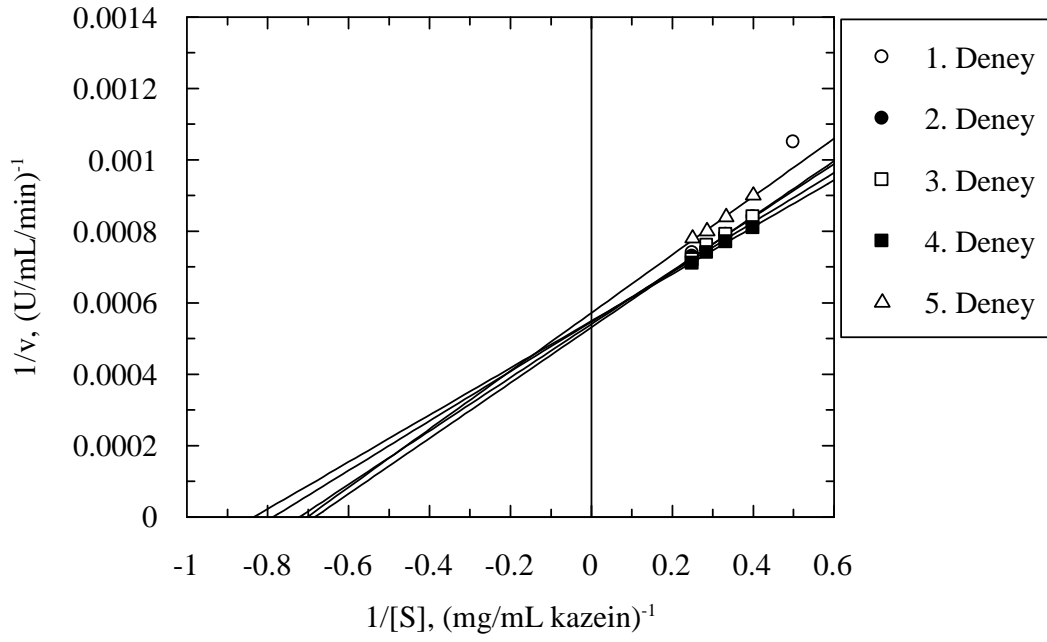
Şekil 4. 141: %35 Asetonitril varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 95: %35 Asetonitril varlığında enzimin 4.141’deki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deneý No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00068	0.00113	1.66	1470.59	8.12	0.9735
2	0.00067	0.00106	1.58	1492.54	8.24	0.9607
3	0.00067	0.00111	1.66	1492.54	8.24	0.9531
4	0.00069	0.00104	1.51	1449.28	8.00	0.9669
5	0.00071	0.00100	1.41	1408.45	7.77	0.9689

Tablo 4. 96: 35% Asetonitril varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapmalarını içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.56 ± 0.05
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	1462 ± 15.75
Dönüştürülen V_m (μ mol tirozin/mL/dak)	8.07 ± 0.09
İntersept	$6.84 \times 10^{-4} \pm 7.48 \times 10^{-6}$
Eğim	$1.11 \times 10^{-3} \pm 2.36 \times 10^{-5}$



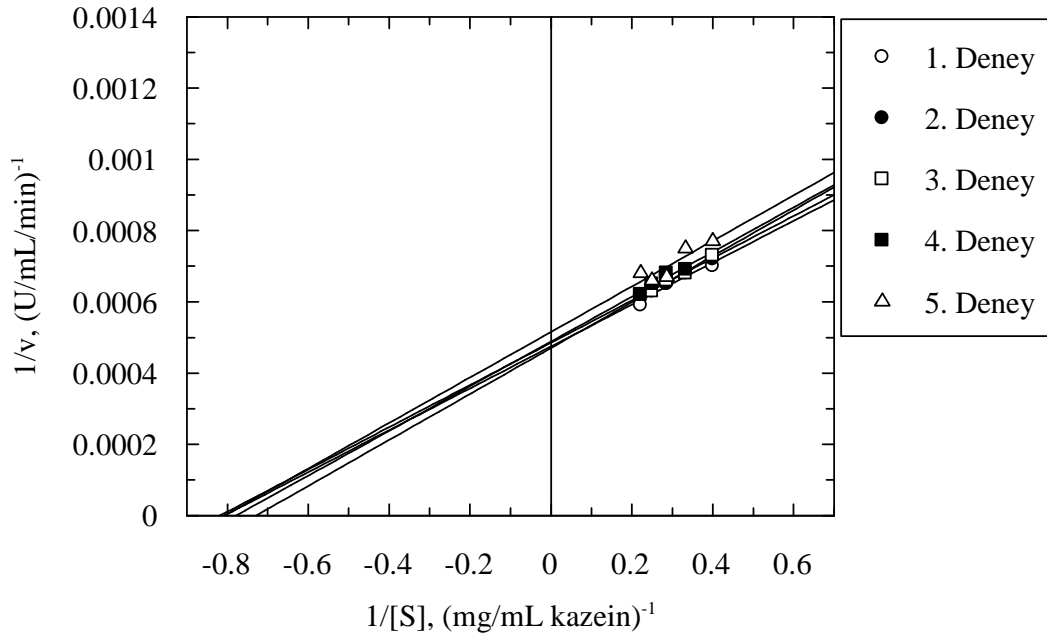
Şekil 4. 142: %37.5 Asetonitril varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 97: %37.5 Asetonitril varlığında enzimin 4.142’deki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deneý No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00055	0.00069	1.25	1818.18	10.03	0.9845
2	0.00054	0.00075	1.39	1851.85	10.22	0.9982
3	0.00053	0.00078	1.47	1886.79	10.41	0.9950
4	0.00055	0.00066	1.20	1818.18	10.03	0.9974
5	0.00057	0.00081	1.42	1754.39	9.68	0.9965

Tablo 4. 98: %37.5 Asetonitril varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapmalarını içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.35 ± 0.051
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	1825.88 ± 21.93
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	10.08 ± 0.121
İntersept	$5.48 \times 10^{-4} \pm 6.63 \times 10^{-6}$
Eğim	$7.38 \times 10^{-4} \pm 2.78 \times 10^{-5}$



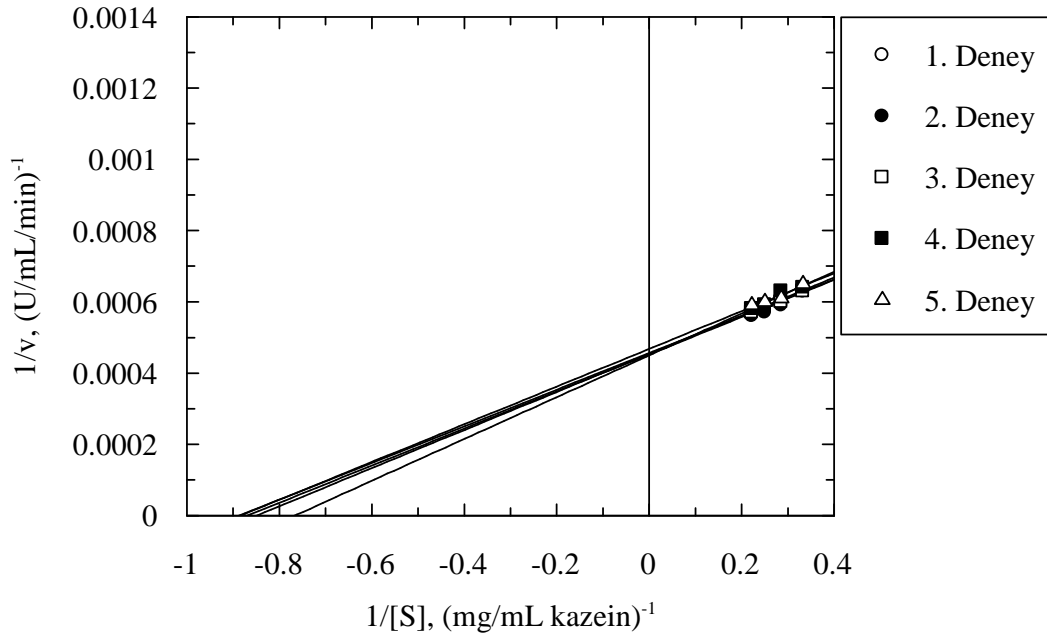
Şekil 4. 143: %40 Asetonitril varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 99: %40 Asetonitril varlığında enzimin 4.143'teki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deneý No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00047	0.00059	1.26	2127.66	11.74	0.9638
2	0.00049	0.00059	1.2	2040.82	11.26	0.9926
3	0.00047	0.00065	1.38	2127.66	11.74	0.9945
4	0.00049	0.00063	1.29	2040.82	11.26	0.9518
5	0.00052	0.00064	1.23	1923.08	10.61	0.8949

Tablo 4. 100: %40 Asetonitril varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapmalarını içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.27 ± 0.03
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	2052.01 ± 37.63
Dönüştürülen V_m (μ mol tirozin/mL/dak)	11.03 ± 0.21
İntersept	$4.88 \times 10^{-4} \pm 9.16 \times 10^{-6}$
Eğim	$6.20 \times 10^{-4} \pm 1.26 \times 10^{-5}$



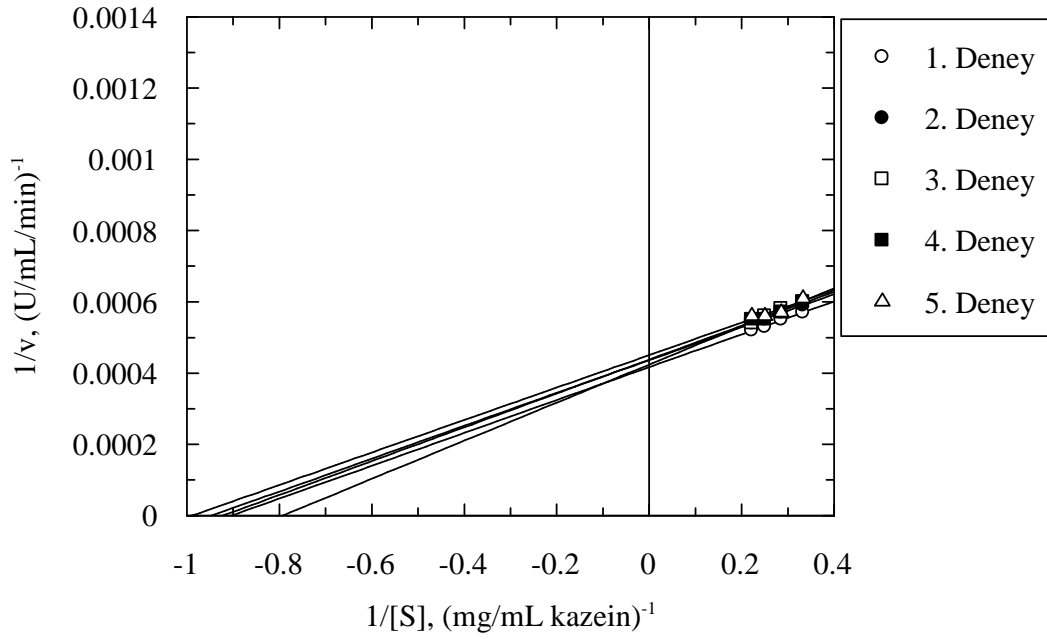
Şekil 4. 144: %42.5 Asetonitril varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 101: %42.5 Asetonitril varlığında enzimin Şekil 4.144'teki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deneý No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00045	0.00053	1.18	2222.22	12.26	0.9934
2	0.00045	0.00052	1.16	2222.22	12.26	0.9445
3	0.00046	0.00052	1.13	2173.91	12.00	0.9891
4	0.00045	0.00059	1.31	2222.22	12.26	0.9563
5	0.00047	0.00053	1.13	2127.66	11.74	0.9654

Tablo 4. 102: %42.5 Asetonitril varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapmalarını içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.18 ± 0.03
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	2193.65 ± 18.96
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	12.11 ± 0.10
İntersept	$4.56 \times 10^{-4} \pm 4.00 \times 10^{-6}$
Eğim	$5.38 \times 10^{-4} \pm 1.32 \times 10^{-5}$



Şekil 4. 145: %45 Asetonitril varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

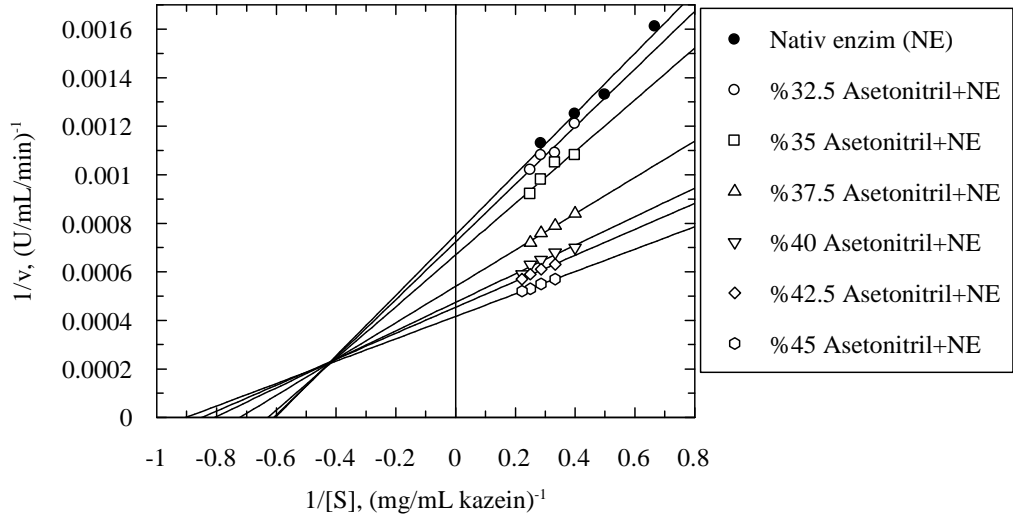
Tablo 4. 103: %45 Asetonitril varlığında enzimin Şekil 4.145'teki Lineweaver-Burk diyagramı ile belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deneý No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00042	0.00046	1.10	2380.95	13.14	0.9977
2	0.00044	0.00046	1.05	2272.73	12.54	0.9977
3	0.00042	0.00053	1.26	2380.95	13.14	0.9934
4	0.00044	0.00048	1.09	2272.73	12.54	0.9642
5	0.00045	0.00046	1.02	2222.22	12.26	0.9184

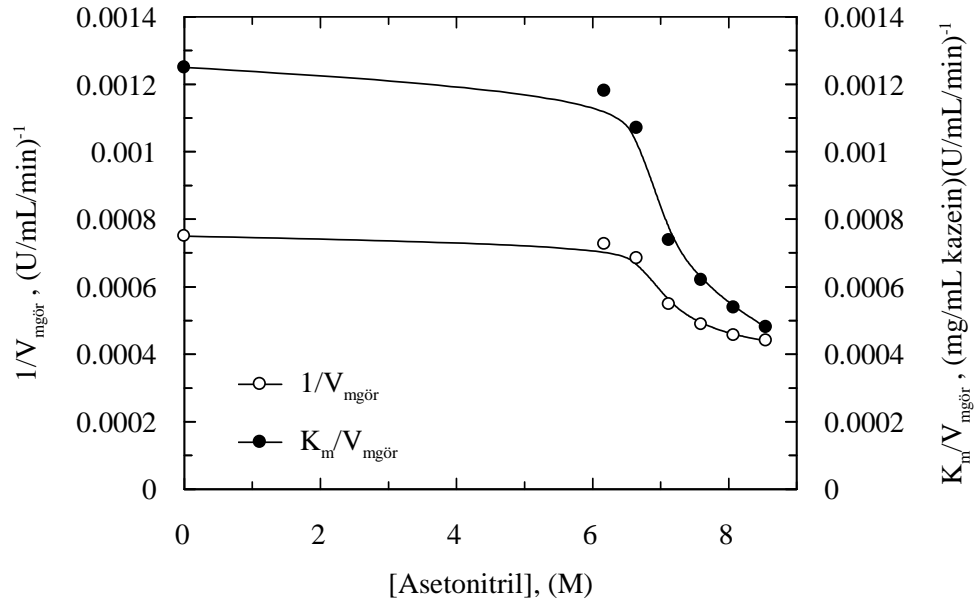
Tablo 4. 104: 45% Asetonitril varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapmalarını içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.10 ± 0.04
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	2305.92 ± 31.99
Dönüştürülen V_m , (μ moltirozin/mL/dak)	12.73 ± 0.18
İntersept	$4.40 \times 10^{-4} \pm 6.00 \times 10^{-6}$
Eğim	$4.78 \times 10^{-4} \pm 1.36 \times 10^{-5}$

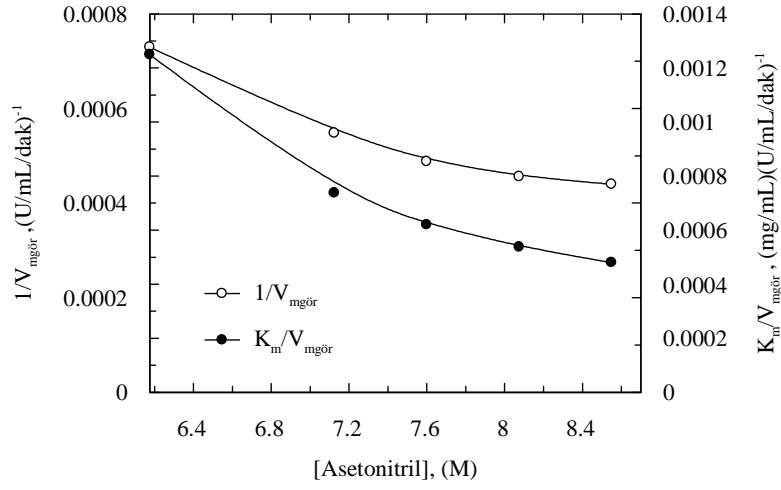
4.93, 4.95, 4.97, 4.101 ve 4.103 no'lu tablolar ile 4.94, 4.96, 4.98, 4.100, 4.102 ve 4.104 nolu tablolarda verilen ortalama K_m değerlerine en yakın deney numaralarına ilişkin veriler kullanılarak asetonitrilin çalışılan tüm konsantrasyonları için Şekil 4.146'da gösterilen Lineweaver-Burk diyagramı oluşturulmuştur. Şekil 4.146'da asetonitrilin artan konsantrasyonları varlığında çizilen Lineweaver-Burk diyagramı, asetonitrilin alkale proteaz üzerinde zorunlu olmayan aktivasyon etkisi oluşturduğunu göstermektedir. K_A aktivasyon sabitini ve α ve β parametrelerini hesaplayabilmek için Lineweaver-Burk diyagramından elde edilen intersept ve eğimlerden yararlanılarak; bölüm 2.4.2'de belirtildiği gibi; Şekil 4.147'de gösterilen ikincil çizime gidilmiştir. Ancak asetonitril varlığında aktivasyon %30 (6 M) konsantrasyondan itibaren gözlendiği için ikincil izim Şekil 4.148'de gösterildiği gibi tekrarlanmıştır. Şekil 4.149'da ise ncl çizim verilmiştir. İkincil izimler zorunlu olmayan aktivasyona uyumlu grafik vermesine rağmen ncl çizimden elde edilen doğrular düşey ekseni solunda ve yatay eksen üzerinde keşişmediğinden α , β parametreleri ve K_A sabiti hesaplanamamıştır. Bu sabit ve parametreler her bir konsantrasyon için ayrı ayrı hesaplanmıştır. 2.3 no'lu eşitlikten yararlanılarak her bir farklı asetonitril %'sindeki k'_{cat} değeri hesaplanmıştır. Bölüm 2.4.2'de belirtildiği gibi $k'_{cat} = \beta x k_{cat}$ olduğundan bulunan k'_{cat} değerleri nativ enzimin k_{cat} değerine bölündüğünde her bir asetonitril %'sindeki β değeri hesaplanmıştır. Şekil 4.146'da verilen Lineweaver-Burk diyagramında tüm doğruların keşiştiği noktanın ordinatı $\frac{1}{V_m} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha - \beta} \right)$ değerine eşitlidir (Şekil 2.26). Formülden yararlanılarak her bir asetonitril %'si için α değeri hesaplanmıştır. Şekil 4.146'daki doğruların eğimlerinden yararlanılarak (2.34) no'lu eşitlikte ifade edildiği gibi asetonitrilin çalışılan tüm konsantrasyonları varlığında K_A değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan, ve parametreleri tablo 4.107'de verilmiştir. α , β ve K_A değerlerinin farklı asetonitril konsantrasyonlarıyla değişimi ise Şekil 4.150, 4.151 ve 4.152'de gösterilmiştir.



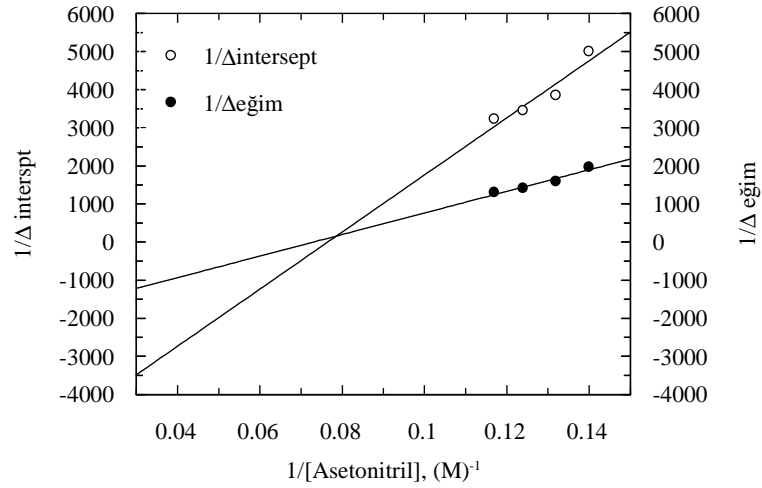
Şekil 4. 146: Asetonitrilin artan konsantrasyonları varlığında oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramı



Şekil 4. 147: Asetonitrilin artan konsantrasyonları varlığında Şekil 4.146'daki doğruların eğim ve interseptlerinin asetonitril konsantrasyonuna karşı işaretlenmesiyle oluşturulan ikincil çizim



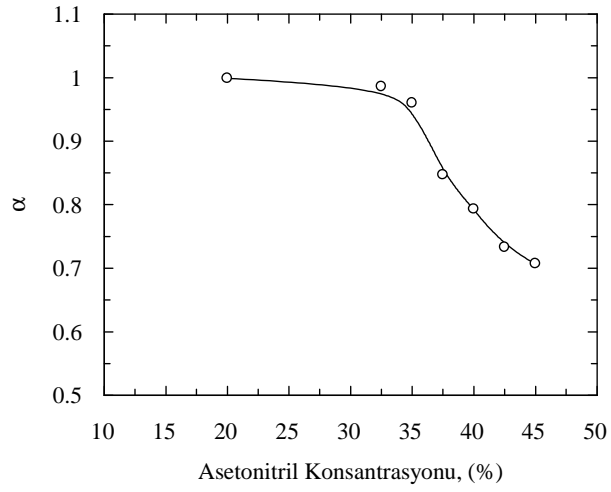
Şekil 4. 148: Asetonitrilin artan konsantrasyonları varlığında tekrarlanan ikincil çizim



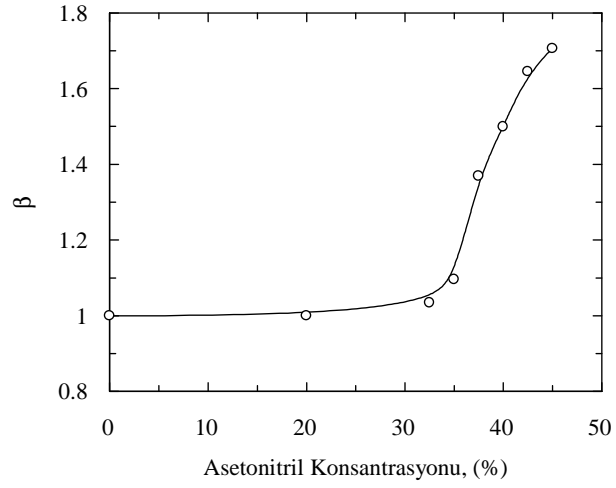
Şekil 4. 149: Asetonitrilin artan konsantrasyonları varlığında üçüncül çizim

Tablo 4. 105: Artan asetonitril konsantrasyonu varlığında hesap ile bulunan α , β , ve K_A parametreleri

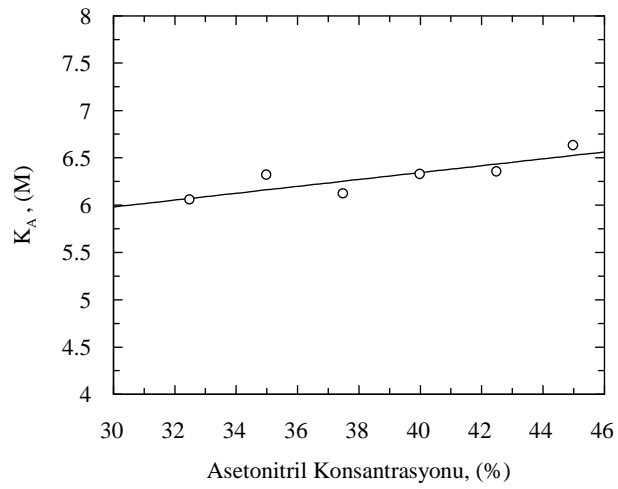
Asetonitril Konsantrasyonu, (%)	α	β	K_A , (M)
0	-	1	-
20	0.999	1	-
32.5	0.987	1.034	6.054
35	0.963	1.098	6.315
37.5	0.862	1.369	6.118
40	0.814	1.499	6.324
42.5	0.760	1.645	6.351
45	0.729	1.729	6.627



Şekil 4. 150: Artan asetonitril konsantrasyonunun hesap ile bulunan α değerleri ile değişimi



Şekil 4. 151: Artan asetonitril konsantrasyonunun hesap ile bulunan β değerleri ile değişimi



Şekil 4. 152: Artan asetonitril konsantrasyonunun hesap ile bulunan K_A değerleri ile değişimi
($r= 8414$)

Asetonitril varlığında gerçekleşen aktivasyon tam olarak zorunlu olmayan aktivasyon modeline oturtulamamıştır, ancak artan asetonitril konsantrasyonunda her bir konsantrasyon için belirlenen K_A değeri birbirine çok yakındır. Buna dayanarak tam olmasa da aktivasyonun zorunlu olmayan aktivasyon modeliyle ifadesini yapmanın büyük hataya neden olmayacağı öngörülebilir. Asetonitrilin artan konsantrasyonları varlığında alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri olan k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri (3.4) no'lu denklemden, termodinamik parametreleri ise (2.40), (2.41) ve (2.42) no'lu denklemlerden yararlanılarak hesaplanmış ve tablo 4.106'da kinetik parametreler, tablo 4.107'de termodinamik parametreler verilmiştir.

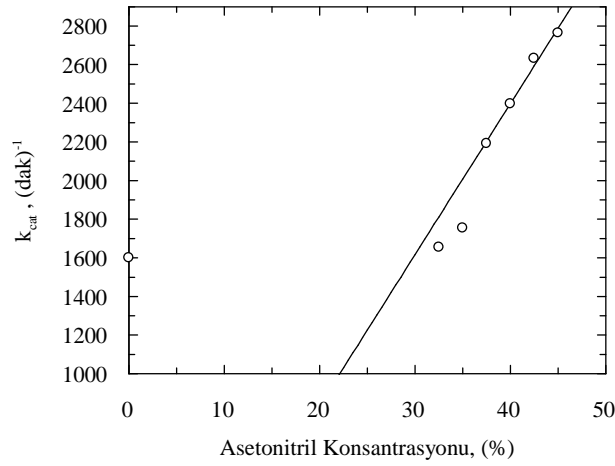
Tablo 4. 106: Artan asetonitril konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri

% Asetonitril	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ moltirozin/mL/min)	k_{cat} (dak) ⁻¹	k_{cat}/K_m (dak) ⁻¹ (mg/mL kazein) ⁻¹
0	1.67	7.36	1600.00	958.12
32.5	1.62	7.61	1654.32	1021.21
35	1.56	8.07	1754.34	1124.59
37.5	1.35	10.08	2191.29	1623.24
40	1.27	11.03	2397.81	1888.11
42.5	1.18	12.11	2632.63	2231.00
45	1.10	12.73	2764.41	2515.34

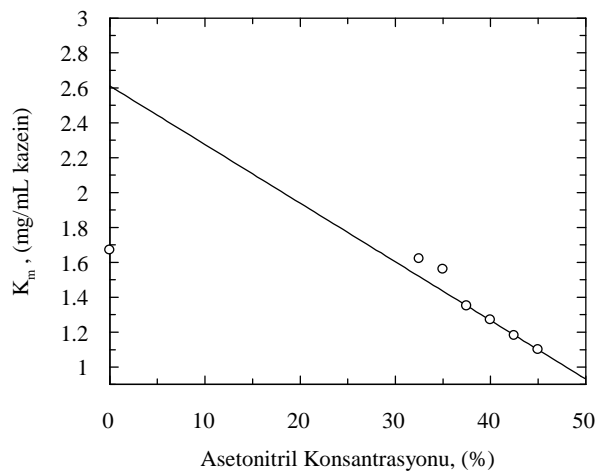
Tablo 4. 107: Artan asetonitril konsantrasyonu varlığında alkalen proteaz enziminin termodinamik parametreleri

% Asetonitril	$\Delta G^\#$ (kJ/mol)	$\Delta G_{E-T}^\#$ (kJ/mol)	ΔG_{E-S} (kJ/mol)
0	66.01	-17.30	1.29
32.5	65.92	-17.39	1.22
35	65.78	-17.53	1.12
37.5	65.21	-18.09	0.76
40	64.99	-18.32	0.60
42.5	64.75	-18.56	0.42
45	64.63	-18.68	0.24

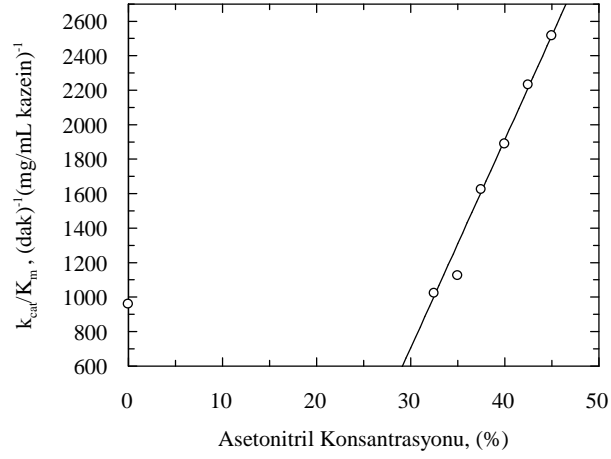
Çalışılan asetonitril konsantrasyonlarına karşı enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri işaretlendiğinde aralarında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Şekil 4.153, 4.155 enzimin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin artan asetonitril konsantrasyonuyla lineer olarak arttığını göstermektedir. Şekil 4.154, 4.156, 4.157 ve 4.158 sırasıyla enzimin K_m değerinin, ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger ve ΔG_{E-S} değerlerinin ise artan asetonitril konsantrasyonu ile lineer olarak azaldığını göstermektedir. Bu artış ve azalışlar asetonitrilin enzim üzerindeki zorunlu olmayan aktivasyonunun kinetik ve termodinamik göstergeleridir.



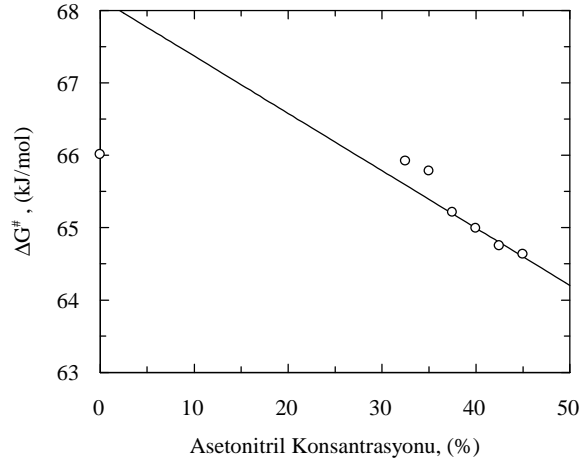
Şekil 4. 153: Alkalen proteazın k_{cat} değerinin artan asetonitril konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= 0.9941$)



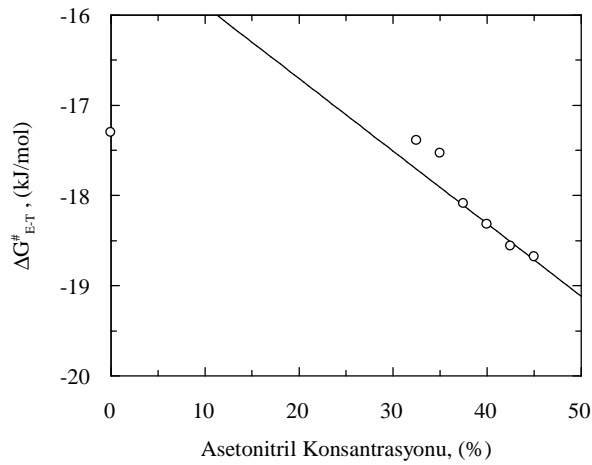
Şekil 4. 154: Alkalen proteazın K_m değerinin artan asetonitril konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r= -0.9997$)



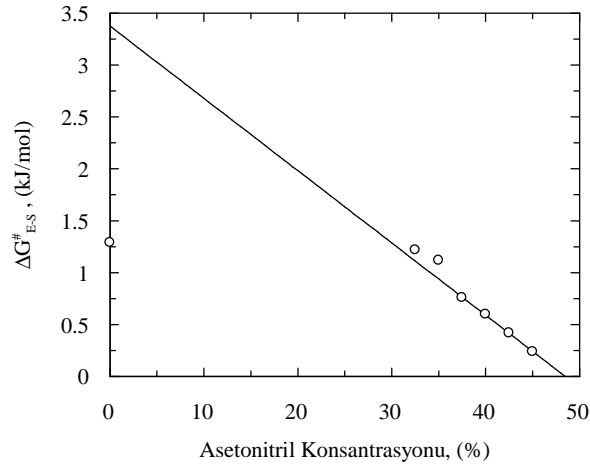
Şekil 4. 155: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerinin artan asetonitril konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= 0.9989$)



Şekil 4. 156: Alkalen proteazın $\Delta G^\#$ değerinin artan asetonitril konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= -0.9912$)



Şekil 4. 157: Alkalen proteazın $\Delta G^\#_{E-T}$ değerinin artan asetonitril konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= -0.9906$)



Şekil 4. 158: Alkalen proteazın ΔG_{E-S} değerinin artan asetonitril konsantrasyonuyla doğrusal değişimi ($r = -0.9996$)

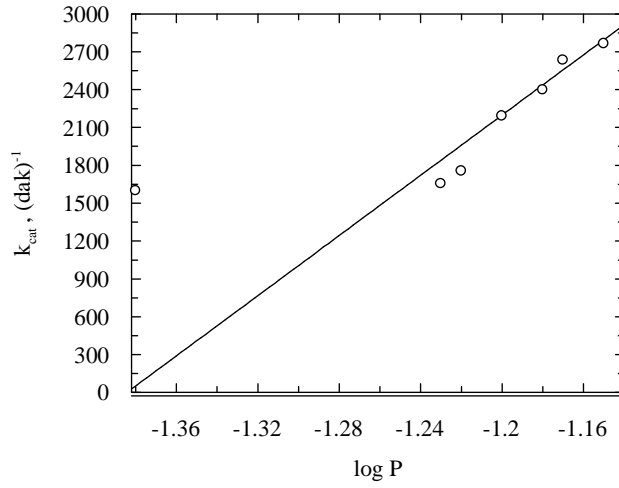
4.1.3.6.3.1 Asetonitril varlığında enzimatik katalizi etkileyen faktörlerin enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri ile ilişkilendirilmesi

Artan asetonitril konsantrasyonu ile ilişkili log P değerleri (2.43) no'lu eşitlikten yararlanılarak hesaplanmıştır. Buna göre asetonitrilin çalışılan konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerleri tablo 4.108'de verilmiştir. Çalışılan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili log P değerlerine karşı enzimin kinetik (k_{cat} , K_m , k_{cat}/K_m) ve termodinamik parametreleri ($\Delta G^{\#}$, $\Delta G_{E-T}^{\#}$ ve ΔG_{E-S}) işaretlendiğinde aralarında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Log P değerlerine karşılık gelen kinetik parametrelerin grafikleri Şekil 4.159, 4.160 ve 4.161'de, termodinamik parametrelere karşılık gelen grafikler şekil 4.162, 4.163 ve 4.164'te gösterilmiştir.

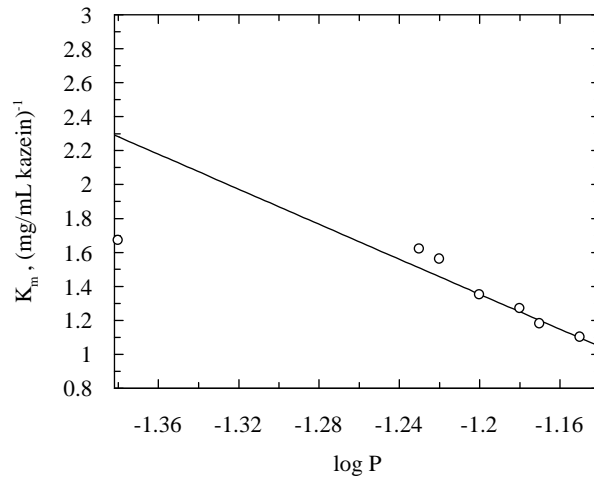
Tablo 4. 108: Artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri

Asetonitril Konsantrasyonu, (%)	Log P
0	-1.38
32.5	-1.23
35	-1.22
37.5	-1.20
40	-1.18
42.5	-1.17
45	-1.15

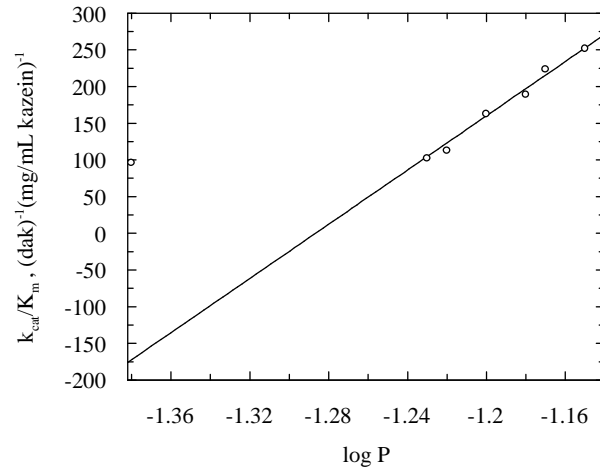
Artan asetonitril konsantrasyonlarında enzimin kinetik parametreleri olan k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri artan asetonitril konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı için bu konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerleri ile kinetik parametreler arasında lineer olarak artan ilişki gözlenmiştir. Asetonitrilin artan konsantrasyonlarında enzimin K_m değeri azaldığından artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri ile K_m değerleri arasında doğrusal olarak azalan ilişki vardır. Artan asetonitril konsantrasyonunda enzimin termodinamik parametreleri azaldığından, bu konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerleri ile termodinamik parametreler ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger ve ΔG_{E-S}^\ddagger arasında lineer olarak azalan ilişkiler belirlenmiştir.



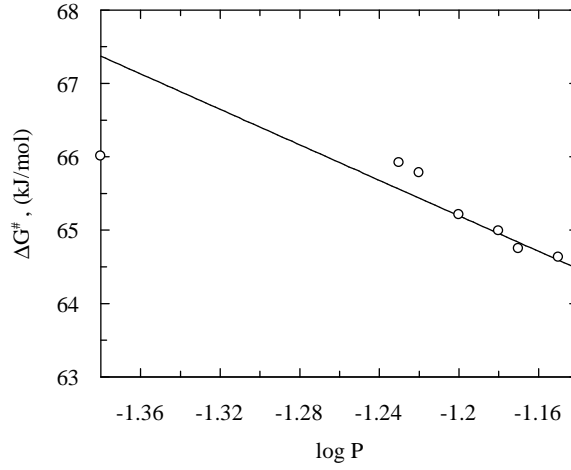
Şekil 4. 159: Artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin k_{cat} değerlerinin değişimi ($r= 0.9788$)



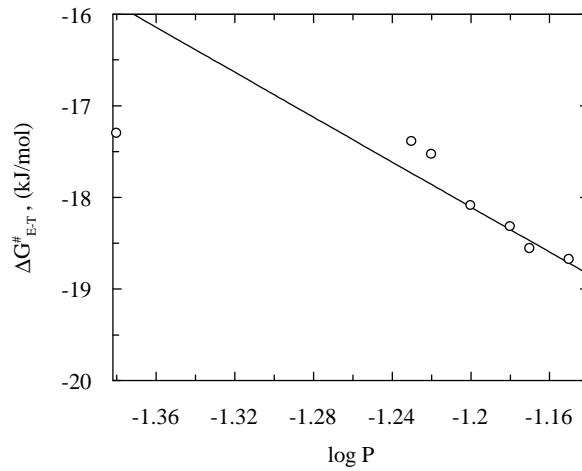
Şekil 4. 160: Artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin K_m değerlerinin değişimi ($r= -0.9890$)



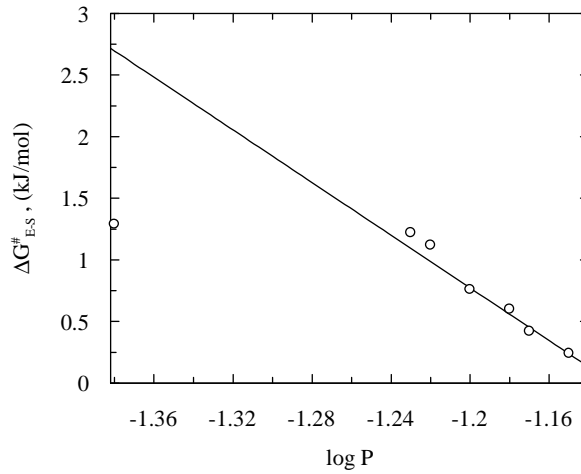
Şekil 4. 161: Artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin k_{cat}/K_m değerlerinin değişimi ($r= 0.9914$)



Şekil 4. 162: Artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin ΔG^\ddagger değerlerinin değişimi ($r= 0.9856$)



Şekil 4. 163: Artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin ΔG^\ddagger_{E-T} değerlerinin değişimi ($r= -0.9849$)

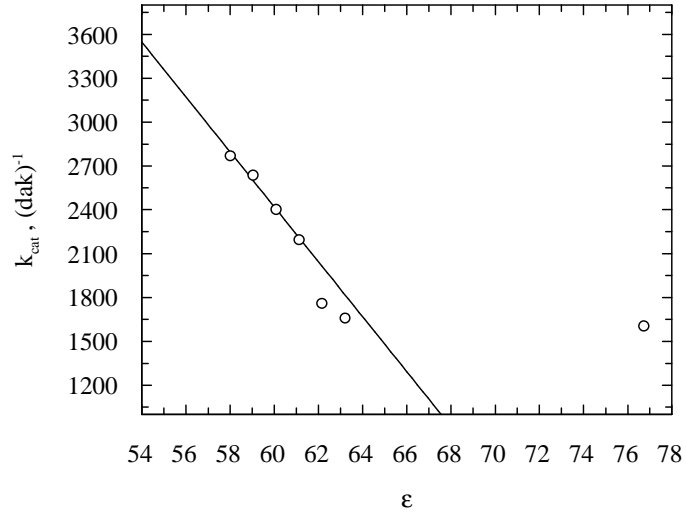


Şekil 4. 164: Artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleri ile enzimin $\Delta G_{E-S}^{\#}$ değerlerinin değişimi ($r = -0.9905$)

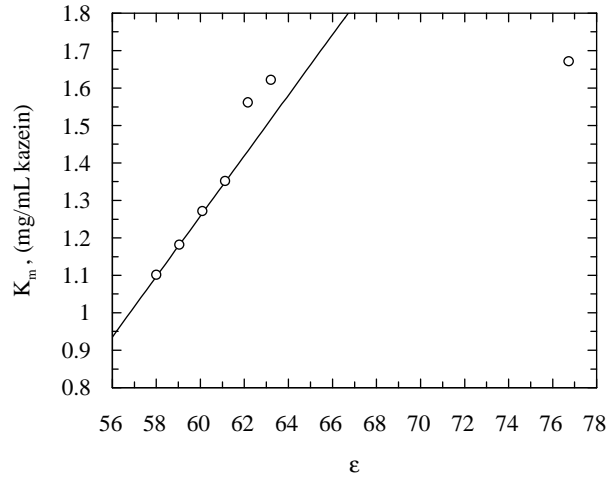
Asetonitrilin 30 °C'deki dielektrik sabiti 35.15 olarak, suyun 25 °C'deki dielektrik sabiti 78.54 ve α değeri 0.20×10^{-2} olarak verilmiştir [100,101]. Asetonitrilin çalışılan %32.5, 35, 37.5 40 42.5 ve %45 konsantrasyonlarındaki dielektrik sabitleri (2.46) no'lu eşitlikten yararlanılarak hesaplanmış ve tablo 4.109'da verilmiştir. Çalışılan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitlerine karşı enzimin kinetik (k_{cat} , K_m , k_{cat}/K_m) ve termodinamik parametreleri ($\Delta G^{\#}$, $\Delta G_{E-T}^{\#}$ ve ΔG_{E-S}) işaretlenmiş ve aralarında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Dielektrik sabitlerine karşılık gelen kinetik parametrelerin grafikleri şekil 4.165, 4.166 ve 4.167'de, termodinamik parametrelere karşılık gelen grafikler şekil 4.168, 4.169 ve 4.170'te gösterilmiştir. Asetonitrilin artan konsantrasyonlarında enzimin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri artmasına karşın k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri ile dielektrik sabitleri arasında lineer olarak azalan ilişkiler gözlenmiştir (Şekil 4.165, 4.167). Asetonitrilin artan konsantrasyonlarında enzimin K_m değeri azaldığından K_m ile dielektrik sabiti arasında lineer olarak artan bir ilişki görülmüştür (Şekil 4.166). Artan asetonitril konsantrasyonunda enzimin termodinamik parametreleri azalıp bu konsantrasyonlar ile ilişkili dielektrik sabitleri azaldığından dielektrik sabitleri ile termodinamik parametreler arasında lineer olarak artan ilişkiler belirlenmiştir (Şekil 4.168, 4.169 ve 4.170).

Tablo 4. 109: Asetonitrilin artan konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri

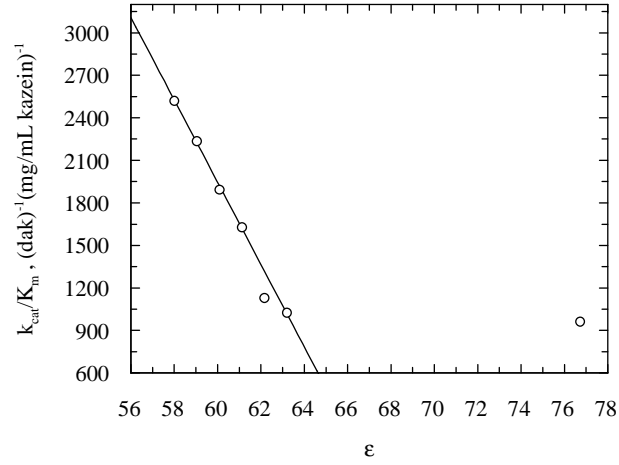
Asetonitril Konsantrasyonu, (%)	Dielektrik sabit
0	76.75
32.5	63.23
35	62.19
37.5	61.15
40	60.11
42.5	59.07
45	58.03



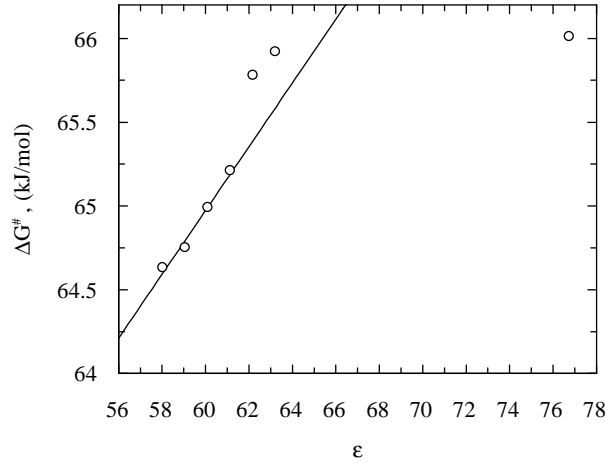
Şekil 4. 165: Alkalin proteazın k_{cat} değerleri ile artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9941$)



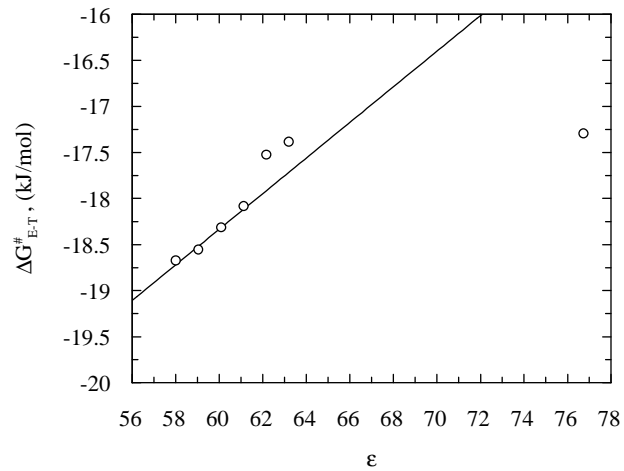
Şekil 4. 166: Alkalin proteazın K_m değerleri ile artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r = 0.9997$)



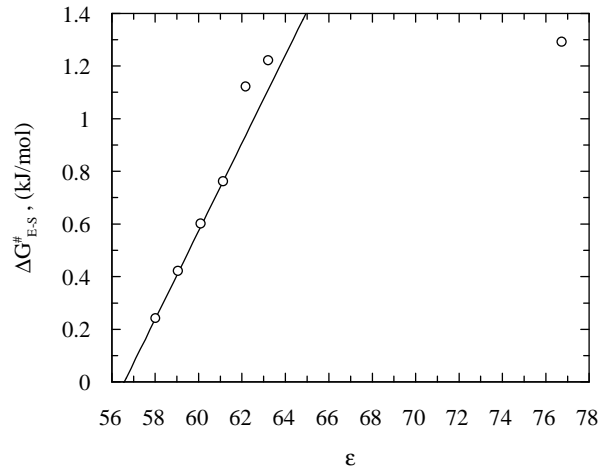
Şekil 4. 167: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerleri ile artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9989$)



Şekil 4. 168: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger değerleri ile artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r = 0.9912$)



Şekil 4. 169: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger_{E-T} değerleri ile artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r = 0.9979$)



Şekil 4. 170: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-S}^{\ddagger}$ değerleri ile artan asetonitril konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9996$)

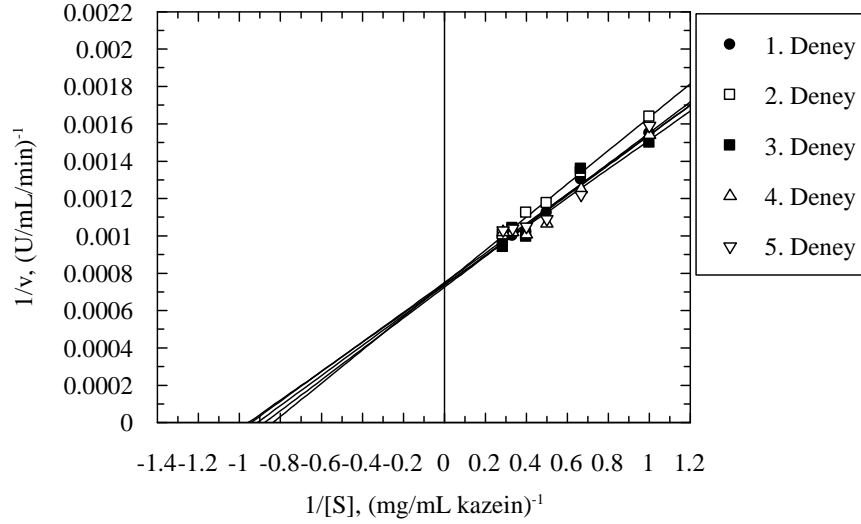
4.1.3.6.4 DMSO varlığında enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

DMSO'nun artan konsantrasyonları varlığında enzim üzerinde; 20% DMSO konsantrasyonuna kadar aktivasyon gözlenmiş, aynı organik çözücünün 30% konsantrasyonundan itibaren ise inhibisyon gözlenmiştir. Bu yüzden bu çözücü varlığında; 20% konsantrasyona kadar aktivasyon kinetiği, 30% konsantrasyonunun üzerinde de inhibisyon kinetiği çalışılmıştır (Şekil 4.9).

4.1.3.6.4.1 DMSO'nun inhibitör etki gösterdiği konsantrasyonlarda enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

DMSO'nun inhibitör etkisini belirlemek üzere %30, 35, 40 ve 45 konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Bu konsantrasyonlarda enzimin kinetik parametrelerini belirlemek için oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramları şekil 4.171, 4.172, 4.173, ve 4.174'te gösterilmiştir. Kinetik parametrelerin belirlenmesi Folin-Ciocalteu reaktifi içermeyen yöntemle yapılmıştır. Çalışılan DMSO konsantrasyonlarında elde edilen Lineweaver-Burk diyagramlarının eğim ve interseptleri ile bunlardan hesaplanan K_m ve V_m değerleri ile oluşturulan doğruların interseptleri ve eğimleri tablo 4.110, 4.112, 4.114, ve 4.116'da verilmiştir.

Hesaplanan K_m ve V_m değerleri ile Linweaver-Burk diyagramlarının intersept ve eğimlerinin ortalamaları, standart sapmaları ile birlikte tablo 4.111, 4.113, 4115, ve 4.117’de verilmiştir.



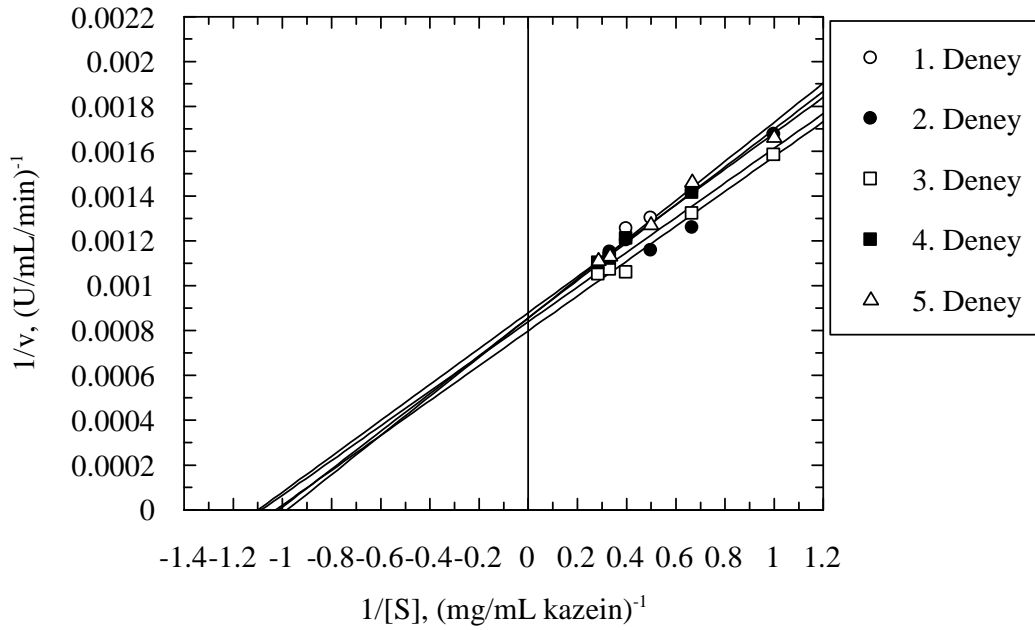
Şekil 4. 171: %30 DMSO varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Linweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 110: %30 DMSO varlığında enzimin Şekil 4.171’deki Linweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deneý No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00077	0.00088	1.14	1369.86	7.56	0.9945
2	0.00075	0.00089	1.19	1333.33	7.36	0.9982
3	0.00073	0.00080	1.10	1369.86	7.56	0.9686
4	0.00070	0.00084	1.04	1351.35	7.46	0.9769
5	0.00071	0.00084	1.05	1333.33	7.36	0.9728

Tablo 4. 111: %30 DMSO varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.10 ± 0.03
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	1351.55 ± 8.17
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	7.46 ± 0.05
İntersept	$7.40 \times 10^{-4} \pm 4.47 \times 10^{-6}$
Eğim	$8.20 \times 10^{-4} \pm 2.09 \times 10^{-5}$



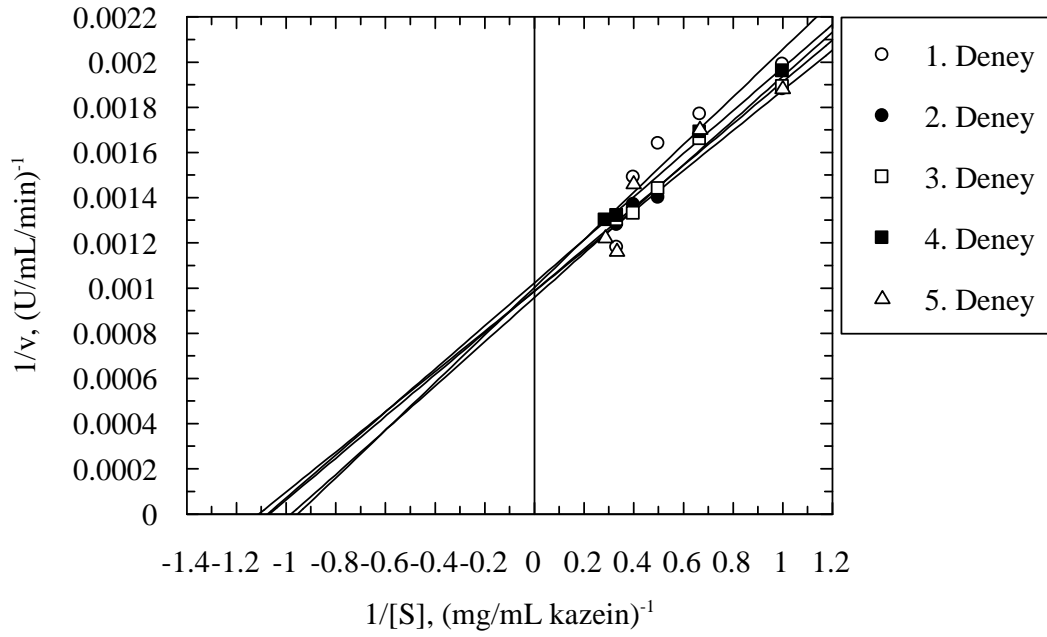
Şekil 4. 172: %35 DMSO varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 112: %35 DMSO varlığında enzimin Şekil 4.172’deki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ g tirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00086	0.00087	1.01	1162.79	6.42	0.9746
2	0.00084	0.00077	0.92	1190.48	6.57	0.9373
3	0.00080	0.00078	0.98	1250.00	6.90	0.9917
4	0.00086	0.00084	0.98	1162.79	6.42	0.9954
5	0.00088	0.00080	0.91	1136.36	6.27	0.9933

Tablo 4. 113: %35 DMSO varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	0.96 ± 0.02
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	1180.48 ± 19.37
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	6.52 ± 0.11
İntersept	$8.50 \times 10^{-4} \pm 1.36 \times 10^{-5}$
Eğim	$8.20 \times 10^{-4} \pm 1.88 \times 10^{-5}$



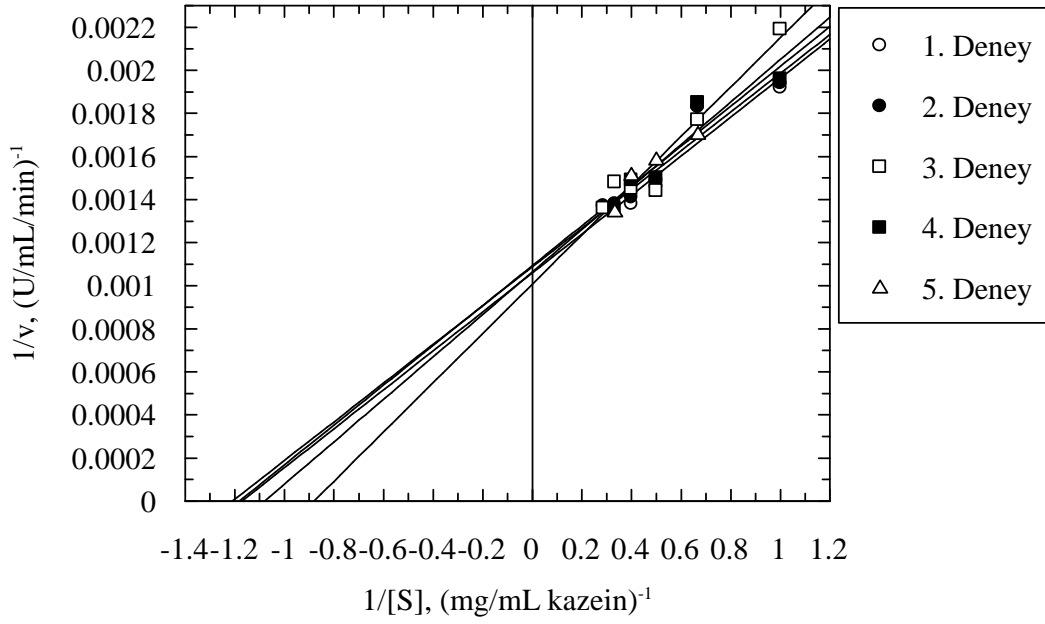
Şekil 4. 173: %40 DMSO varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 114: %40 DMSO varlığında enzimin Şekil 4.173'teki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deney No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00100	0.00091	0.91	1000.00	5.52	0.9224
2	0.00099	0.00089	0.90	1010.10	5.57	0.9960
3	0.00099	0.00093	0.94	1010.10	5.57	0.9909
4	0.00103	0.00089	0.86	970.87	5.36	0.9972
5	0.00096	0.00098	1.02	1041.67	5.75	0.9470

Tablo 4. 115: %40 DMSO varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	0.94 ± 0.03
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	1006.55 ± 11.34
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	5.56 ± 0.06
İntersept	$9.90 \times 10^{-4} \pm 1.12 \times 10^{-5}$
Eğim	$9.20 \times 10^{-4} \pm 1.67 \times 10^{-5}$



Şekil 4. 174: %45 DMSO varlığında alkalin proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

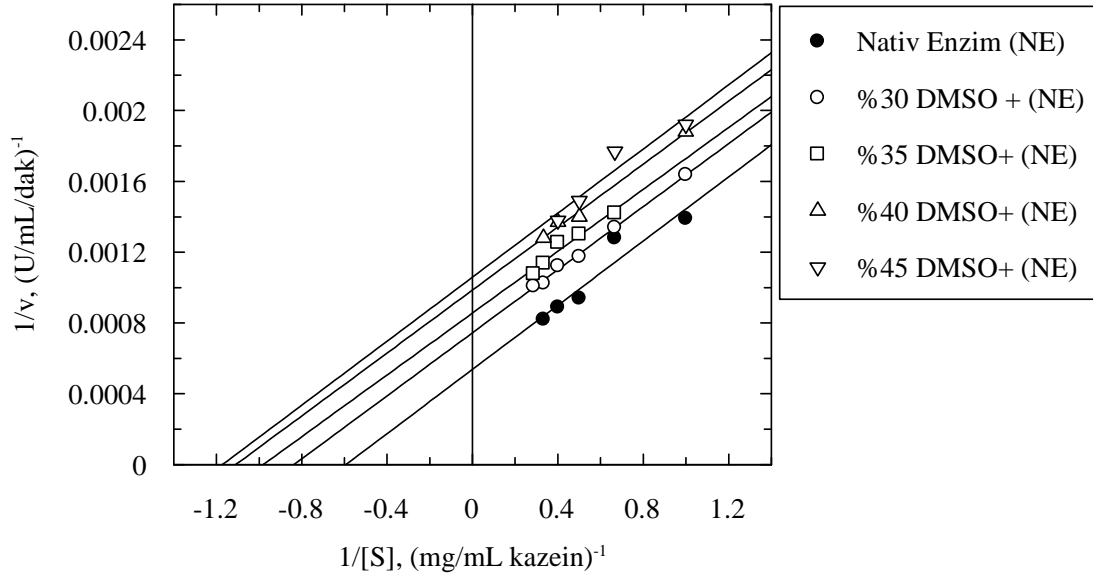
Tablo 4. 116: %45 DMSO varlığında enzimin Şekil 4.174’teki Lineweaver-Burk diyagramıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deneý No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00106	0.0009	0.85	943.40	5.21	0.9570
2	0.00109	0.00090	0.83	917.43	5.06	0.9507
3	0.00101	0.00091	1.13	990.10	5.46	0.9698
4	0.00109	0.00114	0.85	917.43	5.06	0.9645
5	0.00106	0.00099	0.93	943.40	5.21	0.9517

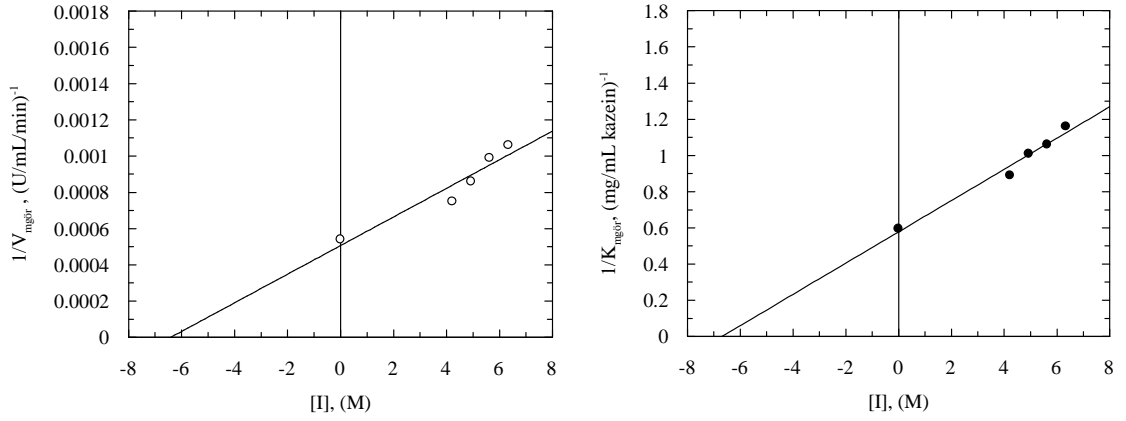
Tablo 4. 117: %45 DMSO varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	0.86 ± 0.06
V_m (μ g tirozin /mL/dak)	942.35 ± 13.27
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	5.20 ± 0.07
İntersept	$1.06 \times 10^{-4} \pm 1.46 \times 10^{-5}$
Eğim	$9.70 \times 10^{-4} \pm 4.51 \times 10^{-5}$

4.110, 4.112, 4.114 ve 4.116 no'lu tablolarla 4.111, 4.113, 4.115 ve 4.117 no'lu tablolarda verilen ortalama K_m değerlerine en yakın deney numaralarına ait veriler kullanılarak DMSO'nun çalışılan tüm konsantrasyonları için Şekil 4.175'te görülen Lineweaver–Burk diyagramı oluşturulmuştur. Şekil 4.175'te görülen Lineweaver–Burk diyagramı, DMSO'nun alkalen proteaz üzerinde un–kompetitif tip inhibisyon oluşturduğunu göstermektedir. İnhibisyonun kısmi ya da gerçek un–kompetitif inhibisyon olduğunu görmek ve K_i inhibisyon sabitini hesaplayabilmek için Lineweaver–Burk diyagramından elde edilen intersept ve eğimlerden yararlanılarak görünen eğim ve interseptlerin inhibitör (DMSO) konsantrasyonlarına karşı işaretlenmesiyle Şekil 4.176'da gösterilen ikincil çizimlere gidilmiştir. İkindil çizimlerden lineer doğrular elde edilmiştir. Bu durum; DMSO'nun artan konsantrasyonları varlığında enzimin gerçek (basit) un–kompetitif inhibisyona uğradığı göstermiştir. Elde edilen doğruların eğiminden, interseptinden, yatay ve düşey eksenler üzerindeki interseptlerinden yararlanılarak K_i değeri hesaplanmıştır (tablo 4.118).



Şekil 4. 175: DMSO'nun artan inhibisyon konsantrasyonları varlığında oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramı



Şekil 4. 176: DMSO'nun artan inhibisyon konsantrasyonları varlığında Şekil 4.175'teki doğruların interseptlerinin ve görünen K_m 'lerinin resiprokalarının DMSO konsantrasyonuna karşı işaretlenmesiyle oluşturulan ikincil çizimi

Tablo 4. 118: Artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları varlığında ikincil çizimlerden yararlanılarak hesaplanan K_i değeri

	$[I]-1/K_{mgör}$ $r= 0.9886$	$[I]-1/V_{mgör}$ $r= 0.9554$
İntersept	0.57824	0.00051
Eğim	0.08635	0.00008
K_i (M)	6.69	6.38

DMSO'nun artan konsantrasyonları varlığında alkalen proteaz enziminin belirlenen kinetik parametreleri (k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri) (3.4) no'lu denklemden, termodinamik parametreleri (ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger , ΔG_{E-S} değerleri) ise (2.40), (2.41) ve (2.42) no'lu denklemlerden yararlanılarak hesaplanmış ve sırasıyla tablo 4.119 ve kinetik parametreler, tablo 4.120'de verilmiştir.

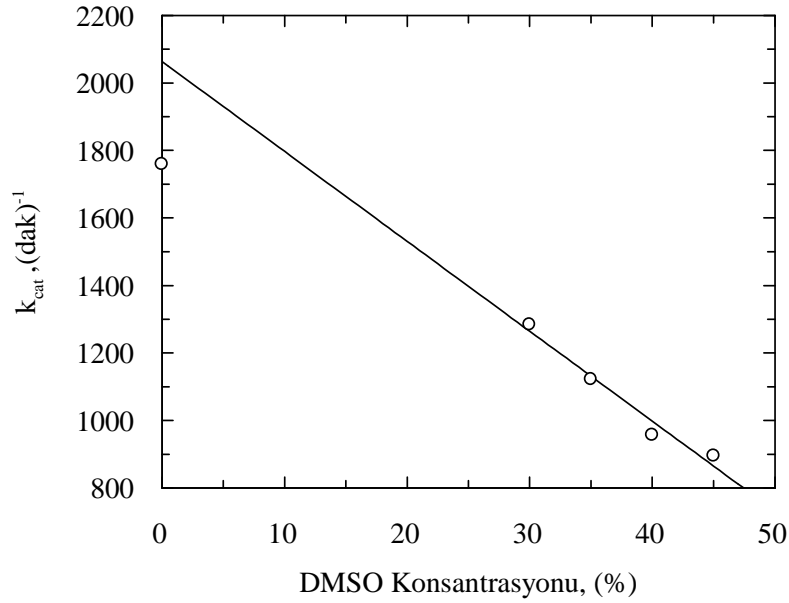
Tablo 4. 119: Artan DMSO konsantrasyonu varlığında inhibisyon olması halinde alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri

% DMSO	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ moltirozin/mL/min)	k_{cat} (dak) ⁻¹	k_{cat}/K_m (dak) ⁻¹ (mg/mL kazein) ⁻¹
0	1.68	10.22	1759.03	1048.44
30	1.10	7.46	1284.02	1167.32
35	0.96	6.52	1122.21	1169.04
40	0.94	5.56	957.04	1018.12
45	0.86	5.20	895.01	1040.69

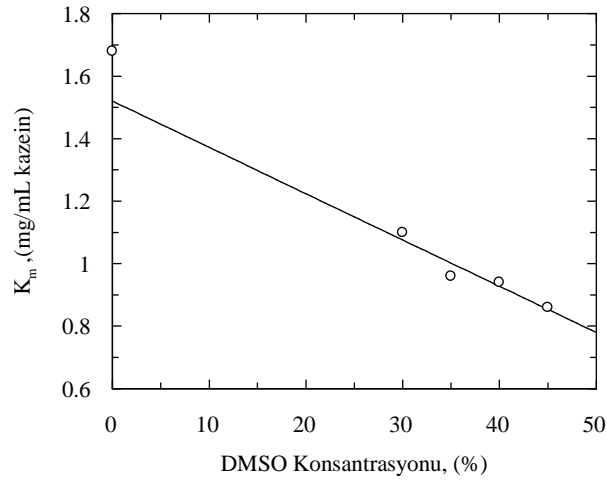
Tablo 4. 120: Artan DMSO konsantrasyonu varlığında inhibisyon olması halinde alkalen proteaz enziminin termodinamik parametreleri

% DMSO	$\Delta G^\#$ (kJ/mol)	$\Delta G_{E-T}^\#$ (kJ/mol)	ΔG_{E-S} (kJ/mol)
0	65.78	-17.53	1.31
30	66.56	-16.75	0.24
35	66.90	-16.41	-0.10
40	67.30	-16.01	-0.16
45	67.47	-15.84	-0.38

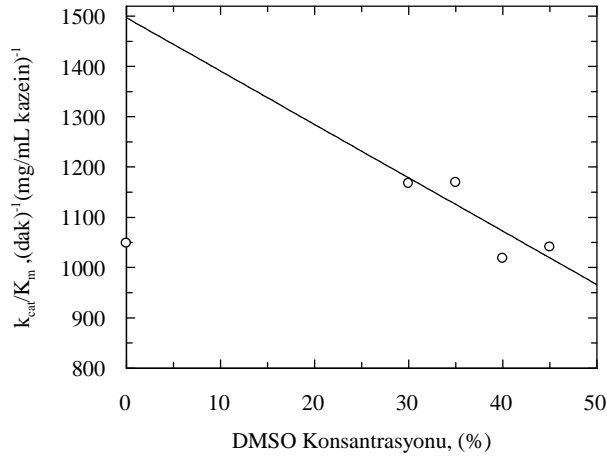
Çalışılan DMSO'in inhibisyon yaptığı konsantrasyonlarına karşı enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri işaretlendiği ve aralarında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Enzimin k_{cat} , K_m ve k_{cat}/K_m değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonu ile lineer olarak azaldığı görülmüştür. Termodinamik parametrelerden $\Delta G^\#$ ve $\Delta G_{E-T}^\#$ 'nin artan DMSO konsantrasyonu ile lineer olarak artmış (Şekil 4.180 ve 4.181) ΔG_{E-S} ise lineer olarak azalmıştır (Şekil 4.182).



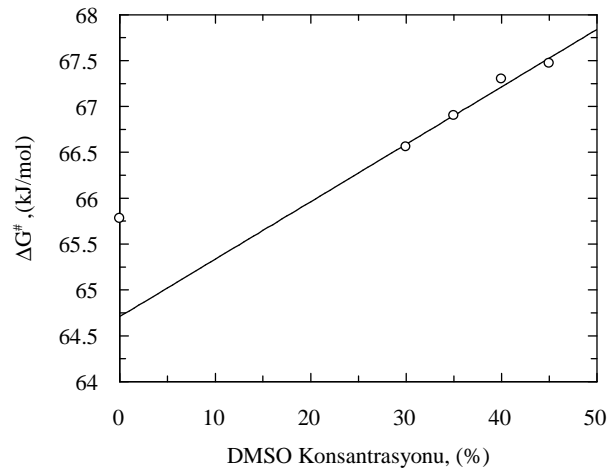
Şekil 4. 177: Alkalen proteazın k_{cat} değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = -0.9832$)



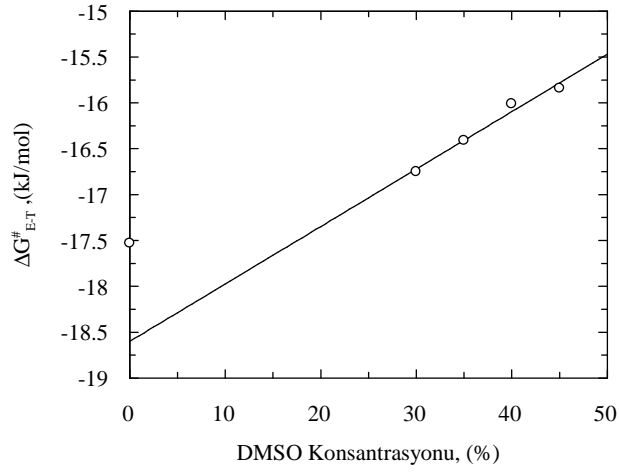
Şekil 4. 178: Alkalen proteazın K_m değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = -0.9569$)



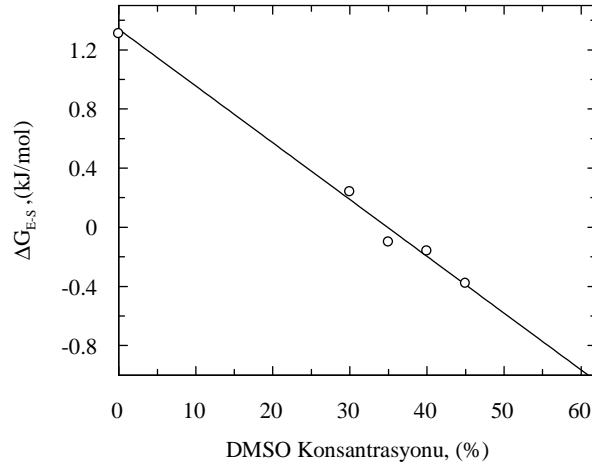
Şekil 4. 179: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = -0.8469$)



Şekil 4. 180: Alkalen proteazın aktivasyon serbest enerjisinin (ΔG^\ddagger) artan DMSO inhibisyon konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = 0.9885$)



Şekil 4. 181: Alkalin proteazın geçiş hali serbest enerjisinin ($\Delta G_{E-T}^{\ddagger}$) artan DMSO inhibisyon konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= 0.8451$)



Şekil 4. 182: Alkalin proteazın substrat bağlama serbest enerjisinin (ΔG_{E-S}) artan DMSO inhibisyon konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= -0.9658$)

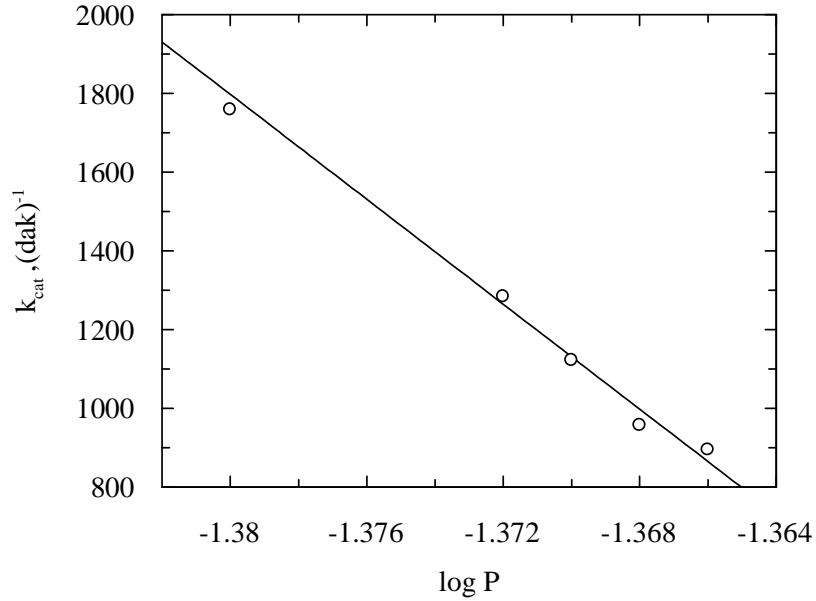
4.1.3.6.4.1.1 DMSO'nun inhibitör etki gösterdiği konsantrasyonlar varlığında enzimatik katalizi etkileyen faktörlerin enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri ile ilişkilendirilmesi

Artan DMSO konsantrasyonu ile ilişkili log P değerleri (2.43) no'lu eşitlikten yararlanılarak hesaplanmıştır. Buna göre DMSO'nun çalışılan konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri tablo 4.121'de verilmiştir.

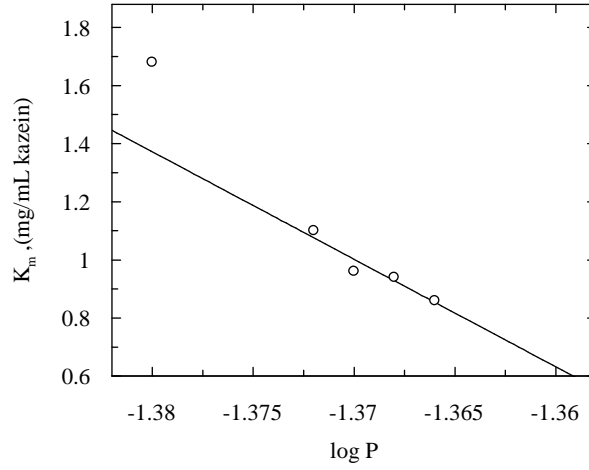
Tablo 4. 121: Artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri

DMSO Konsantrasyonu, (%)	Log P
0	-1.380
30	-1.372
35	-1.370
40	-1.368
45	-1.366

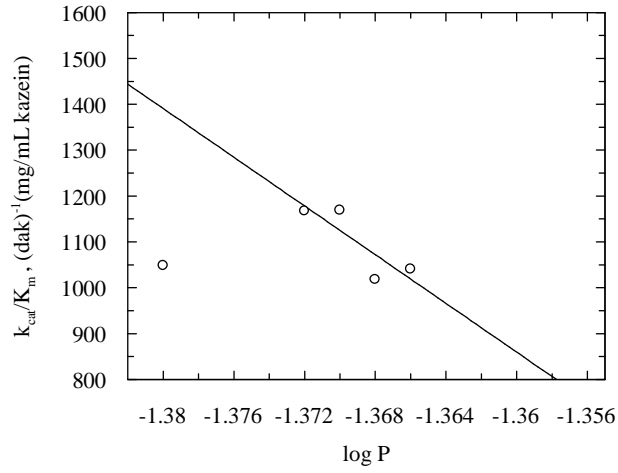
Çalışılan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili log P değerlerine karşılık gelen enzimin kinetik parametreleri (k_{cat} , K_m , k_{cat}/K_m) ve termodinamik parametreleri (ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger ve ΔG_{E-S}) arasında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Log P değerlerine karşılık gelen kinetik parametrelerin grafikleri şekil 4.183, 4.184 ve 4.185'te, termodinamik parametrelere karşılık gelen grafikler şekil 4.186, 4.187 ve 4.188'de gösterilmiştir.



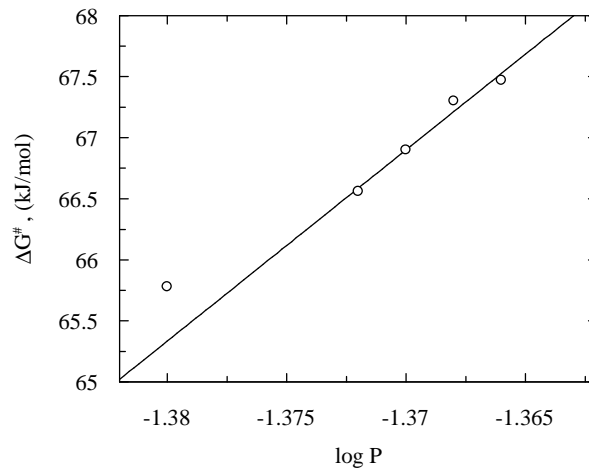
Şekil 4. 183: Alkalin proteazın k_{cat} değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r = -0.9832$)



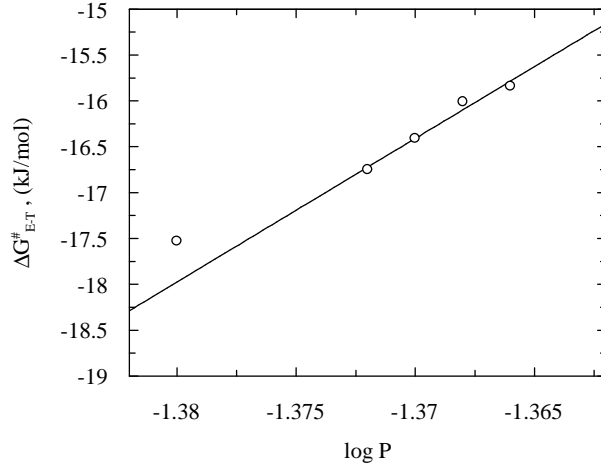
Şekil 4. 184: Alkalin proteazın K_m değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r = -0.9569$)



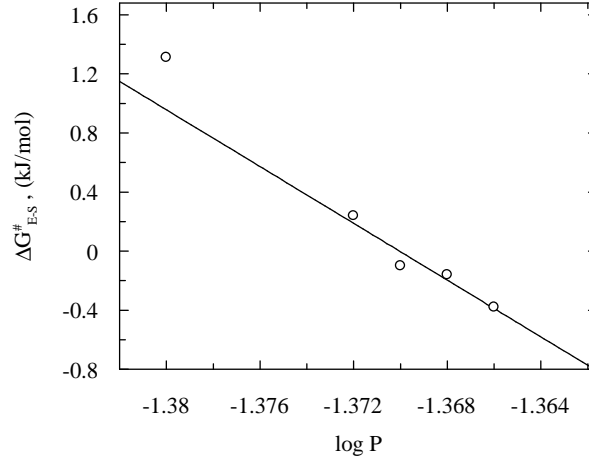
Şekil 4. 185: Alkalin proteazın k_{cat}/K_m değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r = -0.8496$)



Şekil 4. 186: Alkalin proteazın $\Delta G^\#$ değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r = 0.9885$)



Şekil 4. 187: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-T}^{\#}$ değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r= 0.8451$)



Şekil 4. 188: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-S}^{\#}$ değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r= -0.9658$)

Artan DMSO inhibisyon konsantrasyonlarında enzimin kinetik parametreleri olan k_{cat} , K_m ve k_{cat}/K_m değerleri azaldığı için bu konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerlerinde de kinetik parametreler ile doğrusal olarak azalmıştır. Artan DMSO inhibisyon konsantrasyonlarında enzimin $\Delta G^{\#}$, $\Delta G_{E-T}^{\#}$ ve $\Delta G_{E-S}^{\#}$ değerleri arttığından, bu konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerlerinde de lineer olarak değişen artmalar gözlenmiştir. $\Delta G_{E-S}^{\#}$ değerleri sadece K_m ile bağlantılı olduğundan ve un-kompetitif inhibisyonda enzimin K_m değeri artan inhibitör (DMSO)

konsantrasyonu ile azaldığından ΔG_{E-S} değerleri de DMSO ile ilişkili log P değerlerinde lineer olarak azalan ilişki göstermiştir.

DMSO'nun 30 °C'deki dielektrik sabiti 46.95 olarak, suyun 25 °C'deki dielektrik sabiti 78.54 ve α değeri 0.20×10^{-2} olarak verilmiştir [90,100]. DMSO'nun çalışılan %30, 35, ve %45 konsantrasyonlarındaki dielektrik sabitleri (2.46) no'lu eşitlikten yararlanılarak hesaplanmış ve (4.123) no'lu tabloda verilmiştir.

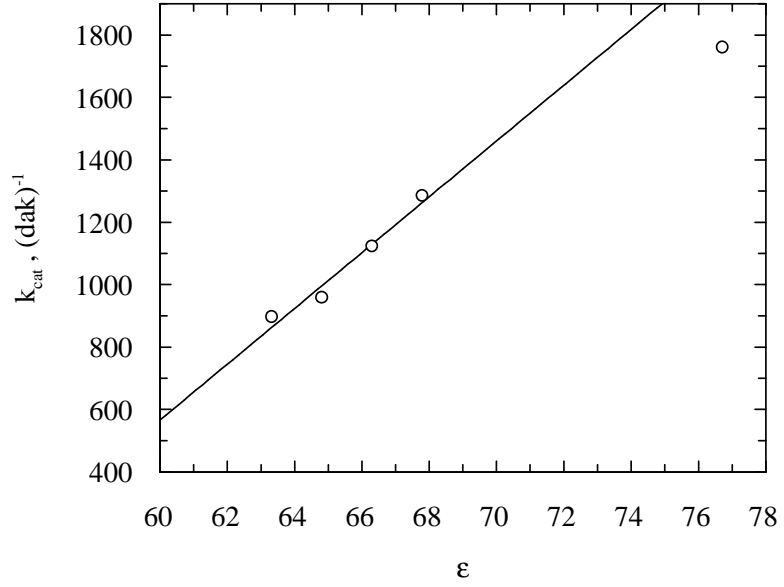
Çalışılan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitlerine karşı enzimin kinetik (k_{cat} , K_m , k_{cat}/K_m) ve termodinamik değerleri (ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger ve ΔG_{E-S}) arasında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Dielektrik sabitlerine karşılık gelen kinetik değerlerin grafikleri Şekil 4.189, 4.190 ve 4.191'de, termodinamik değerlere karşılık gelen grafikler Şekil 4.192, 4.193 ve 4.194'te gösterilmiştir.

Tablo 4. 122: DMSO'nun artan inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri

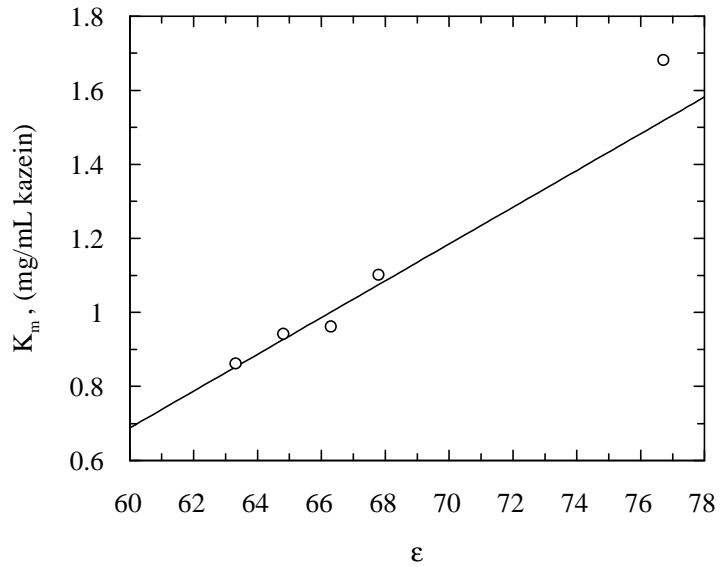
DMSO Konsantrasyonu, (%)	Dielektrik sabiti
0	76.73
30	67.81
35	66.32
40	64.83
45	63.34

Artan DMSO inhibisyon konsantrasyonlarında enzimin kinetik parametreleri olan k_{cat} , K_m ve k_{cat}/K_m değerleri artan DMSO konsantrasyonları varlığında azaldığından, ancak artan DMSO konsantrasyonu ile arttıkça dielektrik sabitleri azaldığı için bu konsantrasyonlar ile ilişkili dielektrik sabitlerinde kinetik parametreler doğrusal artan ilişkiler göstermiştir. Artan DMSO konsantrasyonu ile enzimin ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger değerleri arttığından bu konsantrasyonlar ile ilişkili dielektrik sabitleri azaldığından, ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger değerleri ve DMSO konsantrasyonu ile ilişkili dielektrik sabitleri arasında lineer olarak azalan ilişkiler belirlenmiştir. ΔG_{E-S} değerleri sadece K_m değerleri ile bağlantılı olduğundan ve un-kompetitif inhibisyonda enzimin K_m değeri

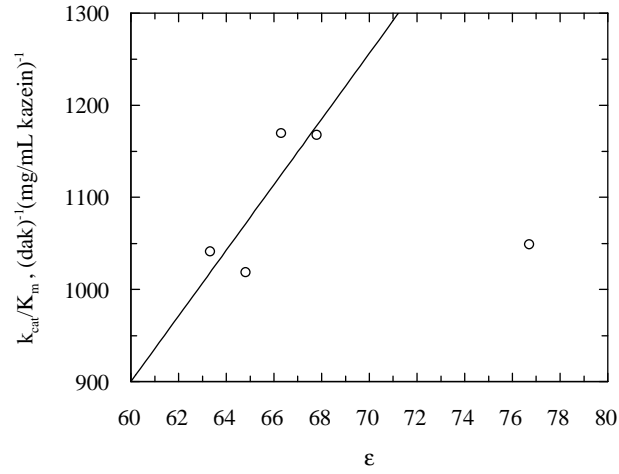
artan inhibitör (DMSO) konsantrasyonu ile azaldığından ΔG_{E-S} değerleri de DMSO ile ilişkili dielektrik sabitleri arasında lineer olarak artan bir ilişki görülmüştür.



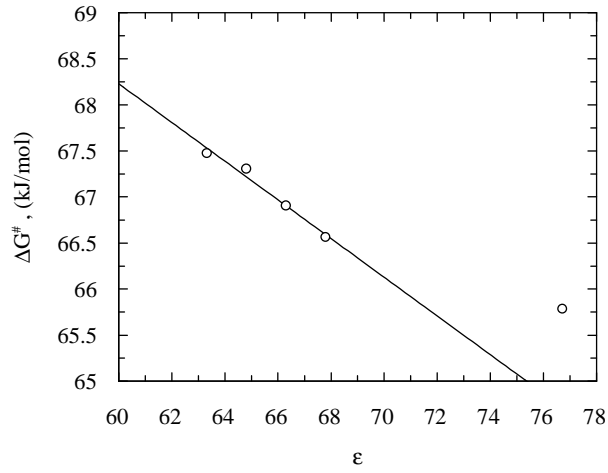
Şekil 4. 189: Alkalin proteazın k_{cat} değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r=0.9832$)



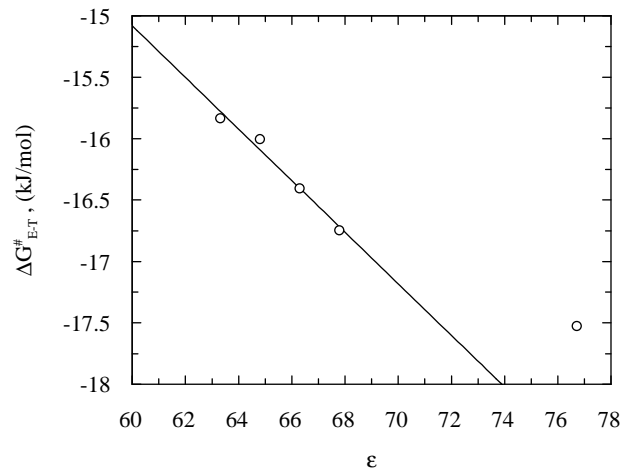
Şekil 4. 190: Alkalin proteazın K_m değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r=0.9569$)



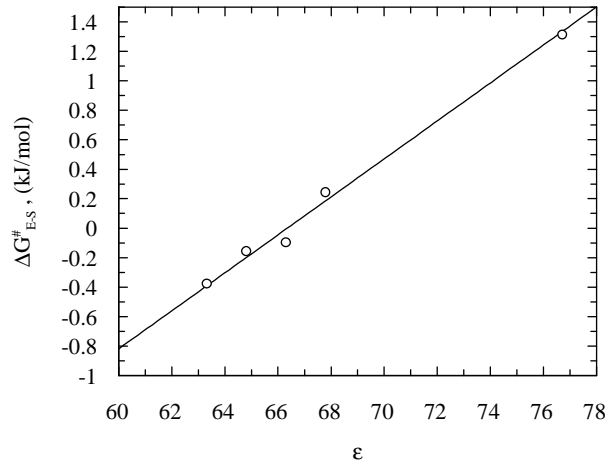
Şekil 4. 191: Alkale proteazın k_{cat}/K_m değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r= 0.8496$)



Şekil 4. 192: Alkale proteazın $\Delta G^{\#}$ değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r= -0.9885$)



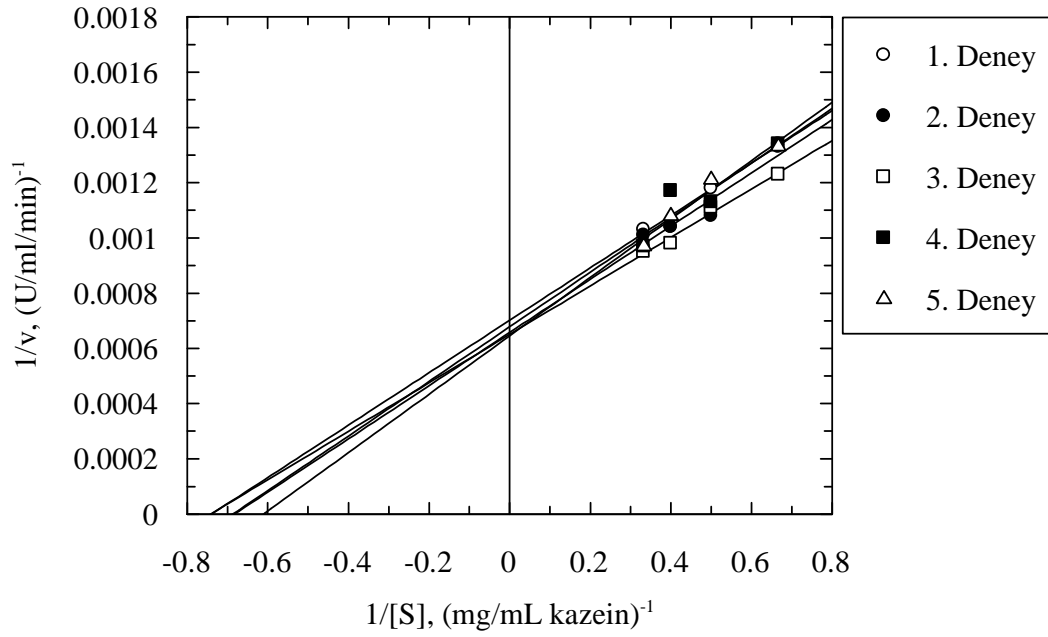
Şekil 4. 193: Alkale proteazın $\Delta G^{\#}_{E-T}$ değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r= -0.8451$)



Şekil 4. 194: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-S}^{\#}$ değerlerinin artan DMSO inhibisyon konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerleriyle lineer olarak değişim ($r= 0.9658$)

4.1.3.5.6.2 DMSO'nun aktivatör etki gösterdiği konsantrasyonlarda enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

DMSO'nun aktivatör etkisini belirlemek üzere %2.5, 5, 10 ve 20 konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Bu konsantrasyonlarda enzimin kinetik parametrelerini belirlemek için oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramları Şekil 4.195, 4.196, 4.197, ve 4.198'de gösterilmiştir. Kinetik parametrelerin belirlenmesinde başlangıç hızı ölçümleri Folin-Ciocalteu reaktifi içermeyen yöntemle yapılmıştır. Çalışılan DMSO konsantrasyonlarında elde edilen Lineweaver-Burk diyagramlarının eğimleri ve interseptleri ile bunlardan hesaplanan K_m ve V_m değerleri ile oluşturulan doğruların interseptleri ve eğimleri tablo 4.123, 4.125, 4.127, ve 4.129'da verilmiştir. Hesaplanan K_m ve V_m değerleri ile Lineweaver-Burk diyagramlarının intersept ve eğimlerinin ortalamaları, standart sapmaları ile birlikte tablo 4.124, 4.126, 4.128, ve 4.130'da verilmiştir.



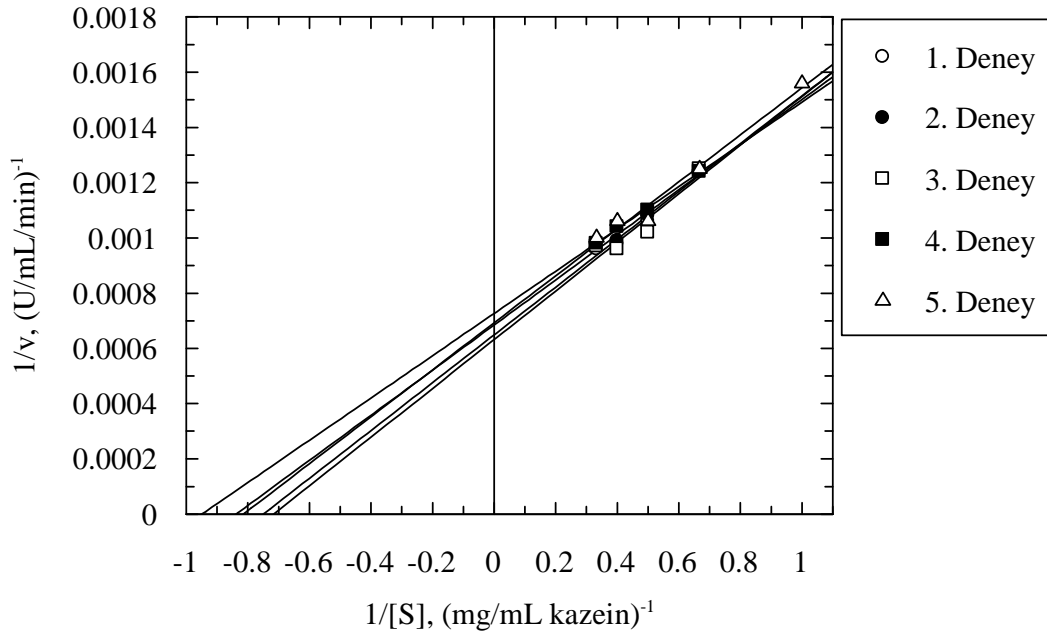
Şekil 4. 195: %2.5 DMSO varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 123: %2.5 DMSO varlığında enzimin Şekil 4.195'teki Lineweaver–Burk diyagramlarıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deneý No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00068	0.00099	1.46	1470.59	8.12	0.9922
2	0.00066	0.00096	1.45	1515.15	8.36	0.9865
3	0.00066	0.00088	1.35	1538.46	8.49	0.9901
4	0.00070	0.00095	1.36	1428.57	7.88	0.9068
5	0.00065	0.00106	1.63	1538.46	8.49	0.9820

Tablo 4. 124: %2.5 DMSO varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.41 ± 0.03
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	1498.25 ± 21.38
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	8.27 ± 0.12
İntersept	$6.75 \times 10^{-4} \pm 9.69 \times 10^{-6}$
Eğim	$9.68 \times 10^{-4} \pm 2.92 \times 10^{-5}$



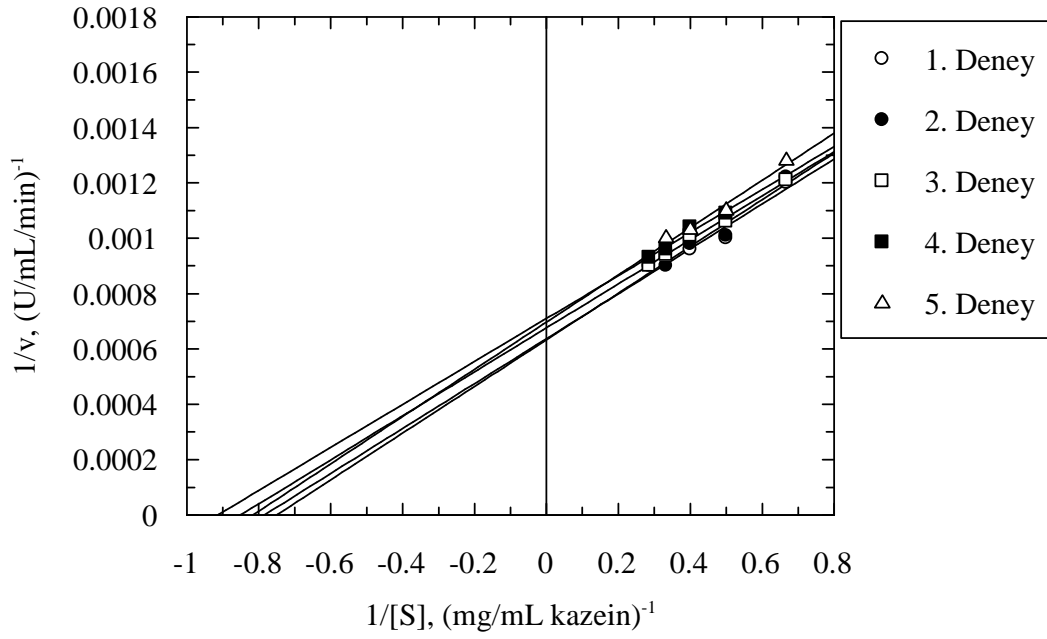
Şekil 4. 196: %5 DMSO varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 125: %5 DMSO varlığında enzimin Şekil 4.196’deki Lineweaver–Burk diyagramlarıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deneý No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00065	0.00087	1.34	1538.46	8.49	0.9854
2	0.00068	0.00082	1.21	1470.59	8.12	0.9851
3	0.00063	0.00088	1.40	1587.3	8.76	0.9418
4	0.00073	0.00077	1.05	1369.86	7.56	0.9980
5	0.00069	0.00085	1.23	1449.28	8.00	0.9879

Tablo 4. 126: %5 DMSO varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.30 ± 0.05
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	1483.10 ± 37.45
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	8.34 ± 0.18
İntersept	$6.76 \times 10^{-4} \pm 1.38 \times 10^{-5}$
Eğim	$8.38 \times 10^{-4} \pm 2.22 \times 10^{-5}$



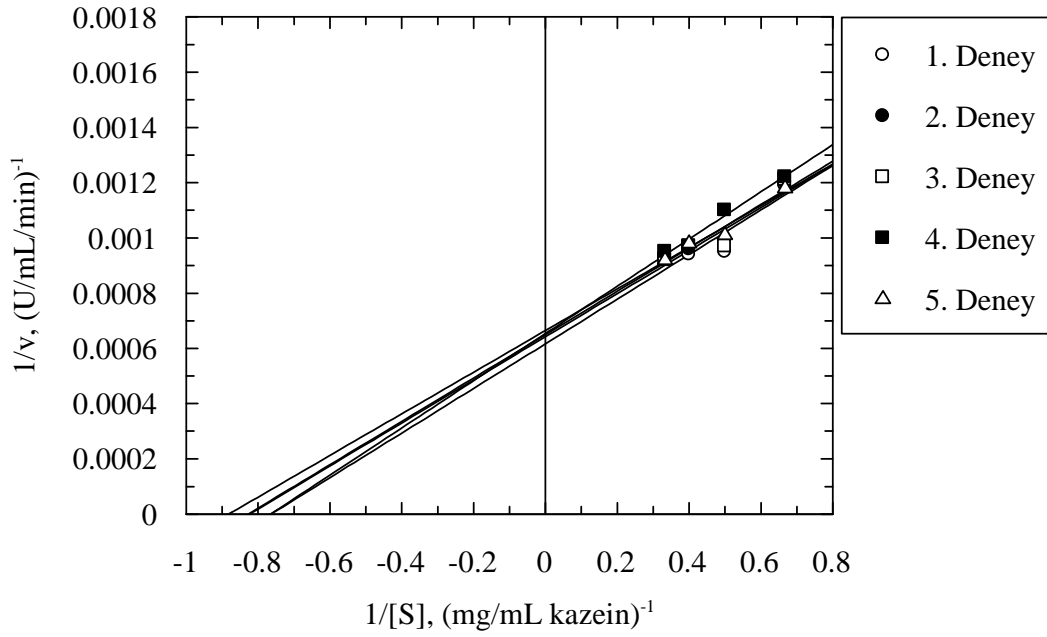
Şekil 4. 197: % 10 DMSO varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

Tablo 4. 127: % 10 DMSO varlığında enzimin Şekil 4.197’deki Lineweaver–Burk diyagramlarıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deneý No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ gtirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00064	0.00081	1.27	1562.5	8.62	0.9678
2	0.00063	0.00084	1.33	1587.3	8.76	0.9739
3	0.00068	0.0008	1.18	1470.59	8.12	0.9960
4	0.00071	0.00078	1.10	1408.45	7.77	0.9836
5	0.00070	0.00085	1.21	1428.57	7.88	0.9875

Tablo 4. 128: % 10 DMSO varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.22 ± 0.04
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	1491.48 ± 35.71
Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	8.35 ± 0.21
İntersept	$6.62 \times 10^{-4} \pm 1.65 \times 10^{-5}$
Eğim	$8.16 \times 10^{-4} \pm 1.44 \times 10^{-5}$



Şekil 4. 198: %20 DMSO varlığında alkalen proteaz enziminin K_m ve V_m değerlerini belirlemek üzere çizilen Lineweaver–Burk diyagramı

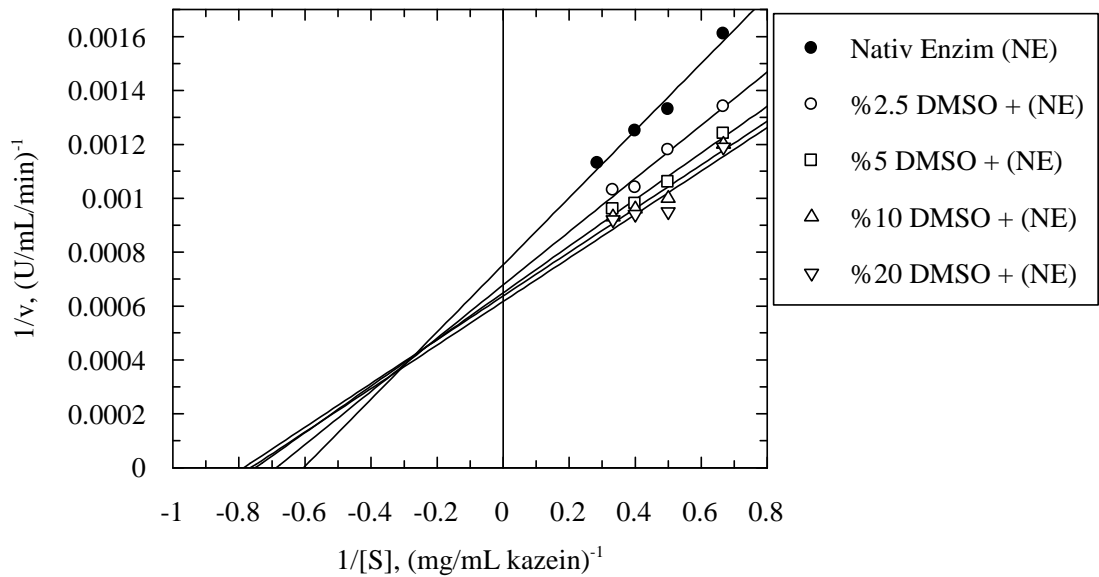
Tablo 4. 129: %20 DMSO varlığında enzimin Şekil 4.198’deki Lineweaver–Burk diyagramlarıyla belirlenmiş K_m ve V_m değerleri

Deneý No	İntersept	Eğim	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ g tirozin /mL/dak)	Dönüştürülen V_m (μ moltirozin/mL/dak)	Korelasyon katsayısı (r)
1	0.00063	0.00078	1.24	1587.30	8.76	0.9213
2	0.00065	0.00078	1.20	1538.46	8.49	0.9492
3	0.00064	0.00078	1.22	1562.50	8.62	0.9354
4	0.00065	0.00085	1.31	1538.46	8.49	0.9876
5	0.00066	0.00075	1.14	1515.15	8.36	0.9776

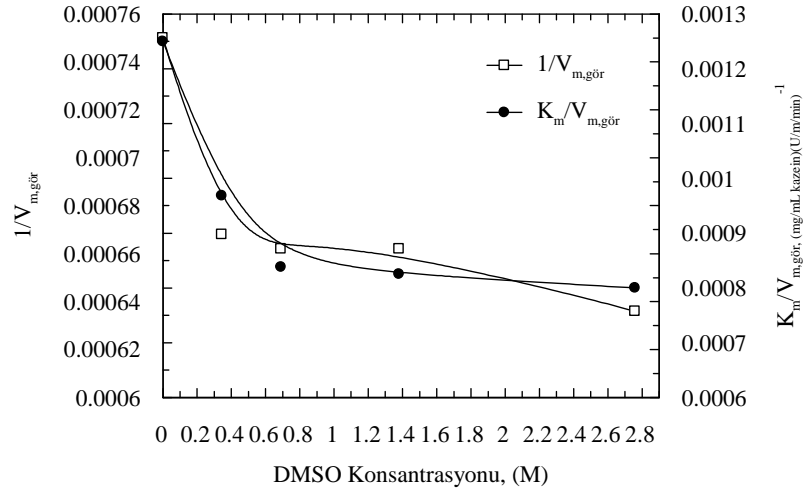
Tablo 4. 130: %20 DMSO varlığında enzimin K_m ve V_m , intersept ve eğim parametrelerinin ortalama değerleri ve ortalamaların standart sapma değerlerini içerecek şekilde ifadesi

K_m (mg/mL kazein)	1.20 ± 0.02
V_m , (μ g tirozin /mL/dak)	1573.05 ± 16.85
Dönüştürülen V_m (μ g tirozin/mL/dak)	8.68 ± 0.09
İntersept	$6.45 \times 10^{-4} \pm 5.70 \times 10^{-6}$
Eğim	$8.00 \times 10^{-4} \pm 1.20 \times 10^{-5}$

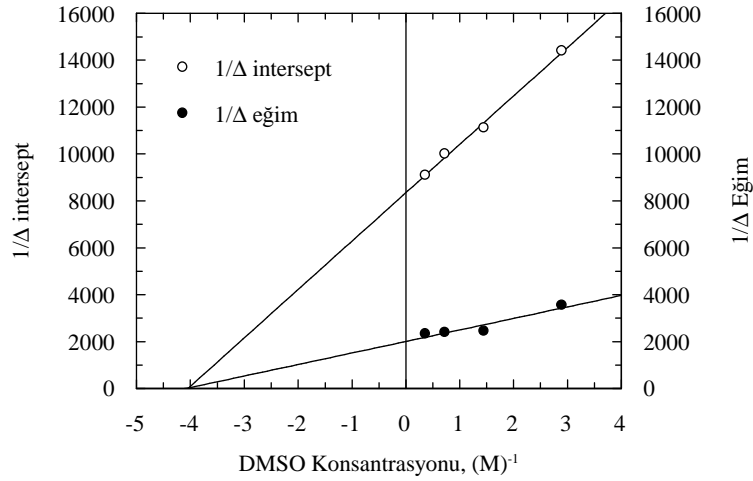
4.123, 4.125, 4.127 ve 4.129 no'lu tablolarla 4.124, 4.126, 4.128 ve 4.130 no'lu tablolarda verilen ortalama K_m değerlerine en yakın deney verilerine ait veriler kullanılarak DMSO'in çalışılan tüm konsantrasyonları için Şekil 4.199'da görülen Lineweaver–Burk diyagramı oluşturulmuştur. Şekil 4.199'da görülen Lineweaver–Burk diyagramı çalışılan konsantrasyonlarda DMSO'nun alkalen proteaz üzerinde zorunlu olmayan aktivasyon oluşturduğunu göstermektedir. Zorunlu olmayan aktivasyonda hız denklemi (2.34) no'lu bağıntı ile ifade edilir. Bu bağıntıda yer alan K_A aktivasyon sabitini ve α ve β parametrelerini hesaplayabilmek için Lineweaver–Burk diyagramından elde edilen intersept ve eğimlerin aktivatör (DMSO) konsantrasyonuna karşı işaretlenmesiyle Şekil 4.200'de gösterilen ikincil çizimlere gidilmiştir. İkincil izimler zorunlu olmayan aktivasyonda görülen hiperbollerini verdiğinden K_A , α ve β değerlerinin belirlenmesi için Şekil 4.201'de gösterilen ncl çizimler oluşturulmuş ve bu çizimlerden lineer doğrular elde edilmiştir. Elde edilen doğrular (2.38) ve (2.39) no'lu denklemler ile ifade edilmektedir. Bu doğruların Şekil 2.28'de gösterilen eğimleri, yatay ve düşey eksenler üzerindeki interseptleri göz önüne alınarak K_A , α ve β değerleri hesaplanmış sonuçlar Tablo 4.131'de verilmiştir.



Şekil 4. 199: DMSO'nun artan aktivasyon konsantrasyonları varlığında oluşturulan Lineweaver–Burk diyagramı



Şekil 4. 200: DMSO'nun artan aktivasyon konsantrasyonları varlığında Şekil 199'daki doğruların eğim ve interseptlerinin DMSO konsantrasyonuna karşı işaretlenmesiyle oluşturulan ikincil çizimler



Şekil 4. 201: DMSO'nun artan aktivasyon konsantrasyonları varlığında oluşturulan üçüncül çizimi

Tablo 4. 131: Artan DMSO konsantrasyonu varlığında üçüncül çizimlerden yararlanılarak hesaplanan α , β ve K_A değeri

	$[I]-1/V_{mgör}$ $r= 0.9975$	$[I]-K_m/V_{mgör}$ $r= 0.9438$
İntersept	8348.63	2005.21
Eğim	2062.61	491.51
β	1.19	-
α	-	0.72
K_A , (M)	0.42	0.42

DMSO'nun artan konsantrasyonları varlığında alkalen proteaz enziminin belirlenmiş kinetik parametreleri olan k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri (3.4) no'lu denklemden, termodinamik parametreleri olan ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger ve ΔG_{E-S} ise (2.40), (2.41) ve (2.42) no'lu denklemlerden yararlanılarak belirlenmiş ve tablo 4.132'de ve tablo 4.133'te verilmiştir.

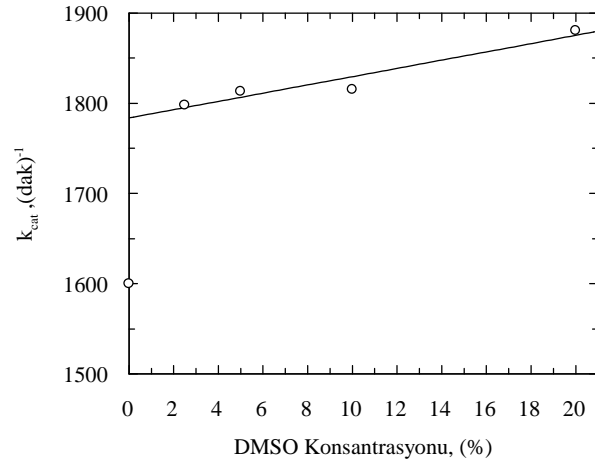
Tablo 4. 132: Artan DMSO konsantrasyonu varlığında aktivasyon olması halinde alkalen proteaz enziminin kinetik parametreleri

% DMSO	K_m (mg/mL kazein)	V_m (μ moltirozin/mL/min)	k_{cat} (dak) ⁻¹	k_{cat}/K_m (dak) ⁻¹ (mg/mL kazein) ⁻¹
0	1.67	7.36	1600.00	958.12
2.5	1.41	8.27	1797.82	1275.14
5	1.30	8.34	1813.01	1394.61
10	1.22	8.35	1815.22	1487.94
20	1.20	8.68	1880.41	1567.00

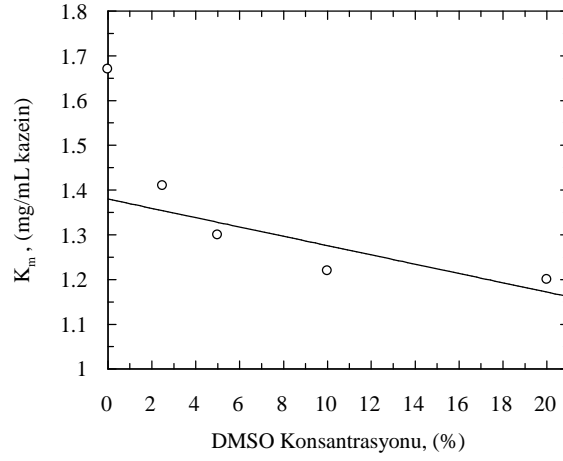
Tablo 4. 133: Artan DMSO konsantrasyonu varlığında aktivasyon olması halinde alkalen proteaz enziminin termodinamik parametreleri

% DMSO	ΔG^\ddagger (kJ/mol)	ΔG_{E-T}^\ddagger (kJ/mol)	ΔG_{E-S} (kJ/mol)
0	66.01	-17.30	1.29
2.5	65.71	-17.60	0.87
5	65.67	-17.64	0.66
10	65.69	-17.62	0.50
20	65.60	-17.71	0.46

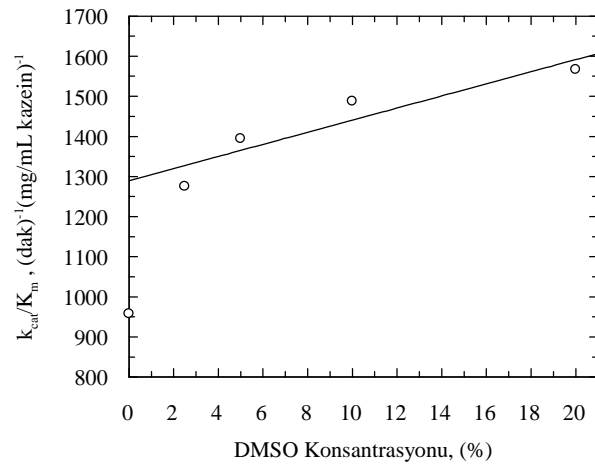
Çalışılan DMSO'in aktivasyon yaptığı konsantrasyonlarına karşı enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri işaretlenmiş ve aralarında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Enzimin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin artan aktivasyon konsantrasyonu ile lineer olarak arttığı K_m değerinin ise lineer olarak azaldığı görülmüştür (Şekil 4.202, 4.203, ve 4.204). Termodinamik parametreler olan ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger ve ΔG_{E-S} değerlerinin ise DMSO'nun artan aktivasyon konsantrasyonlarında lineer olarak azaldığı görülmüştür. (Şekil 4.205, 4.206, 4.207). Bu artan ve azalan lineer ilişkiler DMSO'nun çalışılan konsantrasyon aralığında enzim üzerinde zorunlu olmayan aktivatör etkisi yaptığının kinetik ve termodinamik göstergeleridir.



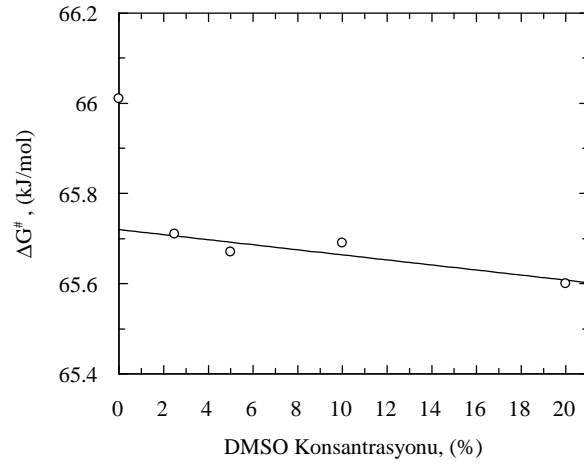
Şekil 4. 202: Alkale proteazın k_{cat} değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= 0.9646$)



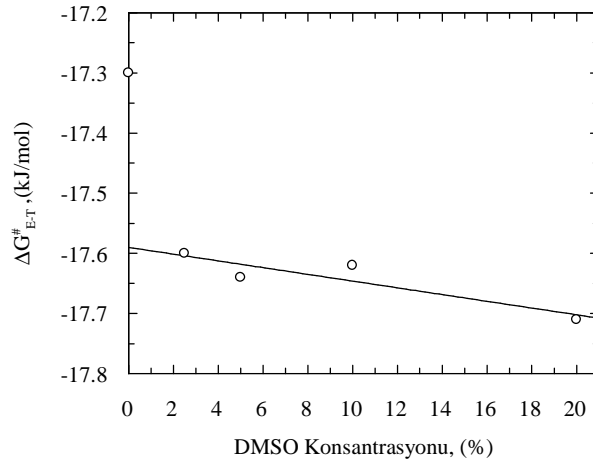
Şekil 4. 203: Alkale proteazın K_m değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= -0.8441$)



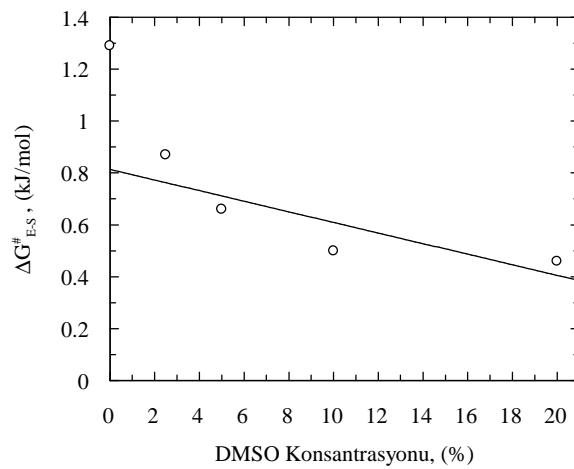
Şekil 4. 204: Alkale proteazın k_{cat}/K_m değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r= 0.9295$)



Şekil 4. 205: Alkalen proteazın ΔG^{\ddagger} değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = -0.9566$)



Şekil 4. 206: Alkalen proteazın $\Delta G^{\ddagger}_{E-T}$ değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = -0.9158$)



Şekil 4. 207: Alkalen proteazın $\Delta G^{\ddagger}_{E-S}$ değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonu ile doğrusal değişimi ($r = -0.8484$)

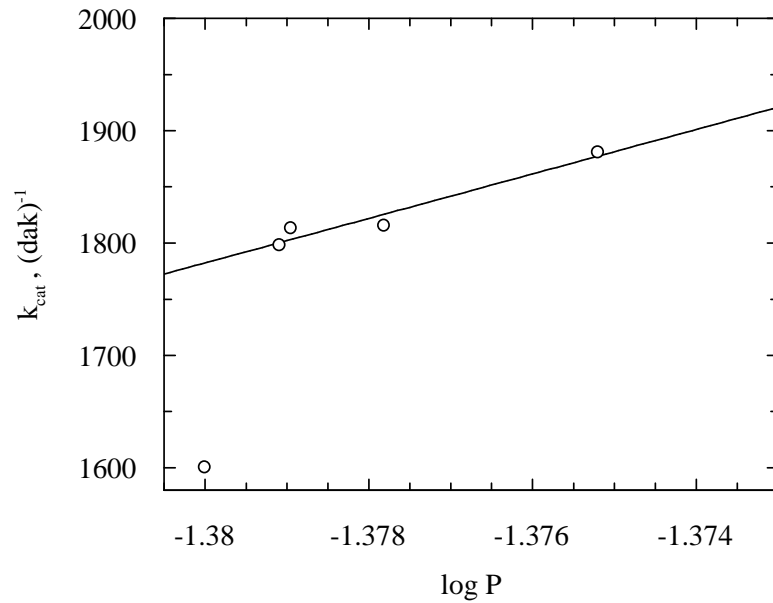
4.1.3.6.4.2.1 DMSO'nun aktivator etki gösterdiği konsantrasyonlar varlığında enzimatik katalizi etkileyen faktörlerin enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri ile ilişkilendirilmesi

Artan DMSO konsantrasyonu ile ilişkili log P değerleri (2.43) no'lu eşitlikten yararlanılarak hesaplanmıştır. Buna göre DMSO'nun çalışılan konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerleri tablo 4.134'te verilmiştir.

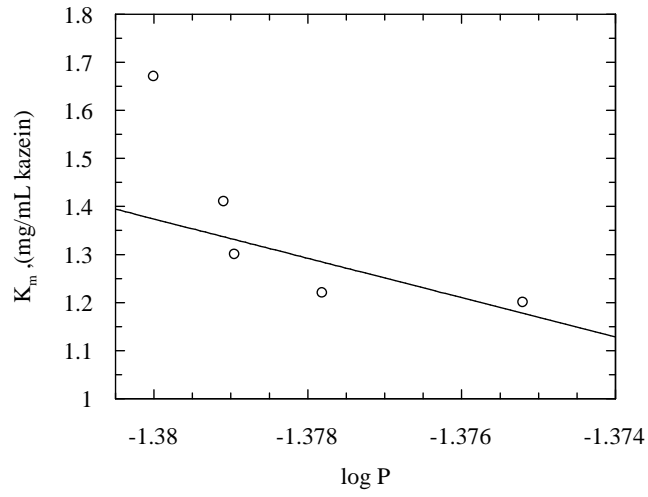
Tablo 4. 134: Artan DMSO aktivasyon konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri

DMSO Konsantrasyonu, (%)	Log P
0	-1.380
2.5	-1.379
5	-1.378
10	-1.377
20	-1.375

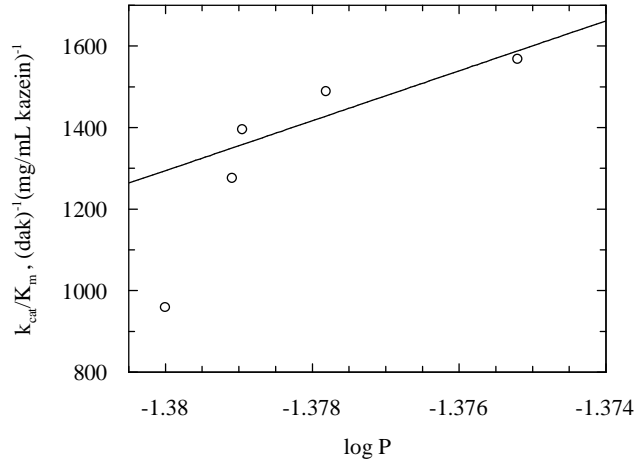
Çalışılan DMSO konsantrasyonları ile ilişkili Log P değerlerine karşılık gelen kinetik parametrelerin grafikleri şekil 4.208, 4.209 ve 4.210'da, termodinamik parametrelere karşılık gelen grafikler şekil 4.211, 4.212 ve 4.213'te gösterilmiştir.



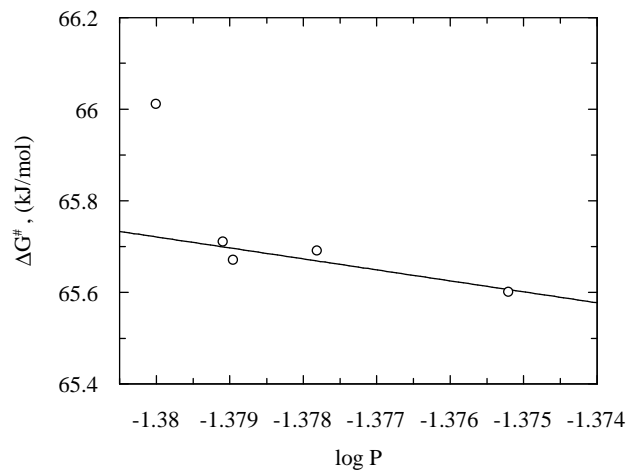
Şekil 4. 208: Alkalin proteazın k_{cat} değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonlarıyla ilişkili Log P değerleri ile lineer olarak değişimi ($r= 0.9720$)



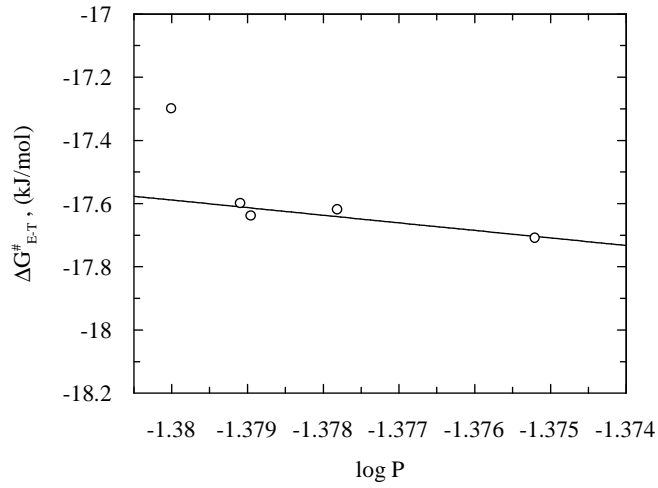
Şekil 4. 209: Alkalin proteazın K_m değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonlarıyla ilişkili Log P değerleri ile lineer olarak değişimi ($r = -0.7731$)



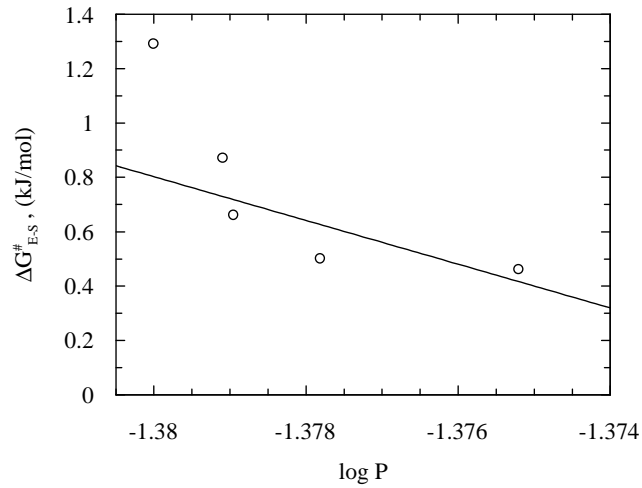
Şekil 4. 210: Alkalin proteazın k_{cat}/K_m değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonlarıyla ilişkili Log P değerleri ile lineer olarak değişimi ($r = -0.8774$)



Şekil 4. 211: Alkalin proteazın $\Delta G^\#$ değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonlarıyla ilişkili Log P değerleri ile lineer olarak değişimi ($r = -0.9661$)



Şekil 4. 212: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-T}^{\#}$ değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonlarıyla ilişkili Log P değerleri ile lineer olarak değişimi ($r = -0.8596$)



Şekil 4. 213: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-S}^{\#}$ değerlerinin artan DMSO aktivasyon konsantrasyonlarıyla ilişkili Log P değerleri ile lineer olarak değişimi ($r = -0.7783$)

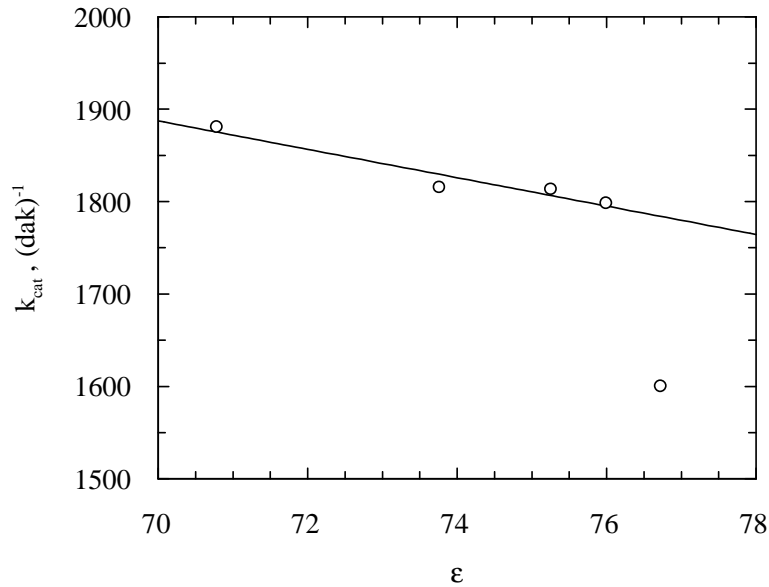
Artan DMSO aktivasyon konsantrasyonlarında enzimin kinetik parametreleri olan k_{cat} , ve k_{cat}/K_m değerleri arttığı için bu konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerlerinde de kinetik parametreler ile doğrusal olarak artmış, K_m değerleri azaldığı için ise doğrusal olarak azalmıştır. Artan DMSO aktivasyon konsantrasyonlarında enzimin termodinamik değerleri olan $\Delta G^{\#}$, $\Delta G_{E-T}^{\#}$ ve $\Delta G_{E-S}^{\#}$ azaldığından, bu konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerlerinde lineer olarak değişen azalmalar görülmüştür.

DMSO'nun 30 °C'deki dielektrik sabiti 46.95 olarak, suyun 25 °C'deki dielektrik sabiti 78.54 ve α değeri 0.20×10^{-2} olarak verilmiştir [90,100]. DMSO'nun çalışılan %2.5, 5, 10 ve %20 konsantrasyonlarındaki dielektrik sabitleri (2.46) no'lu eşitlikten yararlanılarak hesaplanmış ve tablo 4.135'te verilmiştir.

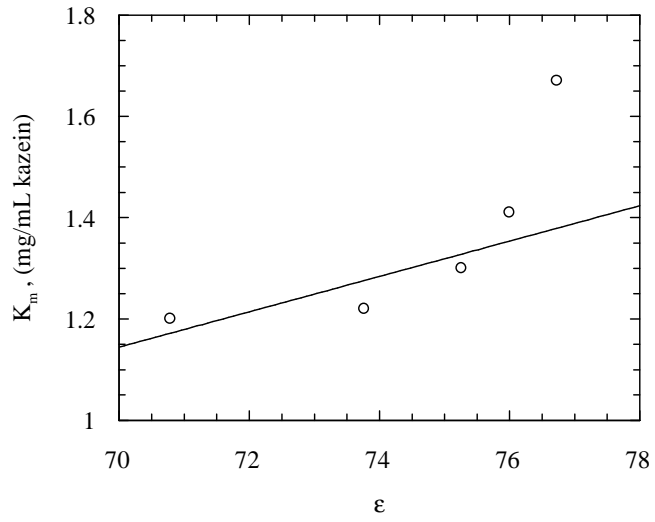
Tablo 4. 135: DMSO'nun artan konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri

DMSO Konsantrasyonu, (%)	Dielektrik sabiti
0	76.73
2.5	76.00
5	75.26
10	73.77
20	70.79

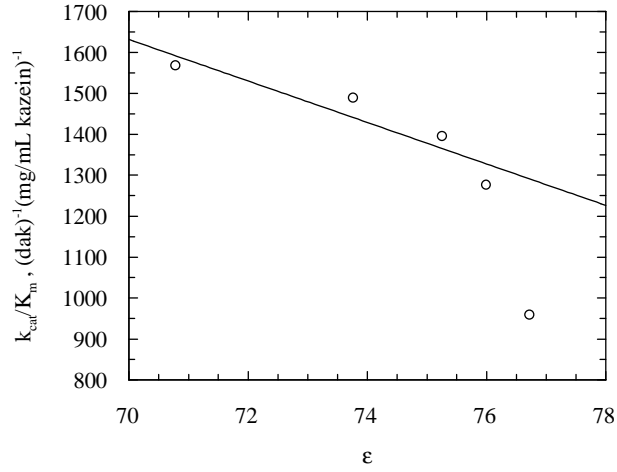
Çalışılan DMSO konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitlerine karşı enzimin kinetik (k_{cat} , K_m , k_{cat}/K_m) ve termodinamik parametreleri (ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger ve ΔG_{E-S}) işaretlenmiş ve aralarında doğrusal ilişkiler belirlenmiştir. Dielektrik sabitlerine karşılık gelen kinetik parametrelerin grafikleri şekil 4.218, 4.219 ve 4.220'de, termodinamik parametrelere karşılık gelen grafikler şekil 4.221, 4.222 ve 4.223'te gösterilmiştir.



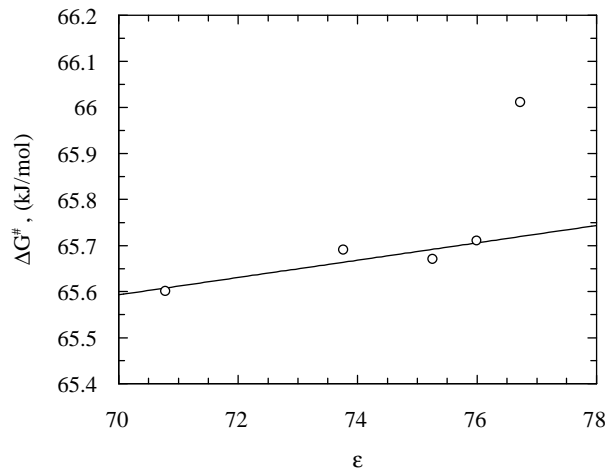
Şekil 4. 214: Alkalin proteazın k_{cat} değerleriyle artan DMSO aktivasyon konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r = -0.9650$)



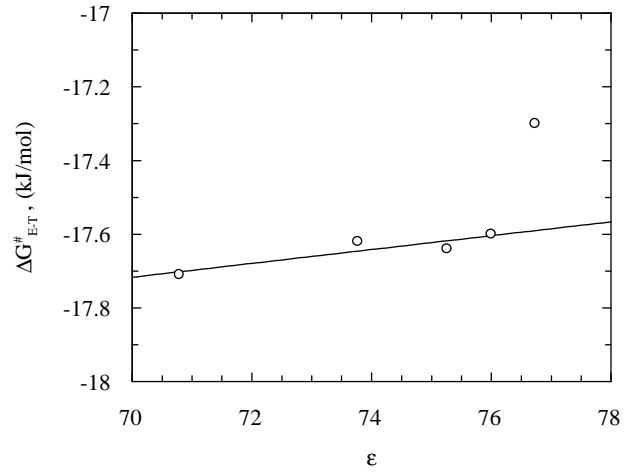
Şekil 4. 215: Alkalen proteazın K_m değerleriyle artan DMSO aktivasyon konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.8437$)



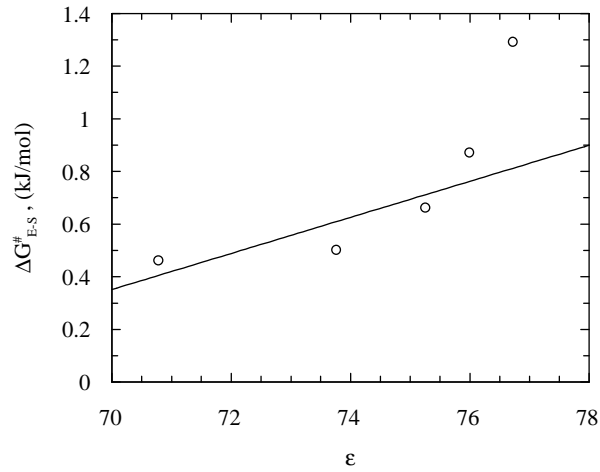
Şekil 4. 216: Alkalen proteazın k_{cat}/K_m değerleriyle artan DMSO aktivasyon konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= -0.9292$)



Şekil 4. 217: Alkalen proteazın ΔG^\ddagger değerleriyle artan DMSO aktivasyon konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9567$)



Şekil 4. 218: Alkalen proteazın $\Delta G_{E-T}^{\#}$ değerleriyle artan DMSO aktivasyon konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.9155$)



Şekil 4. 219: Alkalen proteazın ΔG_{E-S} değerleriyle artan DMSO aktivasyon konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri arasındaki lineer değişim ($r= 0.8480$)

Artan DMSO aktivasyon konsantrasyonlarında enzimin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri arttığından ancak artan DMSO konsantrasyonu ile dielektrik sabitleri azaldığı için bu konsantrasyonlar ile ilişkili dielektrik sabitleriyle k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri arasında lineer olarak azalan ilişkiler gözlenmiştir. DMSO'nun aktivasyon etkisi yaptığı konsantrasyonlarda K_m azaldığından K_m ile dielektrik sabitleri arasında lineer olarak artan ilişki gözlenmiştir. Diğer taraftan enzimin $\Delta G^{\#}$, $\Delta G_{E-T}^{\#}$ ve ΔG_{E-S} değerleri artan DMSO aktivasyon konsantrasyonu ile azaldığından bu termodinamik değerler ile dielektrik sabitleri arasında lineer olarak artan ilişki görülmüştür.

4.1.4 Organik çözücülerin solvatokromik parametrelerinin enzimin kinetik ve termodinamik özellikleri üzerine etkilerinin incelenmesi

Organik çözücülerin artan konsantrasyonları ile ilişkili solvatokromik parametreleri olan π^* (çözücünün dipolarite/polarizlenebilme yeteneği), α (hidrojen bağ donör asiditesi ya da çözücünün çözünenden proton verebilme yeteneği), β (hidrojen bağ akseptör bazisitesi ya da çözücünün çözünene ile proton kabul edebilme yeteneği), E_T^N (çözücü polaritesi hakkında bilgi veren $E_T(30)$ değerinin normalize edilmiş hali) değerleri (2.50), (2.51), (2.51) ve (2.53) no'lu eşitliklerden yararlanılarak hesaplanmıştır. Tez çalışmasında kullanılan monoalkollerin artan konsantrasyonları ile ilişkili hesaplanan solvatokromik parametreleri (4.136) no'lu tabloda, aprotik çözücülerin (N,N'-DMF, 1,4-dioksan, DMSO) ve asetonitrilin solvatokromik parametreleri (4.137) no'lu tabloda no'lu tabloda özetlenmiştir.

Tablo 4. 136: Monoalkollerin farklı konsantrasyonları için hesaplanan solvatokromik parametre değerleri

Çözücü (%)si	$\alpha, \beta, \pi^*, E_T^N$ parametreleri															
	Metanol				Etanol				n-propanol				i-propanol			
	α	β	π	E_T^N	α	β	π	E_T^N	α	β	π	E_T^N	α	β	π	E_T^N
0	1.23	0.49	1.14	1.00	1.23	0.49	1.14	1.00	1.23	0.49	1.14	1.00	1.23	0.49	1.14	1.00
2.5	1.23	0.49	1.15	1.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	1.21	0.49	1.15	0.99	-	-	-	-	1.2	0.51	1.13	0.98	-	-	-	-
10	1.16	0.5	1.16	0.97	1.14	0.52	1.13	0.96	1.15	0.53	1.13	0.96	1.15	0.54	1.13	0.95
12.5		-	-	-	-	-	-	-	1.11	0.54	1.13	0.94	-	-	-	-
15		-	-	-	1.08	0.54	1.13	0.93	1.08	0.55	1.29	0.93	1.08	0.56	1.12	0.92
20	1.04	0.52	1.15	0.92	1.01	0.55	1.13	0.9	1.01	0.57	1.24	0.89	1.00	0.59	1.11	0.88
25	0.98	0.53	1.14	0.9	0.95	0.57	1.12	0.87	-	-	-	-	0.94	0.62	1.1	0.84
30	0.93	0.55	1.12	0.88	0.89	0.59	1	0.82	-	-	-	-	0.88	0.65	1.05	0.81
100	0.93	0.62	0.6	0.76	0.83	0.77	0.54	0.65	0.78	0.83	0.52	0.62	0.76	0.95	0.48	0.55

Tablo 4. 137: Aprotik çözücülerin ve asetonitrilin farklı konsantrasyonları için hesaplanan solvatokromik parametre değerleri

Çözücü (%)si	$\alpha, \beta, \pi^*, E_T^N$ parametreleri															
	DMF				1,4-Dioksan				DMSO				Asetonitril			
	α	β	π	E_T^N	α	β	π	E_T^N	α	β	π	E_T^N	α	β	π	E_T^N
0	0.00	0.49	1.14	1.00	0.00	0.49	1.14	1.00	0.00	0.49	1.14	1	1.23	0.49	1.14	1.00
2.5	0.00	0.5	1.14	0.99	0.00	0.49	1.14	0.98	0.00	0.5	0.15	0.99	-	-	-	-
5	0.00	0.5	1.15	0.97	0.00	0.48	1.34	0.96	0.00	0.5	0.16	0.98	-	-	-	-
7.5	0.00	0.51	1.16	0.96	0.00	-	-	-	0.00	-	-	-	-	-	-	-
10	0.00	0.51	1.17	0.94	0.00	0.48	1.34	0.91	0.00	0.52	0.17	0.94	-	-	-	-
15	0.00	0.52	1.18	0.89	0.00	0.48	1.34	0.86	0.00	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00	0.55	1.18	0.86	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00	0.58	1.17	0.78	-	-	-	-
32.5	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00	-	-	-	0.67	1.16	1.16	0.77
35	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00	0.61	1.15	0.74	0.63	1.15	1.15	0.75
37.5	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00	-	-	-	0.60	0.45	1.14	0.73
40	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00	0.63	1.13	0.71	0.57	0.45	1.13	0.72
42.5	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00	-	-	-	0.54	0.45	1.12	0.70
45	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00	0.65	1.11	0.68	0.52	0.44	1.11	0.69
100	0.00	0.69	0.88	0.39	0.00	0.37	0.55	0.16	0.00	0.76	0.76	0.44	0.19	0.31	1.75	0.46

Hesaplanan solvatokromik parametreler ile enzimin kinetik ve termodinamik değerleri arasındaki ilişkiler çoklu lineer regresyon yöntemiyle incelenmiştir. Monoalkollerin artan konsantrasyonlarında monoalkollerin gösterdiği kısmi ya da gerçek non-kompetitif inhibisyon etkisi sebebiyle enzimin K_m değerinde bir değişim olmadığından ve buna bağlı olarak ΔG_{E-S} değeri değişmediğinden bu parametreler ile solvatokromik parametreler arasında çoklu lineer regresyonlar incelenmemiştir. Buna göre monoalkoller varlığında enzimin kinetik (k_{cat} ve V_m) ve termodinamik (ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger) değerleri ile α ve β parametreleri arasındaki çoklu lineer regresyon denklemleri (4.138) no'lu tabloda α ve E_T^N parametreleri arasındaki çoklu lineer regresyon denklemleri (4.139) no'lu tabloda α ve π^* parametreleri arasındaki çoklu lineer regresyon denklemleri (4.140) no'lu tabloda β ve E_T^N parametreleri arasındaki çoklu lineer regresyon denklemleri (4.141) no'lu tabloda β ve π^* parametreleri arasındaki çoklu lineer regresyon denklemleri (4.142) no'lu tabloda π^* ve E_T^N parametreleri arasındaki çoklu lineer regresyon denklemleri (4.143) no'lu tabloda verilmiştir. Aprotik çözücülerin α değerleri sıfır olduğundan bu parametre ile ilgili regresyonlar yapılmamıştır. Ancak β ve E_T^N parametreleri ile enzimin kinetik parametreleri arasındaki çoklu lineer regresyon denklemleri (4.144) no'lu tabloda termodinamik değerleri ile arasındaki çoklu lineer regresyon denklemleri (4.145) no'lu tabloda β ve π^* parametreleri ile enzimin kinetik değerleri arasındaki çoklu lineer regresyon denklemleri (4.146) no'lu tabloda termodinamik değerleri ile arasındaki çoklu lineer regresyon denklemleri (4.147) no'lu tabloda π^* ve E_T^N parametreleri ile enzimin kinetik değerleri arasındaki çoklu lineer regresyon denklemleri (4.148) no'lu tabloda termodinamik değerleri ile arasındaki çoklu lineer regresyon denklemleri (4.149) no'lu tabloda verilmiştir. Asetonitril aprotik çözücü olmadığından ve artan konsantrasyonları varlığında enzimin K_m ve ΔG_{E-S} değerleri değiştiğinden enzimin kinetik ve termodinamik değerleri üzerine asetonitrilin solvatokromik parametrelerinin etkisi ayrı tablolarda verilmiştir. Buna bağlı olarak asetonitrilin artan konsantrasyonları ile ilişkili solvatokromik parametreleri ile enzimin kinetik değerleri arasındaki çoklu lineer regresyon denklemleri (4.150) no'lu tabloda enzimin termodinamik değerleri ile arasındaki çoklu lineer regresyon denklemleri 4.151 no'lu tabloda verilmiştir.

Tablo 4. 138: Monoalkollerin α ve β parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} ve V_m) ve termodinamik ($\Delta G^\#$ ve $\Delta G^\#_{E-T}$) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)

Çözücü		$k_{cat}=a_0 + a \alpha + b \beta$	$V_m=a_0+a \alpha +b \beta$	$\Delta G^\#=a_0+a \alpha +b \beta$	$\Delta G^\#_{E-T}=a_0+a \alpha +b \beta$
Metanol	a_0	16987.31-3379.99 α -24856.82 β	125.45 - 25.50 α -183.32 β	0.4062+13.51 α +104.69 β	-82.90+13.52 α + 104.69 β
	a	16987.31± 18211.89	125.45 ± 134.54	0.4062 ± 68.87	-82.90 ± 68.87
	b	-3379.99 ± 4510.95	25.5 ± 33.33	13.51 ± 17.06	13.52 ± 17.06
	a/b	-24856.82± 25786.82	183.32 ± 190.51	104.69 ± 97.51	104.69 ± 97.51
	$r/r^2/dr^2$	0.14	0.14	0.13	0.13
		0.7942/ 0.6307/ 0.4661	0.7719/ 0.5958/ 0.3937	0.8598/ 0.7393/ 0.6089	0.8598/ 0.7393/ 0.6089
Etanol	a_0	-8527.58+3999.58 α +9163.96 β	-59.17+28.01 α + 62.68 β	100.34 -14.54 α -30.73 β	17.55 -14.68 α -31.43 β
	a	-8527.58± 5514.70	-59.17± 70.82	100.34 ± 29.35	17.55 ± 55.25
	b	3999.58± 1862.62	28.01± 24.40	-14.54 ± 9.91	-14.68 ± 19.04
	a/b	9163.96± 6561.75	62.68 ± 83.16	-30.73 ± 34.92	-31.43 ± 64.88
	$r/r^2/dr^2$	0.45	0.45	0.46	0.46
	0.9757/ 0.9520/ 0.9200	0.9723/ 0.9454/ 0.9089	0.9606/ 0.9229/ 0.8715	0.9620/ 0.9256/ 0.8760	
n-propanol	a_0	23735.11-7049.90 α -29045.89 β	-46.87+28.06 α +36.69 β	9.38+ 13.4617 α + 85.14 β	-74.35+ 13.62 α + 85.62 β
	a	23735.11±2485.15	-46.87 ±24.02	9.38±17.07	-74.35±16.54
	b	-7049.90±908.96	28.06 ±8.79	13.46±6.24	13.62±6.05
	a/b	-29045.89±2770.10	36.69 ±26.78	85.14±19.03	85.62±18.43
	$r/r^2/dr^2$	0.25	0.76	0.16	0.17
	0.9974/0.9949/0.9915	0.9935/0.9871/0.9786	0.9960/0.9920/0.9868	0.9961/0.9925/0.9875	
i-propanol	a_0	11272.42- 3634.13 α -12240.10 β	-88.96 + 44.65 α + 81.51 β	43.13+ 6.00 α + 34.87 β	-4.69-4.40 α -4.40 β
	a	11272.42± 665.95	-88.96 ± 67.76	43.13 ± 19.93	-4.69± 1.00
	b	-3634.13± 279.06	44.65 ± 28.41	6.00± 3.20	-4.40± 15.54
	a/b	-12240.10± 652.91	81.51 ± 66.47	34.87± 20.73	-4.40± 15.54
	$r/r^2/dr^2$	0.30	0.55	0.19	1
	0.9803/ 0.9609/ 0.9350	0.9480/ 0.8987/ 0.8312	0.9891/ 0.9785/ 0.9641	0.9826/ 0.9655/ 0.9425	

Tablo 4. 139: Monoalkollerin α ve E_T^N parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} ve V_m) ve termodinamik ($\Delta G^\#$ ve $\Delta G_{E-T}^\#$) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r_2/dr_2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)

Çözücü		$k_{cat}=a_0 + a \alpha + b E_T^N$	$V_m=a_0+a \alpha + b E_T^N$	$\Delta G^\#=a_0+a \alpha + b E_T^N$	$\Delta G_{E-T}^\#=a_0+a \alpha + b E_T^N$
Metanol		$-1368.89+301.40\alpha +1607.37 E_T^N$	$-9.47 + 2.02 \alpha + 10.95 E_T^N$	$78.32 - 1.50 \alpha -7.97 E_T^N$	$-4.99- 1.503 \alpha -7.97 E_T^N$
	a_0	$-1368.89 \pm 1538.6414761.21$	-9.47 ± 109.02	78.32 ± 56.96	-4.99 ± 56.96
	a	301.40 ± 11897.40	2.02 ± 87.87	-1.50 ± 45.92	-1.503 ± 45.92
	b	1607.37 ± 29398.85	10.95 ± 217.14	-7.97 ± 113.45	-7.97 ± 113.45
	a/b	0.19	0.18	0.19	0.19
	$r/r_2/dr_2$	0.7403/ 0.5481/ 0.3221	0.7111/ 0.5056/ 0.2584	0.8171/ 0.6677/ 0.5016	0.8171/ 0.6677/ 0.5016
Etanol		$-1786.68+ 175.25\alpha + 2462.19 E_T^N$	$-12.14 + 1.47 \alpha + 16.32 E_T^N$	$74.50 + 2.92 \alpha - 2.92 E_T^N$	$-2.01 +3.04 \alpha - 17.61 E_T^N$
	a_0	-1786.68 ± 127.26	-12.14 ± 8.41	74.50 ± 1.18	-2.01 ± 5.58
	a	175.25 ± 162.95	1.47 ± 10.77	2.92 ± 105475000.54	3.04 ± 7.14
	b	2462.19 ± 322.50	16.32 ± 21.31	-2.92 ± 105475000.54	$- 17.61 \pm 14.14$
	a/b	0.07	0.09	1.00	0.17
	$r/r_2/dr_2$	0.9661/ 0.9334/ 0.8890	0.9725/ 0.9557/ 0.9095	0.9429/ 0.9010/ 0.8350	0.9674/0.9359/0.8931
n-propanol		$-25593.02-22538.99\alpha +54126.13 E_T^N$	$22.31 + 54.98 \alpha - 84.32 E_T^N$	$159.42 + 64.69 \alpha - 171.31 E_T^N$	$76.51+65.13\alpha -172.25 E_T^N$
	a_0	-25593.02 ± 6268.28	22.31 ± 21.24	159.42 ± 17.47	76.51 ± 17.00
	a	-22538.99 ± 6708.33	54.98 ± 22.73	64.69 ± 18.70	65.13 ± 18.19
	b	54126.13 ± 14539.99	-84.32 ± 49.26	-171.31 ± 40.53	-172.25 ± 39.44
	a/b	0.42	0.65	0.38	0.39
	$r/r_2/dr_2$	0.9828/ 0.9659/ 0.9433	0.9947/ 0.9894/ 0.9823	0.9955/ 0.9912/ 0.9854	0.9958/ 0.9917/ 0.9861
i-propanol		$-4423.13- -3365.14\alpha + 9318.04 E_T^N$	$-9.96 + 3.65 \alpha + 11.75 E_T^N$	$101.65+ 26.44\alpha - 66.46 E_T^N$	$17.35+ 25.06\alpha - 63.76 E_T^N$
	a_0	-4423.13 ± 5480.61	-9.96 ± 49.70	101.65 ± 14.79	17.35 ± 17.10
	a	-3365.14 ± 8412.04	3.65 ± 76.28	26.44 ± 22.71	25.06 ± 26.24
	b	9318.04 ± 15827.36	11.75 ± 143.52	-66.46 ± 42.73	-63.76 ± 49.38
	a/b	0.37	0.31	0.40	0.37
	$r/r_2/dr_2$	0.9602/ 0.9221/ 0.8701	0.9204/ 0.8472/ 0.7453	0.9903/ 0.9808/ 0.9680	0.9899/ 0.9799/ 0.9661

Tablo 4. 140: Monoalkollerin α ve π^* parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} ve V_m) ve termodinamik ($\Delta G^\#$ ve $\Delta G_{E-T}^\#$) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)

Çözücü		$k_{cat}=a_0+a \alpha+b \pi^*$	$V_m=a_0+a \alpha+b \pi^*$	$\Delta G^\#=a_0+a \alpha+b \pi^*$	$\Delta G_{E-T}^\#=a_0+a \alpha+b \pi^*$
Metanol	a_0	$7125.55+ 1482.34\alpha - 7247.46\pi^*$	$52.40 + 10.34 \alpha - 53.15 \pi^*$	$46.18 - 6.67 \alpha + 26.53 \pi^*$	$-37.13 - 6.67 \alpha + 26.53 \pi^*$
	a	7125.55 ± 5058.81	52.4 ± 37.51	46.18 ± 20.14	46.18 ± 20.14
	b	1482.34 ± 490.67	10.34 ± 3.64	-6.67 ± 1.95	-6.67 ± 1.95
	a/b	-7247.46 ± 4754.83	-53.15 ± 35.26	26.53 ± 18.93	26.53 ± 18.93
	$r/r^2/dr^2$	0.20	0.19	0.25	0.25
		0.8439/ 0.7121/ 0.5682	0.8261/ 0.6826/ 0.5239	0.8802/ 0.7747/ 0.6621	0.8802/ 0.7747/ 0.6621
Etanol	a_0	$-3402.70+ 1286.03\alpha +419.58\pi^*$	$-8.063 + 8.81 \alpha + 2.83 \pi^*$	$77.36-4.79\alpha - 3.56\pi^*$	$-6.23- 4.81\alpha -3.2994\pi^*$
	a	-3402.70 ± 664.01	-8.063 ± 4.09	77.36 ± 2.78	-6.23 ± 2.64
	b	1286.03 ± 320.86	8.81 ± 1.98	-4.79 ± 1.35	-4.81 ± 1.28
	a/b	419.58 ± 774.77	2.83 ± 4.77	-3.56 ± 3.25	-3.29 ± 3.08
	$r/r^2/dr^2$	3.07	3.11	1.35	1.46
	0.9639/ 0.9291/ 0.8819	0.9704/ 0.9418/ 0.9030	0.9640/ 0.9293/ 0.8821	0.9630/ 0.9275/ 0.8791	
n-propanol	a_0	$-3402.70+ 2775.05\alpha + 595.34\pi^*$	$-13.03 + 15.80 \alpha - 0.51 \pi^*$	$0 + 0.50 \alpha + 0.50 \pi^*$	$6.18 -15.51\alpha - 2.04\pi^*$
	a	-3402.70 ± 2151.33	-13.03 ± 4.50	0	6.18 ± 7.17
	b	2775.05 ± 924.76	15.8 ± 1.93	0.50	-15.51 ± 3.08
	a/b	595.34 ± 1082.60	-0.51 ± 2.26	0.50	-2.04 ± 3.61
	$r/r^2/dr^2$	4.66	30.98	1.00	7.60
	0.9090/ 0.8263/ 0.7106	0.9897/ 0.9794/ 0.9657	1.0000/1.0000/1.0000	0.9752/ 0.9458/ 0.9097	
i-propanol	a_0	$871.80+ 1904.23\alpha -2157.66\pi^*$	$-40.87 + 4.49 \alpha + 36.41 \pi^*$	$94.28-6.45\alpha -16.24\pi^*$	$9.42-6.62\alpha -14.70\pi^*$
	a	871.80 ± 639.74	-40.87 ± 49.12	94.28 ± 19.93	9.42 ± 20.93
	b	1904.23 ± 102.68	4.49 ± 7.89	-6.45 ± 3.20	-6.62 ± 3.36
	a/b	-2157.66 ± 664.96	36.41 ± 51.07	-16.24 ± 20.73	-14.70 ± 21.76
	$r/r^2/dr^2$	0.88	0.12	0.40	0.45
	0.9572/ 0.9162/ 0.8604	0.9325/ 0.8696/ 0.7826	0.9856/ 0.9715/ 0.9525	0.9852/ 0.9707/ 0.9511	

Tablo 4. 141: Monoalkollerin β ve E_T^N parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} ve V_m) ve termodinamik ($\Delta G^\#$ ve $\Delta G_{E-T}^\#$) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)

Çözücü		$k_{cat}=a_0+a\beta+bE_T^N$	$V_m=a_0+a\beta+bE_T^N$	$\Delta G^\#=a_0+a\beta+bE_T^N$	$\Delta G_{E-T}^\#=a_0+a\beta+bE_T^N$
Metanol		$33762.05 - 38486.94\beta - 14241.24 E_T^N$	$248.38-282.24 \beta-105.73 E_T^N$	$-65.59+158.02 \beta+ 56.44 E_T^N$	$-148.89+158.02 \beta+ 56.44 E_T^N$
	a_0	33762.0517 ± 33762.05	248.38 ± 230.46	-65.59 ± 117.40	-65.59 ± 117.40
	a	-38486.94 ± 33723.82	-282.24 ± 249.66	158.02 ± 127.17	158.02 ± 127.17
	b	-14241.24 ± 14577.57	-105.73 ± 107.92	56.44 ± 54.97	56.44 ± 54.97
	a/b	2.69	2.67	2.79	2.79
	$r/r^2/dr^2$	$0.8124/ 0.6600/ 0.4900$	$0.7914/ 0.6264/ 0.4396$	$0.8725/ 0.7613/ 0.6419$	$0.8725/ 0.7613/ 0.6419$
Etanol		$-6677.68+ 4437.31\beta+ 5370.26 E_T^N$	$-40.63 + 25.53 \beta + 33.95 E_T^N$	$114.35- 32.81\beta-30.73 E_T^N$	$28.74+ -30.79\beta + -29.43 E_T^N$
	a_0	-6677.68 ± 716.65	-40.63 ± 46.61	114.35 ± 26.86	28.74 ± 716.65
	a	4437.31 ± 667.25	25.53 ± 43.39	$- 32.81 \pm 25.01$	-30.79 ± 667.25
	b	5370.26 ± 387.48	33.95 ± 25.20	-30.73 ± 14.52	-29.43 ± 387.48
	a/b	0.83	0.75	1.03	1.02
	$r/r^2/dr^2$	$0.9701/ 0.9411/ 0.9019$	$0.9751/ 0.9510/ 0.9184$	$0.9784/ 0.9573/ 0.9289$	$0.9767/ 0.9541/ 0.9235$
n-propanol		$42626.14-39301.41\beta-22538.19 E_T^N$	$-113.10+ 70.09 \beta +84.41 E_T^N$	$-21.69+100.58\beta+ 40.08 E_T^N$	$-105.83+ 101.27\beta+ 40.57 E_T^N$
	a_0	42626.14 ± 4566.29	-113.10 ± 55.49	-21.69 ± 36.83	-105.83 ± 35.93
	a	-39301.41 ± 3793.89	70.09 ± 46.10	100.58 ± 30.60	101.27 ± 29.85
	b	-22538.19 ± 2698.27	32.79	40.08 ± 21.76	40.57 ± 21.23
	a/b	1.73	1.61	2.50	2.52
	$r/r^2/dr^2$	$0.9977/ 0.9954/ 0.9926$	$0.9911/ 0.9824/ 0.9706$	$0.9952/ 0.9904/ 0.9840$	$0.9954/ 0.9910/ 0.9849$
i-propanol		$20556.62-17574.15\beta-11124.92 E_T^N$	$-214.26+155.69\beta+143.64 E_T^N$	$48.22+ 27.96\beta+ 5.72 E_T^N$	$-35.83+ 28.45\beta+ 6.23 E_T^N$
	a_0	20556.62 ± 998.67	-214.26 ± 87.59	48.22 ± 47.73	-35.83 ± 49.91
	a	-17574.15 ± 769.64	155.69 ± 67.50	27.96 ± 36.78	28.45 ± 38.46
	b	-11124.92 ± 618.92	143.64 ± 54.28	5.72 ± 29.58	6.2318 ± 30.93
	a/b	1.56	1.08	5.40	4.70
	$r/r^2/dr^2$	$0.9852/ 0.9703/ 0.9506$	$0.9719/ 0.9446/ 0.9077$	$0.9885/ 0.9766/ 0.9611$	$0.9883/ 0.9768/ 0.9613$

Tablo 4. 142: Monoalkollerin β ve π^* parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} ve V_m) ve termodinamik (ΔG^\ddagger ve ΔG^\ddagger_{E-T}) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)

Çözücü		$k_{cat}=a_0+a \beta +b \pi^*$	$V_m=a_0+a \beta + b \pi^*$	$\Delta G^\ddagger=a_0+a \beta + b \pi^*$	$\Delta G^\ddagger_{E-T}=a_0+a \beta +b \pi^*$
Metanol	a_0	$1463.64 - 9191.91\beta + -8369.05\pi^*$	$106.12-64.35 \beta -61.25 \pi^*$	$12.31+41.10 \beta +31.25 \pi^*$	$-71.00+41.10 \beta +31.25 \pi^*$
	a	1463.64 ± 5716.07	106.12 ± 42.85	12.31 ± 22.19	12.31 ± 22.19
	b	-9191.91 ± 2448.12	-64.35 ± 18.35	41.10 ± 9.50	41.10 ± 9.50
	a/b	-8369.05 ± 4149.94	-61.25 ± 31.11	31.25 ± 16.11	31.25 ± 16.11
	$r/r^2/dr^2$	1.08	1.05	1.30	1.30
		0.8895/ 0.7913/ 0.6869	0.8745/ 0.7647/ 0.6471	0.9190/ 0.8446/ 0.7669	0.9190/ 0.8446/ 0.7669
Etanol	a_0	$2715.87-4437.50\beta +314.15\pi^*$	$18.62 - 30.49 \beta + 2.07 \pi^*$	$62.87+ 16.56 \beta - 3.65 \pi^*$	$-20.73+ 16.60\beta - 2.91 \pi^*$
	a	2715.87 ± 1585.84	18.62 ± 9.88	62.87 ± 6.50	-20.73 ± 6.51
	b	-4437.50 ± 1276.74	$- 30.49 \pm 7.96$	16.56 ± 5.24	16.60 ± 5.25
	a/b	314.15 ± 904.55	2.07 ± 5.64	$- 3.65 \pm 3.71$	$- 2.91 \pm 3.71$
	$r/r^2/dr^2$	14.13	14.73	5.34	5.71
	0.9541/ 0.9104/ 0.8507	0.9617/ 0.9247/ 0.8745	0.9562/ 0.9143/ 0.8572	0.9550/ 0.9121/ 0.8535	
n-propanol	a_0	$4381.28-8654.92\beta +528.38\pi^*$	$30.18 - 44.32 \beta - 2.18 \pi^*$	$46.37+ 46.44\beta -1.14\pi^*$	$-36.92+ 46.49\beta -1.17\pi^*$
	a	4381.28 ± 776.20	30.18 ± 3.47	46.37 ± 1.98	-36.92 ± 1.86
	b	-8654.92 ± 1947.71	$- 44.32 \pm 8.70$	46.44 ± 4.98	46.49 ± 4.68
	a/b	528.38 ± 748.19	$- 2.18 \pm 3.34$	-1.14 ± 1.91	-1.17 ± 1.7984
	$r/r^2/d.^2$	16.40	22.00	40.74	40.74
	0.9530/ 0.9083/ 0.8472	0.9750/ 0.9505/ 0.9174	0.9910/ 0.9821/ 0.9702	0.9911/ 0.9824/ 0.9707	
i-propanol	a_0	$8867.43-5413.29\beta -4759.03\pi^*$	$-51.56 - 4.43 \beta + 52.49 \pi^*$	$71.25+17.20\beta -10.50\pi^*$	$-14.08+ 17.62\beta -8.89\pi^*$
	a	8867.43 ± 6601.16	-51.56 ± 73.87	71.25 ± 23.96	-14.08 ± 26.18
	b	-5413.29 ± 1812.26	$- 4.43 \pm 20.28$	17.20 ± 6.57	17.62 ± 7.19
	a/b	-4759.03 ± 5016.21	52.49 ± 56.13	-10.50 ± 18.21	-8.89 ± 19.89
	$r/r^2/dr^2$	1.12	0.08	1.64	1.98
	0.9757/ 0.9521/ 0.9203	0.9259/ 0.8572/ 0.7620	0.9891/ 0.9783/ 0.9645	0.9890/ 0.9781/ 0.9636	

Tablo 4. 143: Monoalkollerin π^* ve E_T^N parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} ve V_m) ve termodinamik (ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)

Çözücü		$k_{cat}=a_0+a \pi^* +b E_T^N$	$V_m=a_0+a \pi^* +b E_T^N$	$\Delta G^\ddagger=a_0+a \pi^* +b E_T^N$	$\Delta G_{E-T}^\ddagger=a_0+a \pi^* +b E_T^N$
Metanol	a_0	$5999.79-834.-8024.67\pi^*+3848.33 E_T^N$	$44.65- 58.70 \pi^* + 26.90 E_T^N$	$51.37 + 29.86 \pi^* - 17.26 E_T^N$	$-31.94 + 29.86 \pi^* - 17.26 E_T^N$
	a	5999.79 ± 4509.30	44.65 ± 33.55	51.37 ± 17.83	-31.94 ± 17.83
	b	-8024.67 ± 4600.34	$- 58.70 \pm 34.22$	$+ 29.86 \pm 18.19$	29.86 ± 18.19
	a/b	3848.33 ± 1173.08	26.90 ± 8.73	$- 17.26 \pm 4.64$	$- 17.26 \pm 4.64$
	$r/r^2/dr^2$	2.08	2.18	1.75	1.75
		$0.8626/ 0.7440/ 0.6161$	$0.8461/ 0.7159/ 0.5738$	$0.8957/ 0.8023/ 0.7035$	$0.8957/ 0.8023/ 0.7035$
Etanol	a_0	$-181.43-30.00 \pi^* + 305.95 E_T^N$	$-12.40+ -1.62 \pi^*+ 20.25 E_T^N$	$79.71-1.10\pi^* - 11.05 E_T^N$	$2.10 - 5.79 \pi^* - 5.79 E_T^N$
	a	-181.43 ± 54.53	-12.40 ± 3.61	79.71 ± 2.45	2.10 ± 5.82
	b	-30.00 ± 79.15	-1.62 ± 5.25	-1.10 ± 3.60	$- 5.79 \pm 14480841.93$
	a/b	305.95 ± 64.88	20.25 ± 4.30	$- 11.05 \pm 2.95$	-5.79 ± 14480841.93
	$r/r^2/dr^2$	0.10	0.08	0.09	0.08
		$0.9726/ 0.9460/ 0.9100$	$0.9731/ 0.9471/ 0.9117$	$0.9668/ 0.9348/ 0.8913$	$0.7863/ 0.6183/ 0.3639$
n-propanol	a_0	$1.39-0.18\pi^* -0.18 E_T^N$	$-25.84 -1.24 \pi^*+ 33.12 E_T^N$	$103.06-1.58\pi^* -33.26 E_T^N$	$19.81-1.61\pi^* - 33.29 E_T^N$
	a	1.39 ± 0.26	-25.84 ± 7.14	103.06 ± 7.52	19.81 ± 7.50
	b	-0.18 ± 589736.0529	-1.24 ± 2.63	-1.58 ± 2.76	-1.61 ± 2.76
	a/b	-0.18 ± 589736.0529	33.12 ± 4.86	-33.26 ± 5.12	-33.29 ± 5.11
	$r/r^2/dr^2$	1.00	0.04	0.05	0.06
		$0.6999/ 0.4899/ 0.1499$	$0.9854/ 0.9709/ 0.9516$	$0.9854/ 0.9606/ 0.9343$	$0.9801/ 0.9607/ 0.9346$
i-propanol	a_0	$1246.77- 4040.66\pi^* + 4123.51 E_T^N$	$-44.59 +37.43 \pi^*+ 8.09 E_T^N$	$93.64 - 10.61\pi^* - 13.75 E_T^N$	$8.78 - 8.93\pi^* -14.11 E_T^N$
	a	1246.77 ± 5575.14	-44.59 ± 49.07	93.64 ± 18.59	8.78 ± 19.64
	b	-4040.66 ± 6443.99	37.43 ± 56.72	$- 10.61 \pm 21.49$	$- 8.93 \pm 22.69$
	a/b	4123.51 ± 1872.20	8.09 ± 16.48	$- 13.75 \pm 6.25$	-14.11 ± 6.59
	$r/r^2/dr^2$	0.99	4.63	0.77	0.57
		$0.9630/ 0.9274/ 0.8789$	$0.9305/ 0.8658/ 0.7764$	$0.9870/ 0.9743/ 0.9572$	$0.9867/ 0.9737/ 0.9561$

Tablo 4. 144: Aprotik çözücülerin β ve E_T^N parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} , K_m , V_m) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)

Çözücü		$k_{cat}=a_0+a\beta+bE_T^N$	$K_m=a_0+a\beta+bE_T^N$	$V_m=a_0+a\beta+bE_T^N$
DMF		$0 + 1\beta 0 E_T^N$	$177.73 - 226.87\beta - 64.91 E_T^N$	$-799.43 + 1035.64\beta + 02.27 E_T^N$
	a_0	0.00	177.73 ± 94.56	-799.43 ± 182.51
	a	1.00	-226.87 ± 117.60	1035.64 ± 226.99
	b	0.00	-64.91 ± 36.87	302.27 ± 71.16
	a/b	1.00	3.50	3.43
	$r/r^2/dr^2$	1.0000/ 1.0000/ 1.0000	0.9478/ 0.8983/ 0.8305	0.9853/ 0.9708/ 0.9514
1,4-dioksan		$23054.44 - 49753.24\beta + 3116.89E_T^N$	$-19.97+ 50.56\beta - 3.14 E_T^N$	$133.90 - 288.95\beta + 18.10 E_T^N$
	a_0	23054.44 ± 843.11	-19.97 ± 8.25	133.9 ± 49.00
	a	-49753.24 ± 21613.07	50.56 ± 21.14	-288.95 ± 125.54
	b	3116.89 ± 2177.78	-3.14 ± 2.13	18.10 ± 12.65
	a/b	15.96	16.10	15.96
	$r/r^2/dr^2$	0.9604/ 0.9223/ 0.8448	0.9637/ 0.9288/ 0.8576	0.9604/ 0.9223/ 0.8447
DMSO (aktivasyon)		$-58869.75+ 66615.66\beta + 27866.89E_T^N$	$129.71 - 140.65\beta - 59.14 E_T^N$	$-266.07 + 301.57\beta + 125.84 E_T^N$
	a_0	-58869.75 ± 32171.02	129.71 ± 19.54	-266.07 ± 149.55
	a	66615.66 ± 34612.85	-140.65 ± 21.02	301.57 ± 160.90
	b	27866.89 ± 15174.79	-59.14 ± 9.22	125.84 ± 70.54
	a/b	2.39	2.38	2.40
	$r/r^2/dr^2$	0.9067/ 0.8221/ 0.6442	0.9899/ 0.9799/ 0.9598	0.9075/ 0.8233/ 0.6471
DMSO (inhibisyon)		$6715.97 - 7910.74\beta - 1078.20E_T^N$	$-1.87 + 1.00\beta + 3.043 E_T^N$	$101.11 - 103.28\beta - 43.12 E_T^N$
	a_0	6715.97 ± 3138.45	-1.87 ± 2.74	101.11 ± 25.74
	a	-7910.74 ± 3260.03	1.00 ± 2.84	-103.28 ± 26.74
	b	-1078.20 ± 1557.20	3.043 ± 1.36	-43.12 ± 12.77
	a/b	7.33	0.33	2.40
	$r/r^2/dr^2$	0.9965/ 0.9929/ 0.9859	0.9970/ 0.9940/ 0.9880	0.9726/ 0.9460/ 0.8921

Tablo 4. 145: Aprotik çözücülerin β ve E_T^N parametrelerinin enzimin termodinamik ($\Delta G^\#$, ΔG_{E-S} , $\Delta G_{E-T}^\#$) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)

Çözücü		$\Delta G^\# = a_0 + a \beta + b E_T^N$	$\Delta G_{E-T}^\# = a_0 + a \beta + b E_T^N$	$\Delta G_{E-S} = a_0 + a \beta + b E_T^N$
DMF		$264.71 - 253.62\beta - 74.67 E_T^N$	$190.80 - 265.28\beta - 78.36 E_T^N$	$273.09 - 354.06 \beta - 98.35 E_T^N$
	a0	264.71 ± 39.46	190.80 ± 34.57	273.09 ± 188.26
	a	-253.62 ± 49.08	-265.28 ± 43.00	-354.06 ± 234.14
	b	-74.67 ± 15.38	-78.36 ± 13.48	-98.35 ± 73.40
	a/b	3.40	3.40	3.60
	$r/r^2/dr^2$	0.9861/ 0.9723/ 0.9539	0.9894/ 0.9789/ 0.9648	0.9471/ 0.8971/ 0.8252
1,4-diroksan		$36.40 + 68.79\beta - 4.38 E_T^N$	$-46.90 + 68.79 \beta - 9.33 E_T^N$	$-32.76 + 79.05 \beta - 4.68 E_T^N$
	a0	36.40 ± 12.95	-46.90 ± 12.95	-32.76 ± 13.56
	a	68.79 ± 33.18	68.79 ± 33.18	79.05 ± 34.74
	b	-4.38 ± 3.34	-4.38 ± 3.34	-4.68 ± 3.50
	a/b	17.00	17.00	16.89
	$r/r^2/dr^2$	0.9496/ 0.9018/ 0.8036	0.9496/ 0.9018/ 0.8035	0.9645/ 0.9303/ 0.8606
DMSO (aktivasyon)		$162.43 - 105.95 \beta - 44.56 E_T^N$	$79.12 - 105.95 \beta - 44.56 E_T^N$	$220.91 - 241.52 \beta - 101.30 E_T^N$
	a0	162.43 ± 49.09	79.12 ± 49.09	220.91 ± 24.69
	a	-105.95 ± 52.81	-105.95 ± 52.81	-241.52 ± 26.56
	b	-44.56 ± 23.15	-44.56 ± 23.15	-101.30 ± 11.65
	a/b	2.38	2.38	2.38
	$r/r^2/dr^2$	0.8997/ 0.8095/ 0.6190	0.8997/ 0.8095/ 0.6190	0.9948/ 0.9897/ 0.9795
DMSO (inhibisyon)		$46.45 + 25.30 \beta + 6.91 E_T^N$	$-36.85 + 25.30 \beta + 6.91 E_T^N$	$1.86 - 5.95 \beta + 2.34 E_T^N$
	a0	46.45 ± 7.98	-36.85 ± 7.98	1.86 ± 4.99
	a	25.30 ± 8.29	25.30 ± 8.29	-5.95 ± 5.19
	b	6.91 ± 3.96	6.91 ± 3.96	2.34 ± 2.48
	a/b	4.17	4.17	2.54
	$r/r^2/dr^2$	0.9939/ 0.9879/ 0.9758	0.9939/ 0.9879/ 0.9758	0.9975/ 0.9951/ 0.9902

Tablo 4. 146: Aprotik çözücülerin β ve π^* parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} , K_m , V_m) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)

Çözücü		$k_{cat}=a_0+a\beta +b\pi^*$	$K_m= a_0+a\beta +b\pi^*$	$V_m=a_0+a\beta +b\pi^*$
DMF		$24078.68 +87148.57\beta -57005.41\pi^*$	$-7.45 - 69.51\beta + 37.79\pi^*$	$139.87 + 506.27\beta - 331.16\pi^*$
	a_0	24078.68 ± 9143.18	-7.45 ± 28.43	139.87 ± 53.09
	a	8715.29 ± 24123.02	$- 69.51 \pm 75.01$	506.27 ± 140.07
	b	-5700.88 ± 18348.26	37.79 ± 57.06	-331.16 ± 106.54
	a/b $r/r^2/dr^2$	1.53 $0.9755/ 0.9515/ 0.9192$	1.84 $0.9053/ 0.8195/ 0.6991$	1.53 $0.9755/ 0.9515/ 0.9193$
1,4-dioksan		$9083.37 - 15403.44\beta + 248.88\pi^*$	$-4.74 + 13.86\beta - 0.37\pi^*$	$52.78 - 89.50\beta + 1.44\pi^*$
	a_0	9083.37 ± 5573.54	-4.74 ± 5.14	52.78 ± 32.37
	a	-15403.44 ± 10332.03	13.86 ± 9.53	$- 89.50 \pm 60.01$
	b	248.88 ± 539.26	$- 0.37 \pm 0.50$	1.44 ± 3.13
	a/b $r/r^2/dr^2$	62.11 $0.9262/ 0.8578/ 0.7158$	37.46 $0.9403/ 0.8841/ 0.7684$	62.15 $0.9262/ 0.8579/ 0.7159$
DMSO (aktivasyon)		$-6152.67 - 998.92\beta + 7277.85\pi^*$	$19.04 + 3.65\beta - 16.85\pi^*$	$-27.87 - 3.67\beta + 32.71\pi^*$
	a_0	-6152.67 ± 4738.26	19.04 ± 4.11	-27.87 ± 21.94
	a	$- 998.92 \pm 3372.39$	3.65 ± 2.93	$- 3.67 \pm 15.61$
	b	7277.85 ± 5358.22	$- 16.85 \pm 4.65$	32.71 ± 24.81
	a/b $r/r^2/dr^2$	0.14 $0.8668/ 0.7514/ 0.5028$	0.22 $0.9709/ 0.9427/ 0.8854$	0.11 $0.8691/ 0.7553/ 0.5106$
DMSO (inhibisyon)		$3547.47 - 5553.58\beta + 819.47\pi^*$	$7.14 - 5.65\beta - 2.37\pi^*$	$-22.04 - 9.40\beta + 29.85\pi^*$
	a_0	3547.47 ± 1273.32	7.14 ± 0.54	-22.04 ± 9.81
	a	-5553.58 ± 357.20	$- 5.65 \pm 0.1514$	$- 9.40 \pm 2.75$
	b	819.47 ± 1031.35	$- 2.37 \pm 0.44$	29.85 ± 7.94
	a/b $r/r^2/dr^2$	6.78 $0.9967/ 0.9933/ 0.9868$	2.38 $0.999/ 0.9987/ 0.9973$	0.31 $0.9977/ 0.9552/ 0.9103$

Tablo 4. 147: Aprotik çözücülerin β ve π^* parametrelerinin enzimin termodinamik ($\Delta G^\#$, ΔG_{E-S} , $\Delta G_{E-T}^\#$) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)

Çözücü		$\Delta G^\# = a_0 + a\beta + b\pi^*$	$\Delta G_{E-T}^\# = a_0 + a\beta + b\pi^*$	$\Delta G_{E-S} = a_0 + a\beta + b\pi^*$
DMF		$33.42 - 120.84\beta + 80.27\pi^*$	$-52.15 - 126.57\beta + 84.73\pi^*$	$0.14 - 95.45\beta + 41.88\pi^*$
	a_0	33.42 ± 12.97	-52.15 ± 12.33	0.14 ± 52.36
	a	-120.84 ± 34.23	-126.57 ± 32.54	-95.45 ± 138.15
	b	80.27 ± 26.03	84.73 ± 24.75	41.88 ± 105.08
	a/b	1.51	1.51	2.28
	$r/r^2/dr^2$	0.9702/ 0.9413/ 0.9022	0.9732/ 0.9472/ 0.9120	0.9185/ 0.8437/ 0.7392
1,4-diroksan		$55.81 + 20.90\beta - 0.32\pi^*$	$-27.49 + 20.90\beta - 0.32\pi^*$	$-9.85 + 23.97\beta - 0.59\pi^*$
	a_0	55.81 ± 8.30	-27.49 ± 8.30	-9.85 ± 8.04
	a	20.90 ± 15.39	20.90 ± 15.39	23.97 ± 14.91
	b	-0.32 ± 0.80	-0.32 ± 0.80	-0.59 ± 0.78
	a/b	65.31	65.31	40.63
	$r/r^2/dr^2$	0.9114/ 0.8307/ 0.6614	0.9114/ 0.8307/ 0.6614	0.9471/ 0.8971/ 0.7942
DMSO (aktivasyon)		$0.0000 + 1.0000\beta - 0.0000\pi^*$	$-5.28 + 2.11\beta - 11.52\pi^*$	$31.58 + 5.75\beta - 29.11\pi^*$
	a_0	0.00	-5.28 ± 7.46	31.58 ± 6.03
	a	1.00	2.11 ± 5.31	5.75 ± 4.30
	b	0.00	-11.52 ± 8.44	-29.11 ± 6.81
	a/b	1.00	0.18	0.20
	$r/r^2/dr^2$	1.0000/ 1.0000/ 1.0000	0.8505/ 0.7234/ 0.4468	0.9801/ 0.9606/ 0.9212
DMSO (inhibisyon)		$66.64 + 10.19\beta - 5.14\pi^*$	$-16.66 + 10.19\beta - 5.14\pi^*$	$9.31 - 11.14\beta - 2.25\pi^*$
	a_0	66.64 ± 2.82	-16.66 ± 2.82	9.31 ± 1.56
	a	10.19 ± 0.79	10.19 ± 0.79	-11.14 ± 0.44
	b	-5.14 ± 2.28	-5.14 ± 2.28	-2.25 ± 1.27
	a/b	1.98	1.98	4.95
	$r/r^2/dr^2$	0.9957/ 0.9913/ 0.9827	0.9957/ 0.9913/ 0.9827	0.9986/ 0.9972/ 0.9945

Tablo 4. 148: Aprotik çözücülerin π^* ve E_T^N parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} , K_m , V_m) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)

Çözücü		$k_{cat}=a_0+a \pi^*+b E_T^N$	$K_m= a_0+a \pi^* +b E_T^N$	$V_m=a_0+a \pi^* + b E_T^N$
DMF		$1272185.34-78312.95\pi^*-3606733 E_T^N$	$17.39 -14.23 \pi^* + 0.311 E_T^N$	$738.90 - 454.97 \pi^* - 209.54 E_T^N$
	a_0	127185.34 ± 72078.34	17.39 ± 162.23	738.9 ± 418.61
	a	-78312.95 ± 46467.77	-14.23 ± 104.58	$- 454.97 \pm 269.87$
	b	$- 36067.33 \pm 19152.74$	0.311 ± 43.11	$- 209.54 \pm 111.23$
	a/b	2.17	45.76	2.17
	$r/r^2/dr^2$	$0.9387/ 0.8811/ 0.8019$	$0.8764/ 0.7681/ 0.6135$	$0.9387/ 0.8811/ 0.8019$
1,4-dioksan		$792.05 + 461.63\pi^* + 461.63 E_T^N$	$1.33 - 0.60 \pi^* + 0.96 E_T^N$	$13.48 + 2.92 \pi^* - 6.16 E_T^N$
	a_0	792.05 ± 154.10	1.33 ± 1.40	13.48 ± 8.95
	a	461.63 ± 3140007144.00	$- 0.60 \pm 0.48$	2.92 ± 3.09
	b	461.63 ± 3140007144.00	0.96 ± 0.93	$- 6.16 \pm 5.96$
	a/b	1.00	0.63	0.47
	$r/r^2/dr^2$	$0.8367/ 0.7001/ 0.4003$	$0.9191/ 0.8449/ 0.6898$	$0.8969/ 0.8045/ 0.6090$
DMSO (aktivasyon)		$-7025.49 + 7234.17 \pi^* + 432.58 E_T^N$	$-3.48 + -11.40 \pi^* + -0.90 E_T^N$	$-31.19 + 32.62 \pi^* + 1.61 E_T^N$
	a_0	-7025.49 ± 10.96	-3.48 ± 10.96	-31.19 ± 32.27
	a	7234.17 ± 7.85	-11.40 ± 7.85	32.62 ± 23.11
	b	432.58 ± 2.16	-0.90 ± 2.16	1.61 ± 6.37
	a/b	16.73	16.73	20.26
	$r/r^2/dr^2$	$0.8676/ 0.7527/ 0.5054$	$0.8517/ 0.7255/ 0.4510$	$0.8697/ 0.7563/ 0.5127$
DMSO (inhibisyon)		$-3619.90 + 2478.04 \pi^* + 196.98 E_T^N$	$-0.14 - 0.68 \pi^* + 2.56 E_T^N$	$-34.21 + 32.71 \pi^* + 4.31 E_T^N$
	a_0	-435.39 ± 1143.34	-0.14 ± 0.87	-34.21 ± 8.72
	a	2478.04 ± 1032.56	-0.68 ± 0.78	32.71 ± 7.88
	b	2556.08 ± 170.82	2.56 ± 0.13	4.31 ± 1.30
	a/b	0.97	0.27	7.59
	$r/r^2/dr^2$	$0.9964/ 0.9928/ 0.9857$	$0.9977/ 0.9954/ 0.9907$	$0.9759/ 0.9525/ 0.9050$

Tablo 4. 149: Aprotik çözücülerin π^* ve E_T^N parametrelerinin enzimin termodinamik ($\Delta G^\#$, ΔG_{E-S} , $\Delta G_{E-T}^\#$) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)

Çözücü		$\Delta G^\# = a_0 + a \pi^* + b E_T^N$	$\Delta G_{E-T}^\# = a_0 + a \pi^* + b E_T^N$	$\Delta G_{E-S} = a_0 + a \pi^* + b E_T^N$
DMF		$-105.99 + 107.53\pi^* + 49.06 E_T^N$	$-198.95 + 113.77\pi^* + 51.60 E_T^N$	$33.81 - 29.26 \pi^* + 0.53 E_T^N$
	a_0	-105.99 ± 103.07	-198.95 ± 103.59	33.81 ± 283.75
	a	107.53 ± 103.07	113.77 ± 66.78	-29.26 ± 182.93
	b	49.06 ± 103.07	51.60 ± 27.52	0.53 ± 75.40
	a/b	2.19	2.21	55.21
	$r/r^2/dr^2$	0.9240/ 0.8538/ 0.7564	0.9236/ 0.8531/ 0.7551	0.9049/ 0.8189/ 0.6981
1,4-dioxan		$65.02 - 0.67 \pi^* + 1.42 E_T^N$	$-18.28 - 0.67 \pi^* + 1.42 E_T^N$	$0.57 - 0.99 \pi^* + 1.72 E_T^N$
	a_0	65.02 ± 2.25	-18.28 ± 2.25	0.57 ± 2.21
	a	-0.67 ± 0.77	-0.67 ± 0.77	-0.99 ± 0.76
	b	1.42 ± 1.50	1.42 ± 1.50	1.72 ± 1.47
	a/b	0.47	0.47	0.58
	$r/r^2/dr^2$	0.8804/ 0.7752/ 0.5505	0.8804/ 0.7752/ 0.5505	0.9273/ 0.8599/ 0.7198
DMSO (aktivasyon)		$79.82 - 11.40 \pi^* - 0.90 E_T^N$	$-3.48 - 11.40 \pi^* - 0.90 E_T^N$	$36.13 - 28.52 \pi^* - 2.39 E_T^N$
	a_0	79.82 ± 10.96	-3.48 ± 10.96	36.13 ± 8.76
	a	-11.40 ± 7.85	-11.40 ± 7.85	-28.52 ± 6.27
	b	-0.90 ± 2.16	-0.90 ± 2.16	-2.39 ± 1.73
	a/b	12.70	12.70	11.93
	$r/r^2/dr^2$	0.8517/ 0.7255/ 0.4510	0.8517/ 0.7255/ 0.4510	0.9806/ 0.9617/ 0.9233
DMSO (inhibisyon)		$79.80 - 8.18 \pi^* - 4.69 E_T^N$	$-3.50 - 8.18 \pi^* - 4.69 E_T^N$	$-5.07 + 1.09 \pi^* + 5.11 E_T^N$
	a_0	79.80 ± 2.44	-3.50 ± 2.44	-5.07 ± 2.16
	a	-8.18 ± 2.21	-8.18 ± 2.21	1.09 ± 1.95
	b	-4.69 ± 0.36	-4.69 ± 0.36	5.11 ± 1.32
	a/b	1.74	1.74	0.21
	$r/r^2/dr^2$	0.9956/ 0.9913/ 0.9826	0.9956/ 0.9913/ 0.9826	0.9965/ 0.9930/ 0.9860

Tablo 4. 150: Asetonitrilin solvatokromik parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} , K_m , V_m) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)

Solvatokromik Parametreler		$k_{cat}=a_0 + a \alpha + b \beta$	$K_m=a_0 + a \alpha + b \beta$	$V_m=a_0 + a \alpha + b \beta$
α, β		$-221014.74 - 37346.77\alpha + 547954.85\beta$	$100.31 + 16.63 \alpha - 243.00 \beta$	$-1017.04 - 171.86 \alpha + 2521.53 \beta$
	a_0	-221014.74 ± 78598.72	100.31 ± 35.87	-1017.04 ± 363.00
	a	-37346.77 ± 12658.10	16.63 ± 5.77	-171.86 ± 58.46
	b	547954.85 ± 192242.39	-243.00 ± 87.73	2521.53 ± 887.87
	a/b	0.07	0.07	0.07
	$r/r^2/dr^2$	0.9035/ 0.8164/ 0.7247	0.9093/ 0.8269/ 0.7404	0.9030/ 0.8155/ 0.7232
α, π^*		$k_{cat}=a_0+a \alpha+b \pi^*$	$K_m=a_0+a \alpha+b \pi^*$	$V_m=a_0+a \alpha+b \pi^*$
		$26028.57-790.07\alpha -20580.05\pi^*$	$-9.29 + 0.42 \alpha + 9.17 \pi^*$	$119.95 - 3.64 \alpha - 94.86 \pi^*$
	a_0	26028.57 ± 2801.30	-9.29 ± 1.35	119.95 ± 12.80
	a	-790.07 ± 180.60	0.42 ± 0.09	$- 3.64 \pm 0.82$
	b	-20580.05 ± 2502.8398	9.17 ± 1.21	$- 94.86 \pm 11.43$
a/b	0.04	0.05	0.04	
	$r/r^2/dr^2$	0.9843/ 0.9689/ 0.9533	0.9834/ 0.9671/ 0.9507	0.9846/ 0.9694/ 0.9541
α, E_T^N		$k_{cat}=a_0+a \alpha+b E_T^N$	$K_m=a_0+a \alpha + b E_T^N$	$V_m=a_0+a \alpha + b E_T^N$
		$36761.91+ 29719.26\alpha -71722.07 E_T^N$	$-14.08 - 13.18 \alpha + 31.96 E_T^N$	$169.43 + 136.99 \alpha - 330.60 E_T^N$
	a_0	36761.91 ± 4591.49	-14.08 ± 2.18	169.43 ± 21.01
	a	29719.26 ± 4221.05	$- 13.18 \pm 2.00$	136.99 ± 19.32
	b	-71722.07 ± 9754.37	31.96 ± 4.64	-330.6 ± 44.64
a/b	0.41	0.41	0.41	
	$r/r^2/dr^2$	0.9809/ 0.9617/ 0.9425	0.9801/ 0.9607/ 0.9410	0.9809/ 0.9621/ 0.9432

Tablo 4. 150 (devam): Asetonitrilin solvatokromik parametrelerinin enzimin kinetik (k_{cat} , K_m , V_m) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri ($r/r^2/dr^2$: korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)

		$k_{cat}=a_0+a \beta +b \pi^*$	$K_m=a_0+a \beta + b \pi^*$	$V_m=a_0+a \beta + b \pi^*$
$\beta - \pi^*$		$31199.34 - 11823.22 \beta - 20884.14 \pi^*$	$-12.02 + 6.25 \beta + 9.33 \pi^*$	$143.75 - 54.41 \beta - 96.26 \pi^*$
	a_0	31199.34 ± 2781.63	-12.02 ± 1.34	143.75 ± 12.71
	a	-11823.22 ± 2801.66	6.25 ± 1.35	$- 54.41 \pm 12.80$
	b	-20884.14 ± 2556.45	9.33 ± 1.23	$- 96.26 \pm 11.68$
	a/b	0.57	0.67	0.57
	$r/r^2/dr^2$	0.9836/ 0.9670/ 0.9505	0.9824/ 0.9651/ 0.9477	0.9836/ 0.9675/ 0.9513
$\beta - E_T^N$		$k_{cat}=a_0+a \beta +b E_T^N$	$K_m=a_0+a \beta + b E_T^N$	$V_m=a_0+a \beta + b E_T^N$
		$-89673.63+ 279026.65\beta - 45457.82 E_T^N$	$41.91 - 123.52 \beta + 20.28 E_T^N$	$-413.10 + 1285.36 \beta - 209.40 E_T^N$
	a_0	-89673.63 ± 13184.31	41.91 ± 6.40	-413.10 ± 60.86
	a	279026.65 ± 39042.43	$- 123.52 \pm 18.96$	1285.36 ± 180.21
	b	$- 45457.82 \pm 5940.66$	20.28 ± 2.88	$- 209.40 \pm 27.42$
a/b	6.14	6.09	6.14	
	$r/r^2/dr^2$	0.9811/ 0.9626/ 0.9440	0.9799/ 0.9602/ 0.9403	0.9811/ 0.9626/ 0.9438
$\pi^* - E_T^N$		$k_{cat}=a_0+a \pi^* +b E_T^N$	$K_m=a_0+a \pi^* + b E_T^N$	$V_m=a_0+a \pi^* + b E_T^N$
		$26316.62- 20056.97 \pi^* - 185.64 E_T^N$	$-9.45 + 8.89 \pi^* + 0.98 E_T^N$	$121.28 - 92.45 \pi^* - 8.54 E_T^N$
	a_0	26316.62 ± 2790.08	-9.45 ± 1.35	121.28 ± 12.75
	a	-20056.97 ± 2552.29	8.89 ± 1.23	$- 92.45 \pm 11.66$
	b	-1855.90 ± 425.60	0.98 ± 0.20	$- 8.54 \pm 1.94$
a/b	10.83	9.07	10.83	
	$r/r^2/dr^2$	0.9845/ 0.9687/ 0.9531	0.9833/ 0.9669/ 0.9504	0.9845/ 0.9692/ 0.9539

Tablo 4. 151: Asetonitrilin solvatokromik parametrelerinin enzimin termodinamik ($\Delta G^\#$, ΔG_{E-S} , $\Delta G_{E-T}^\#$) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri (r^2/dr^2 : korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)

Solvatokromik Parametreler		$\Delta G^\#=a_0 + a \alpha + b \beta$	$\Delta G_{E-T}^\#=a_0 + a \alpha + b \beta$	$\Delta G_{E-S}=a_0 + a \alpha + b \beta$
$\alpha - \beta$		$330.17 + 44.39 \alpha - 650.43 \beta$	$247.51 + 44.49 \alpha - 652.00 \beta$	$182.94 + 30.57 \alpha - 447.36 \beta$
	a_0	330.17 ± 87.45	247.51 ± 86.99	182.94 ± 70.26
	a	44.39 ± 14.08	44.49 ± 14.01	30.57 ± 11.31
	b	-650.43 ± 213.89	-652.00 ± 212.79	-447.36 ± 171.86
	a/b	0.07	0.07	0.07
	r^2/dr^2	$0.9171/ 0.8410/ 0.7616$	$0.9178/ 0.8425/ 0.7637$	$0.8952/ 0.8015/ 0.7022$
$\alpha - \pi^*$		$\Delta G^\#=a_0 + a \alpha + b \pi^*$	$\Delta G_{E-T}^\#=a_0 + a \alpha + b \pi^*$	$\Delta G_{E-S}=a_0 + a \alpha + b \pi^*$
	a_0	$38.00 + 1.02 \alpha + 23.47 \pi^*$	$-45.35 + 1.01 \alpha + 23.51 \pi^*$	$-19.51 + 30.57 \alpha + 17.48 \pi^*$
	a	38.00 ± 4.18	-45.35 ± 4.10	-19.51 ± 2.00
	b	1.02 ± 0.27	1.01 ± 0.26	30.57 ± 1.13
	a/b	23.47 ± 3.74	23.51 ± 3.66	17.48 ± 1.79
	r^2/dr^2	$0.9754/ 0.9515/ 0.9273$	$0.9764/ 0.9533/ 0.9299$	$0.9892/ 0.9785/ 0.9677$
$\alpha - E_T^N$		$\Delta G^\#=a_0 + a \alpha + b E_T^N$	$\Delta G_{E-T}^\#=a_0 + a \alpha + b E_T^N$	$\Delta G_{E-S}=a_0 + a \alpha + b E_T^N$
	a_0	$25.78 - 33.75 \alpha + 81.74 E_T^N$	$-57.60 - 33.83 \alpha + 81.92 E_T^N$	$-28.65 - 25.23 \alpha + 60.98 E_T^N$
	a	2.79 ± 6.61	-57.60 ± 6.49	-28.65 ± 3.37
	b	-33.75 ± 6.08	-33.83 ± 5.97	-25.23 ± 3.10
	a/b	81.74 ± 14.06	81.92 ± 13.80	60.98 ± 7.17
	r^2/dr^2	0.41	0.41	0.41
	r^2/dr^2	$0.9717/ 0.9443/ 0.9165$	$0.9727/ 0.9462/ 0.9193$	$0.9859/ 0.9720/ 0.9580$

Tablo 151: (devam) Asetonitrilin solvatokromik parametrelerinin enzimin termodinamik ($\Delta G^\#$, ΔG_{E-S} , $\Delta G_{E-T}^\#$) değerleri ile ilişkili çoklu lineer regresyon denklemleri (r^2/dr^2 : korelasyon katsayısı/regresyon katsayısı/düzeltilmiş regresyon katsayısı)

		$\Delta G^\# = a_0 + a \beta + b \pi^*$	$\Delta G_{E-T}^\# = a_0 + a \beta + b \pi^*$	$\Delta G_{E-S} = a_0 + a \beta + b \pi^*$
$\beta - \pi^*$		$0.0000 + 1.0000 \beta + 0.0000 \pi^*$	$-52.02 + 15.23 \beta + 23.91 \pi^*$	$-24.17 + 10.66 \beta + 17.75 \pi^*$
	a_0	0.00	-52.02 ± 4.06	-24.17 ± 1.99
	a	1.00	15.23 ± 4.09	10.66 ± 2.00
	b	0.00	23.91 ± 3.73	17.75 ± 1.83
	a/b	1.00	0.62	0.60
	r^2/dr^2	1.0000/1.0000/1.0000	0.9750/ 0.9507/ 0.9259	0.9885/ 0.9772/ 0.9658
$\beta - E_T^N$		$\Delta G^\# = a_0 + a \beta + b E_T^N$	$\Delta G_{E-T}^\# = a_0 + a \beta + b E_T^N$	$\Delta G_{E-S} = a_0 + a \beta + b E_T^N$
	a_0	$171.16 - 322.18 \beta + 52.72 E_T^N$	$88.12 - 322.97 \beta + 52.84 E_T^N$	$77.41 - 233.13 \beta + 38.11 E_T^N$
	a	171.16 ± 16.37	88.12 ± 15.93	77.41 ± 11.96
	b	-322.18 ± 48.47	-322.97 ± 47.19	-233.13 ± 35.43
	a/b	52.72 ± 7.37	52.84 ± 7.18	38.11 ± 5.39
	r^2/dr^2	6.11	6.11	6.12
	r^2/dr^2	0.9797/ 0.9598/ 0.9397	0.9807/ 0.9618/ 0.9427	0.9790/ 0.9584/ 0.9377
$\pi^* - E_T^N$		$\Delta G^\# = a_0 + a \pi^* + b E_T^N$	$\Delta G_{E-T}^\# = a_0 + a \pi^* + b E_T^N$	$\Delta G_{E-S} = a_0 + a \pi^* + b E_T^N$
	a_0	$37.62 + 22.79 \pi^* + 2.40$	$-45.73 + 22.84 \pi^* + 4.07$	$-19.77 + 17.01 \pi^* + 1.67$
	a	14.63 ± 4.16	-45.73 ± 4.08	-19.77 ± 1.99
	b	22.79 ± 3.80	22.84 ± 4.08	17.01 ± 1.83
	a/b	2.40 ± 0.63	2.39 ± 4.08	1.67 ± 0.30
	r^2/dr^2	9.50	9.78	10.19
	r^2/dr^2	0.9753/ 0.9513/ 0.9270	0.9763/ 0.9531/ 0.9297	0.9891/ 0.9783/ 0.9675

4.2 TARTIŞMA

4.2.1 Alkalen proteazın kinetik özellikleri üzerine organik çözücülerin etkisi

Proteazların organik çözücü ortamında inhibisyonuna ilişkin literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Muta ve Inouye [102] tarafından gerçekleştirilen *Bacillus thermoproteolyticus* soyundan saflaştırılan termolizin enzimi üzerinde metanol, etanol, n-propanol ve i-propanol'ün etkilerinin incelendiği çalışmada kullanılan organik çözücülerin artan konsantrasyonlarının enzim üzerinde tersinir inhibisyon etkisi oluşturduğu belirlenmiştir. Çalışmada floresent substrat (7-metoksikumarin-4-il) asetil-L-Pro-L-Leu-Gly-L-Leu-[N³-(2,4-dinitrofenil)-L-2,3-diamino-propiyonil]-L-Ala-L-Arg-NH₂ ya da kısaca MOCAC-PLGL(Dpa) kullanılmış ve inhibisyon tipinin kompetitif tip inhibisyon olduğu rapor edilmiştir. Ancak v değerinin V_{max} değerinden çok düşük olması ya da K_i değerinin K_m değerine çok yakın olması durumunda kompetitif inhibisyonunun non-kompetitif inhibisyondan çok zor ayırt edileceği bildirilmiştir. Rapor edilen çalışmada substrat konsantrasyonu, K_m değerinden oldukça küçük alınmış, bu yüzden inhibisyon tipinin belirlenmesinin zor olduğu ifade edilmiştir. İnhibisyon sabitlerini belirlemek üzere çizilen ikincil çizimlerden ise inhibisyonun basit (gerçek) kompetitif inhibisyon olduğu ve metanol, etanol, n-propanol ve i-propanol için K_i inhibisyon sabitlerinin sırasıyla 430, 100, 38 ve 65 mM olduğu bildirilmiştir. Çalışmada en yüksek inhibitör etki gösteren çözücünün n-propanol olduğu ifade edilmiş ve bu etki n-propanoldeki karbon atomu sayısının etanol ve metanol'den fazla olmasına bağlanmıştır. Aynı sayıda karbon atomuna sahip ancak dallanmış yapıdaki i-propanolün ise inhibitör etkisinin n-propanolden daha düşük olması ile birlikte en yüksek inhibitör etkiyi gösteren ikinci sıradaki çözücü olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlar ışığında termolizin yüzeyinde alkoller için bağlanma bölgesi olabileceği, bağlanma bölgesi boyutlarının n-propanolün bağlanması için yeterli büyüklükte olduğu ve bu durumda termolizin aktivitesinin inhibisyonu ile sonuçlandığı rapor edilmiştir [102]. Bizim çalışmamızda da aynı organik çözücülerin artan konsantrasyonlarının *B. clausii* GMBAE 42 soyundan saflaştırılan alkalen proteaz enzimi üzerinde tersinir inhibisyon oluşturduğu bulunmuştur. Çalışmamızda substrat olarak kazein kullanılmış ve kazein

hidrolizi katalizlenmiştir. Metanolün artan konsantrasyonları varlığında kısmi non-kompetitif inhibisyon, etanol, n-propanol ve i-propanolün artan konsantrasyonları varlığında ise gerçek non kompetitif inhibisyon gözlenmiş ve K_i inhibisyon sabitleri sırası ile 3.055, 3.545, 1.305 ve 2.245 M olarak hesaplanmıştır. Bizim çalışmamızda da Muta ve Inouye'nın bulgularına benzer olarak en yüksek inhibitör etkiyi gösteren çözücünün n- propanol ve bu çözücüyü takiben i-propanol olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan kazeinin konsantrasyonu $0.33-2 K_m$ aralığında olduğundan inhibisyon tipini belirlemede Muta ve Inouye tarafından gerçekleştirilen çalışmada ifade edilen zorluklar ile karşılaşılmamıştır. *B. thermoproteolyticus* termolizin'i termostabil bir nötral metaloproteazdır. Bizim enzimimiz ise pH stabil serin alkalen proteazdır. Bu nedenle aynı çözücülerin farklı tipte proteazlarla farklı tipte inhibisyon yapması mümkündür. Alkollerin termolizin üzerinde yaptıkları kompetitif inhibisyon nedeniyle enzimin aktif bölgesine bağlanmak üzere substrat MOCAc-PLGL(Dpa) ile alkoller yarışmaktadır. Bizim enzimimizde ise kısmi ya da gerçek non-kompetitif inhibisyonların görülmesi alkollerin enzimimize aktif bölgenin dışında bir bölgede bağlanarak protein molekülü üzerinde tersinir inhibisyon oluşturan bir konformasyonel değişikliğe neden olduğunu düşündürmektedir.

Alam ve ark [103]. tarafından yapılan bir başka çalışmada *B. thermoproteolyticus* soyundan saflaştırılan kristal yapıdaki termolizin ile farklı organik çözücüler varlığında N-(benziloksikarbonil)-L-fenilalanil-L-fenilalanin metil esteri sentezi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan metanol, etanol, propanolün enzim üzerinde tersinir karışık tip inhibisyona neden olduğu, artan organik çözücü konsantrasyonu ile enzimin K_m değerinin dereceli olarak arttığı, V_m ve k_{cat}/K_m değerlerinin ise azaldığı rapor edilmiştir. Çalışmada inhibisyonun kısmi kompetitif ve gerçek non-kompetitif inhibisyon karışımı olduğu bildirilmiştir. Böyle karışık inhibisyonlar söz konusu olduğunda inhibitörler varlığında reaksiyon ilerleyişinde EI ve ESI (ya da EIS) komplekslerinin ES kompleksine daha baskın olabileceği ve bu durumun kompetitif ve non-kompetitif inhibisyonlar için göze çarpan bir özellik olduğu bilinmektedir. Alam ve ark [103]. propanol, etanol ve metanol için K_i inhibisyon sabitlerini sırasıyla 0.13, 0.10 ve 0.08 M olarak bildirilmiş ve en güçlü inhibisyon etkisinin propanolde görüldüğünü ifade etmişlerdir. Bu durum Muta ve Inouye [102]'nin K_i sabitini göz önüne alarak n-propanolün inhibitör etkisi üzerindeki ifadeleriyle çelişir

görülmektedir. Ancak Alam ve arkadaşlarının [103] çalışmasındaki inhibisyon etkisi karışık inhibisyon etkisi olup çalışılan çözücüler içinde en küçük k_{cat}/K_m değerlerine sahip olan çözücünün n-propanol olduğu görülmektedir. k_{cat}/K_m enzimin katalitik performansının ölçüsüdür. Bu nedenle en küçük k_{cat}/K_m veren n-propanolün termolizin için en kuvvetli inhibitör olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da serbest enzimin ve sırasıyla n-propanol, i-propanol, etanol ve metanolün %20 konsantrasyonları varlığında k_{cat}/K_m değerleri sırasıyla 50.68, 12.32, 20.95, 35.65 ve 25.12 ($\text{dak}^{-1})(\text{mg/mL kazein})^{-1}$ olarak hesaplanmış ve en düşük k_{cat}/K_m 'in n-propanol ile elde edildiği görülmüştür. Bu bulgu Alam ve arkadaşlarının [103] bulguları ile uyumludur. Ancak Alam ve arkadaşları [103] alkollerdeki karbon sayısına bağlı olarak görülen k_{cat}/K_m 'in dereceli azaldığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise böyle bir durum görülmemiştir. Bu durumun metanolün kısmi non-kompetitif inhibisyonundan kaynaklandığı düşünülebilir. Zira bizim çalışmamızda yalnız metanol kısmi non-kompetitif inhibisyon yapmış diğer alkoller ise gerçek non-kompetitif inhibisyon göstermiştir. Bu nedenle metanol etanolden daha küçük k_{cat}/K_m vermiştir.

Alam ve ark. [103] alkollerin daha çok enzimin aktif bölgesini ya da aktif bölgenin mikroçevresini etkilediğini aktif bölge dışındaki etkileşimlerin enzim inhibisyonu üzerinde önemli bir rol oynamadığı rapor etmişlerdir [103]. Bizim çalışmamızda ise alkollerin non-kompetitif tip inhibisyonlar yapması nedeniyle enzim üzerinde farklı bir bağlanma bölgelerinin olduğunu göstermektedir.

Pazhang ve ark. [104] termolizinin katalizlediği ve substrat olarak kazeinin kullanıldığı çalışmada n-propanol ve i-propanol varlığında termolizinin yapısal ve fonksiyonel değişimi incelenmiştir. Çalışmada organik çözücülerin enzimi tersinir olarak inhibe ettiği, termolizinin katalitik potansiyelinin organik çözücü konsantrasyonu arttıkça azaldığı ve düşük konsantrasyonların bile enzimi şiddetle inhibe ettiği rapor edilmiştir. n-propanol ve i-propanol varlığında enzimin K_m değerinin arttığı, V_m değerinin azaldığı ve bu organik çözücüler varlığında enzimin karışık tip inhibisyona uğradığı bildirilmiş ancak karışık tip inhibisyonun hangi inhibisyonları içerdiği belirtilmemiştir. Çalışmada n-propanol varlığında EI (K_i) kompleksi oluşumu için inhibisyon sabiti 0.18 mM, ESI (K_i) kompleksi oluşumu

için inhibisyon sabiti 0.25 mM, i-propanol varlığında ise bu değerler sırası ile 0.25 mM ve 0.45 mM olarak rapor edilmiştir. Organik çözücülerin enzimatik reaksiyon hızına iki çeşit etkisi olabileceği; bunlardan ilkinin enzimin konformasyonel yapısının bozulması, ikincisinin ise muhtemel inhibitörlerin enzim ile spesifik etkileşimde bulunarak substrat özgünlüğünü değişikliğe uğratması şeklinde olabileceği bildirilmiştir [104]. Bizim çalışmamızda ise n-propanol ve i-propanol varlığında enzim üzerinde non-kompetitif inhibisyon etkisi gözlemlendiğinden K_m değişmemiş V_m artan çözücü konsantrasyonu ile azalmıştır. n-propanol ve i-propanol varlığında basit non-kompetitif inhibisyon gerçekleştiğinden ve $K_i = K'_i$ olduğundan (86) n-propanol ve i-propanol için bu değerler sırasıyla 1.305 M ve 2.245 M olarak hesaplanmıştır. Non-kompetitif inhibisyonda K_m değişmediğinden enzimin substrat afinitesinde inhibitörden kaynaklanan bir değişim olamaz. İnhibitör etki enzimin konformasyonel yapısındaki değişiklikten kaynaklanmaktadır.

Simon ve ark. tarafından yapılan çalışmada [111] etanol, DMSO, asetonitril ve 1,4-dioksanın sıgır pankreas tripsini, kimotripsin ve karboksipeptidaz A (CPA) enzimlerinin konformasyonel kararlılıkları üzerindeki etkileri çalışılmıştır. Çalışmada tripsin için N-benzoil-L arjinin-etil ester (BAEE), kimotripsin için N-asetil-L tirozin-etil ester (ATEE), CPA için hippüril-L-fenil alanin kullanılmıştır. Kararlılık çalışmaları fosfat tamponu içinde farklı organik çözücülerin farklı konsantrasyonları varlığında 24 °C'de 40 dakika süre ile inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Çalışmada asetonitril ve 1,4-dioksan varlığında tripsin ve CPA'da çok az aktivite kaybı gözlenirken kimotripsinin aktivite kaybının daha belirgin olduğu, bununla birlikte asetonitril ve 1,4-dioksanın düşük konsantrasyonlarında aktivitede artış gözlemlendiği bildirilmiştir. Tripsin ve CPA aktivitesinin organik çözücü konsantrasyonundaki artış ile az miktarda azaldığı ve bunun sebebinin de enzimlerin konformasyonlarında meydana gelen küçük değişimlerden olabileceği bildirilmiştir. Ancak çalışmada organik çözücüler varlığında enzimin kinetik ve termodinamik parametrelerinin sayısal değişimi rapor edilmemiştir.

Simon ve ark tarafından yapılan bir başka çalışmada [112] farklı konsantrasyonlardaki asetonitril ve 1,4-dioksanın tripsin ve α -kimotripsininin kinetik

parametreleri ($K_{m, \text{gör}}$) ve kararlılıkları üzerine etkileri incelenmiş ve bu etkiler ile enzimlerin yapısal değişiklikleri arasında ilişkiler kurulmuştur. Çalışmada tripsin için BAEE, α -kimotripsin için ATEE substratları kullanılmıştır. 1,4-dioksanın aprotik, asetonitrilin ise dipolar karaktere sahip çözücü olduğu ve her iki enzimin de organik çözücülerin düşük konsantrasyonlarından yükseğe çıkıldıkça $K_{m, \text{gör}}$ değerlerinin azaldığı ancak % 80 konsantrasyonunun üzerine çıkıldığında ise $K_{m, \text{gör}}$ değerlerinin de arttığı rapor edilmiştir. Enzimlerin kararlılık çalışmaları organik çözücüler varlığında 25 °C'de 20 dakika süre ile inkübe edilerek gerçekleştirilmiş ve % 0-90 organik çözücü konsantrasyonlarında çalışılmıştır. α -kimotripsininin kalan aktivitesinin organik çözücülerin artan konsantrasyonları ile azaldığı %85'in üzerindeki konsantrasyonlarda ise arttığı, tripsinin de benzer davranış gösterdiği belirtilmiştir [112]

Simon ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada [113] asetonitril, 1,4-dioksan ve etanolün substrat olarak hemoglobinin kullanıldığı pepsin üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmada asetonitril ve etanolün % 60 konsantrasyonunun üzerine çıkıldığında katalitik aktivitede kayıplar olduğu belirtilmiş, 1,4-dioksan varlığında ise enzimatik aktivitenin % 30 konsantrasyona kadar korunduğu ancak %60 konsantrasyona çıkıldığında aktivitenin tamamen kaybolduğu bildirilmiştir. Etanol ve asetonitril varlığında aktivite kaybı nedeninin enzimin dördüncül yapısının bozulmuş olabileceğinden kaynaklandığı rapor edilmiştir. 1,4-dioksan için ise bu konsantrasyonun % 30'dan itibaren başladığı bildirilmiş ancak enzimin bu konsantrasyonlar varlığında kinetik parametreleri çalışılmamıştır.

Kamal ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada [114] subtilisin calberg enziminin Ala-Ala-Phe-7-amido-4-metil kumarin (AAF-AMC) ve süksinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid (suc-AAPF-p-Na) substratları kullanılarak asetonitril ve dioksan varlığında ve farklı pH'lardaki aktivitesi ölçülmüştür. Çalışmada % 40 asetonitril ve % 50 dioksan ilavesi ile enzimin k_{cat}/K_m değerlerinin 2-3 kat azaldığı rapor edilmiştir.

Pazhang ve ark. [104] tarafından gerçekleştirilen çalışmada DMF ve DMSO konsantrasyonu artışı ile termolizinin kazein hidrolizine ilişkin katalitik

potansiyelinin azaldığı bunun sebebinin de enzimin dördüncül yapısındaki bozunmadan kaynaklanabileceği rapor edilmiştir. DMF ve DMSO'nun artan konsantrasyonları varlığında enzimin K_m ve V_m değerlerinin azaldığı ve karışık tip inhibisyon etkisi gösterdikleri bildirilmiş. DMF ve DMSO varlığında K_i inhibisyon sabitleri sırası ile 7.63 ve 7.70 mM olarak hesaplanmıştır. DMF ve DMSO'nun n-propanol ve i-propanolden daha büyük K_i değerleri vermesi bu çözücülerin n-propanol ve i-propanole kıyasla daha küçük inhibisyone neden olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Mansfeld ve Hofmann tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise [115] *Bacillus stearothermophilus*'dan saflaştırılan termostabil termolizin benzeri proteazın kazein hidrolizinin üzerine metanol, 2-propanol, DMSO, dioksan, asetonitril ve DMF çözücülerinin etkisi incelenmiştir. 37 °C ve 48 saat süren inkübasyon ile organik çözücüler varlığında ve aktivite ölçümünden önce organik çözücü konsantrasyonu 0.5 % (v/v)'in altına seyreltilerek enzimin kazein hidrolizi incelenmiş ve süre sonunda enzimin organik çözücüler tarafından tersinmez inaktivasyona uğratıldığı bildirilmiştir. Çalışmada inhibisyon etkisi metanol > i-propanol > DMSO > dioksan >asetonitril>DMF olarak rapor edilmiştir. Organik çözücülerin fizikokimyasal parametreleri (log P, dielektrik sabiti, polarite indeksi, denatürasyon kapasitesi) ile enzim kararlılığı arasında korelasyon bulunmadığı belirtilmiştir.

Tez çalışmamızda 1,4-dioksan, DMF ve asetonitrilin artan konsantrasyonları varlığında kararlılık çalışmaları Simon ve ark. çalışmalarına benzer şekilde enzimi 30°C'de 120 dakika inkübe ederek ve kalan aktivite ölçülerek yapılmıştır [111, 112, 113]. Simon ve ark. [111, 112, 113] tripsin, kimotripsin, pepsin ve CPA'nın ve Kamal ve ark. [114] Subtilisin Carlsberg'in asetonitril ve dioksan varlığında inhibisyonunu bildirirken, Pazhang ve ark. [104] termolizinin DMF varlığında inhibisyonunu ve Mansfeld ve Hofmann [115] ise termolizinin dioksan, asetonitril ve DMF varlığında tersinmez inhibisyona uğradığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise 1,4-dioksanın, DMF'nin artan konsantrasyonlarında ve asetonitril varlığında %30 konsantrasyondan itibaren aktivasyon gözlenmiştir. Literatürde bu organik çözücüler varlığında alkalen proteaz enziminin aktivasyonuna dair bir rapora ulaşamamıştır. Yukarıda belirtilen çalışmalarda kullanılan organik çözücüler

varlığında enzimin kinetik parametreleri belirtilmemiştir. Ancak bizim çalışmamızda 1,4-dioksan, DMF ve asetonitrilin artan konsantrasyonları için aktivasyon kinetiği çalışılmış ve enzimin termodinamik değerleri hesaplanmıştır. 1,4-dioksan, DMF ve asetonitrilin artan konsantrasyonlarının enzim üzerinde zorunlu olmayan aktivatör etkisi yaptığı belirlenmiştir. Aktivasyon kinetiğine uygun olarak artan organik çözücü konsantrasyonlarında enzimimizin K_m değerleri lineer azalmış, V_m , k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri ise lineer olarak artmıştır.

Çalışmamızda asetonitrilin artan konsantrasyonları varlığında çizilen Lineweaver-Burk diyagramı zorunlu olmayan aktivasyon için çizilen grafiğe benzer olmasına rağmen α , β ve K_A sabitlerinin hesaplanmasında kullanılan üçüncül çizim zorunlu olmayan aktivasyon modelinden farklılık göstermiştir. Ancak her bir konsantrasyon için oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramları kullanılarak ayrı ayrı hesaplanan α değerinin 1'den küçük olması, β değerinin 1'den büyük olması aktivasyon durumunda görünen özelliktir [86]. Tüm konsantrasyonlar için hesaplanan K_A değerleri de birbirine çok yakın (6-6.63 M aralığında) bulunmuştur. Literatürde alkalin proteazlarla asetonitril arasında bu çeşit kinetik etkileşime rastlanmamıştır. Diğer taraftan artan asetonitril konsantrasyonlarında da N,N'-DMF ve 1,4-dioksanda olduğu gibi enzimimizin K_m değerleri lineer olarak azalmış; V_m , k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri ise lineer olarak artmıştır.

Organik çözücü olarak DMSO'nun da kullanıldığı tez çalışmamızda DMSO'nun % 20'ye artan konsantrasyonlarında kadar zorunlu olmayan aktivasyon % 20'nin üzerindeki DMSO konsantrasyonlarında ise un-kompetitif inhibisyon etkisi oluşturduğu gözlenmiştir. DMSO'nun % 20 konsantrasyonuna kadar aktivasyon kinetiği, % 30 konsantrasyonundan itibaren inhibisyon kinetiği çalışılmıştır. Literatürde DMSO'nun proteazların aktivitesi ve kararlılığı üzerine etkilerinin çalışıldığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır [104, 111, 115, 118, 119]. Pazhang ve ark. [104] tarafından gerçekleştirilen çalışmada termolizinin kazein hidrolizi üzerine DMSO'nun etkileri incelenmiştir. % 0-20 konsantrasyonları aralığında DMSO'nun enzim üzerinde karışık tip inhibisyon etkisi belirlenmiştir.

Tez çalışmamızda DMSO'nun % 30 konsantrasyonundan itibaren enzimimiz üzerindeki inhibisyon etkisiyle K_m ve V_m değerlerinin anlamlı derecede azalmıştır. Bu durum Pazhang ve ark. [104]'ün bulguları ile uyumludur. Ancak bizim çalışmamızda DMSO'nun büyük konsantrasyonlarının enzim üzerinde basit un-kompetitif inhibisyon etkisi oluşturduğu gözlenmiş ve K_i inhibisyon sabiti ise 6.69 (M) olarak hesaplanmıştır. Pazhang ve ark. [104] ise DMSO'nun termolizin üzerinde karışık tip inhibisyon yaptığını belirtmişler, DMSO için K_i değerini 7.70 mM olarak hesaplamışlar ve DMSO'nun diğer çözücülerden (n-propanol, i-propanol, N,N'-DMF) daha zayıf inhibisyona neden olduğunu açıklamışlardır. [n-propanol (K_i : 0.18 mM), i-propanol (K_i : 0.25 mM), DMSO (K_i : 7.70 mM)]. Bu bulgu bizim çalışmamız ile uyumludur. Çünkü çalışmamızda en yüksek K_i değeri DMSO için elde edilmiştir [n-propanol (K_i : 1.305 M), i-propanol (K_i : 2.245 M), DMSO (K_i : 6.54 M)]. Dolayısıyla en zayıf inhibisyon etkisi DMSO varlığında görülmüştür. Ayrıca DMSO, n-propanol ve i-propanolun log P değerleri ile K_i inhibisyon sabitleri arasında inhibisyon gücünün çözücünün hidrofobitesisi arttıkça arttığına dair ilişki olduğu belirlenmiştir (n-propanol için log P ve K_i değerleri sırası ile 0.34 ve 0.18 mM, i-propanol için 0.14 ve 0.25 mM ve DMSO için -1.34 ve 6.54 mM). Bu bulgu bizim çalışmamız için de uyumludur.

Simon ve ark. [111] tarafından gerçekleştirilen sığır pankreas tripsininin, kimotripsinin ve CPA'nın sırası ile BAEE, ATEE ve hüppüril-L-fenilalanin substratlarını katalizinde DMSO'nun etkilerinin incelendiği çalışmada kimotripsininin % 30, CPA'nın % 60 ve tripsinin % 50 DMSO varlığında katalitik aktivitelerinde değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Tripsin hariç % 80 DMSO varlığında bile başlangıç aktivitesinin %60'nın korunduğu ve düşük DMSO konsantrasyonlarında aktivitede artış gözlemlendiği rapor edilmiştir. Aynı zamanda DMSO'nun enzim konformasyonel yapısı üzerindeki etkisinin oldukça hızlı olduğu rapor edilmiştir. Ancak çalışmada inhibisyon ya da aktivasyon için kinetik veriler belirtilmemiştir.

Tez çalışmamızda enzimin DMSO varlığındaki davranışı Simon ve ark. [111]'ün bulgularına benzer olmakla birlikte çalışmamızda kazein en fazla DMSO'nun % 50 konsantrasyonunda çözünebildiğinden çalıştığımız konsantrasyonlar % 0-50

aralığında seçilmiştir. Bizim çalışmamızda da % 50 DMSO konsantrasyonu varlığında Simon ve ark. [111]'in bulgularına benzer olarak aktivite tamamen yitirilmemiş ve düşük DMSO konsantrasyonları varlığında enzim üzerinde aktivasyon etkisi gözlenmiştir.

Mansfeld ve Hoffman [115] tarafından gerçekleştirilen çalışmada termostabil termolizin benzeri proteazın kazein hidrolizinde DMSO'nun etkileri incelenmiş ve organik çözücü varlığında enzimin tersinmez inhibisyona uğradığı rapor edilmiş, inhibisyon kinetiği çalışılmamıştır. Ancak bizim çalışmamızda gerçekleşen inhibisyon tersinir olup, kinetik çalışmamızda inhibisyon tipi gerçek un-kompetitiftir.

Eremeev [119] tarafından gerçekleştirilen çalışmada α -kimotripsinin farklı substratları katalizi sırasında DMSO'nun etkileri incelenmiştir. Çalışmada DMSO varlığında enzimin BTEE (N-benzoil-L-tirozin etil ester), ATEE (N-asetil-L-tirozin etil ester), ester türevi substratları ve ATNA (N-asetil-L-tirozin p-nitroanilid), BTNA (N-benzoil-L-tirozin p-nitroanilid) nitroanilid türevi substratları hidrolizi incelenmiş ve aynı çözücü konsantrasyonunda enzimin farklı substratları farklı hızlarda katalizlediği rapor edilmiştir. DMSO varlığında BTNA hidrolizi incelendiğinde enzimin Michealis parametrelerinin DMSO konsantrasyonundan bağımsız olduğu (değişmediği) gözlenmiştir. Ancak aynı koşullarda ATEE substratı kullanıldığında ise katalitik sabitin (k_{cat}) azaldığı ve 0-2M DMSO konsantrasyonu varlığında enzimin non-kompetitif inhibisyona uğradığı rapor edilmiştir. Aynı şartlar altında substrat olarak ATNA kullanıldığında ise 1M DMSO konsantrasyonunun üzerinde enzimin organik çözücü varlığında substratı hidrolizlemesinde aktivasyon etkisi görülmüş gözlenen aktivasyonun ise ($\alpha = \beta > 1$) non-kompetitif aktivasyon olduğu bildirilmiştir. DMSO-su karışımında görülen bu aktivasyonun substrat yapısında görülen minimal değişikliklerden kaynaklandığı belirtilmiştir. Ester ve nitroanilid türevlerinin kullanıldığı substratlarda nitroanilid türevi substratlardaki N-benzoil substitue grupları ester türevi substratlardaki asetil grupları ile yer değiştirdiğinde kinetik tablonun dramatik olarak değiştiği ester substratı varlığında aktivitenin düştüğü ancak aynı şartlar altında nitro substratı varlığında aktivitede anlamlı artışlar gözlemlendiği rapor edilmiştir. Böyle bir farklılığın DMSO'nun substratın N-açıl

grubunun proteindeki bağlanma bölgesi ile spesifik etkileşimlerde bulunduğunun kanıtı olduğu bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızda da DMSO'nun artan konsantrasyonları varlığında enzimin kazein hidrolizi sırasında Eremeev [119]'in çalışmasında ATNA substratının kullanıldığı duruma çok benzer bir durumla karşılaşılmış, belli bir konsantrasyona kadar (bizim çalışmamızda 2.82 M DMSO, Eremeev [118] çalışmasında 2 M DMSO konsantrasyonuna kadar) aktivitede artış; daha yüksek konsantrasyonlarda katalitik aktivitenin azaldığı gözlenmiştir. Tez çalışmamızda DMSO'nun düşük konsantrasyonlarında enzim üzerinde zorunlu olmayan aktivatör etkisi oluşturduğu görülmüş α değeri 0.72, β değeri 1.19 ve K_A değeri 0.42 M olarak hesaplanmıştır ki $\alpha < 0$, $\beta > 1$ olması zorunlu olmayan aktivasyonda görülen durumdur [86]. Çalışmamızda aktivasyonun görülmesinin sebebi DMSO'nun enzimin aktif bölgesi ile spesifik etkileşimlerde bulunup enzimin fleksibilitesini arttırıp, protein substratı ve büyük molekül olan kazeinin bağlanmasını kolaylaştırdığı ve/veya kazeinin çözünürlüğünü arttırıp katalizi hızlandırdığı düşünülmektedir [116, 117]. Ancak %30 (v/v) DMSO konsantrasyonuna çıkıldığında (~ 4 M) enzim üzerinde görülen inhibisyonunun sebebinin yüksek organik çözücü konsantrasyonunun enzimin mikroçevresindeki zorunlu su bağlarını kırarak inhibisyona sebep olduğu [116] ya da yüksek organik çözücü konsantrasyonunun kazein yapısını tahribata uğratarak kataliz hızını düşürdüğü düşünülmektedir [118].

4.2.2 Alkalen proteazın termodinamik özellikleri üzerine organik çözücülerin etkisi

Tez çalışmamızda alkalen proteazla kazein hidrolizine ilişkin termodinamik değerlerden; aktivasyon serbest enerjisi ($\Delta G^\#$) ve tranzisyon hali bağlanma serbest enerjisinin ($\Delta G_{E-T}^\#$) artan metanol, etanol, n-propanol ve i-propanol konsantrasyonlarıyla arttığı ancak substrat bağlama serbest enerjisinin (ΔG_{E-S}) ise etkilenmediği görülmüştür. Literatürde proteazlar için artan organik çözücü konsantrasyonlarında bu değerlerin hesaplandığı çalışmalara sıklıkla rastlanamamaktadır. Enzim ve substrat arasındaki maksimum bağlanma enerjisi

substrat üzerindeki tüm bağlanma gruplarının enzim üzerindeki bağlanma bölgeleri ile eşleşmesi durumunda görülür. Bu durumda enzim ve substrat birbirinin tamamlayıcısı olur. Reaksiyon boyunca substratın yapısı değiştiğinden, önce geçiş hali sonra ürünler oluşur, enzimin bozulmamış yapısı sadece substratın bir formu ile tamamlayıcı olabilir. Ancak enzim için tamamlayıcı olarak substratın tranzisyon halinin olması durumunun orijinal substrat yapısı ile tamamlayıcı olmasından katalitik olarak daha fazla avantaj sağlayacağı bildirilmiştir. Bu durumda yapısal değişikliklerden dolayı bağlanma enerjisi artar ve aktivasyon enerjisi düşer. Konformasyonel yapısı değişime uğramamış substrat enzimin tamamlayıcısı ise tranzisyon hali oluşumu bağlanma enerjisi azalır ve aktivasyon enerjisi artar [105].

Bizim çalışmamızda ΔG_{E-S} değeri değişmemiş ancak $\Delta G_{E-T}^{\#}$ değeri artan organik çözücü konsantrasyonu (metanol, etanol, n-propanol, i-propanol) ile artmıştır. Bu durum enzim için tamamlayıcı substrat formunun geçiş hali formundan çok orijinal substrat molekülü olduğunu göstermektedir. Bu durum alkoller varlığında enzimin konformasyonel yapısındaki değişikliğin ES kompleksi oluşumunu stabilize etmesinden ziyade $ES^{\#}$ kompleksini destabilize etmesiyle açıklanabilir. Böylelikle hidrolitik reaksiyonun aktivasyon serbest enerjisi ($\Delta G^{\#}$) artar. Gerçekten de organik çözücülerin artan konsantrasyonlarında inhibisyon etkilerinin de artması sonucu $\Delta G^{\#}$ değerlerinde de artmalar görülmüştür. Alkollerin enzimize yaptığı non-kompetitif inhibisyon nedeniyle K_m değişmediğinden ΔG_{E-S} değerinin değişmemesi nedeniyle inhibitörlerin enzimin substrat bağlanma bölgesi dışında başka bir bağlanma bölgesine bağlandığını göstermektedir. Bu bağlanma sonucunda enzimin katalitik bölgesinde gerçekleşen deformasyon sonucu inhibisyon etki görülmektedir.

Siddiqui ve ark. [106] *Aspergillus niger* karboksimetil selülazını (CMCaz) etil-3(3-dimetilaminopropil) karbodiimid varlığında glisinamid ve etilendiamin dihidroklorür ile modifikasyona uğratmışlar glisinamid modifiye enzimin $\Delta G^{\#}$ ve $\Delta G_{E-T}^{\#}$ değerlerinin düştüğünü, etilendiamin modifiye enzimin ise aynı değerlerinin arttığını görmüşlerdir. Glisinamid modifikasyonlu CMCaz'ın katalitik hızını arttırırken diğer modifikasyon azaltmıştır. Siddiqui ve ark. [106] etilen diamin modifikasyonundaki hız düşmesinin enzimin tranzisyon hali destabilizasyonundan

glisinamid modifikasyonundaki hız artışının ise tranzisyon hali stabilizasyonundan kaynaklandığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda alkalen proteazın kimyasal modifikasyonu söz konusu değildir. Ancak metanol, etanol, n-propanol ve i-propanolün artan konsantrasyonlarında ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger değerlerinin de arttığı görülmüştür. Bu da enzim substrat kompleksi tranzisyon hali destabilizasyonunun göstergesidir.

Bhatti ve ark. [107] *Fusarium solani* glukoamilazının 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) karbodiimid varlığında anilin hidroklorid ile 1, 7 ve 13 dakikalık sürelerde modifikasyona uğratmışlar; modifiye enzimler ile nişasta hidrolizinde en düşük ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger ve ΔG_{E-S} değerlerinin 7 dakikada modifikasyona uğrayan enzimde olduğunu gözlemişlerdir. Bu gözlemler sonucunda modifiye enzimin çözünür nişastaya olan afinitesinin ve tranzisyon kompleksi oluşumunun serbest enziminkinden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda artan metanol, etanol, n-propanol ve i-propanol konsantrasyonları varlığında artan ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger değerleri; artan organik çözücü varlığında tranzisyon kompleksi oluşum afinitesinin azaldığını göstermektedir. ΔG_{E-S} değerinin değişmemesi de metanol, etano, n-propanol ve i-propanolün enzimin substrat bağlama afinitesini etkilemediğini göstermektedir.

Öztürk ve ark. [108] *Escherichia coli* penisilin asilazının karboksimetil selülozla (CMC) konjugasyona uğratmışlar ve konjuge enzimin ΔG^\ddagger değerinin serbest enzime kıyasla azaldığını, konjuge enzimin geçiş hali bağlama enerjisinin (ΔG_{E-T}^\ddagger) daha çok salındığını ve konjuge enzimin katalitik verimliliğinin daha yüksek olduğunu bildirmişler, bu yüksekliğin tranzisyon hali destabilizasyonundan kaynaklandığını ifade etmişlerdir. Öztürk ve ark. [108] serbest ve CMC-konjuge enzimle penisilin G hidrolizine ilişkin ΔG_{E-S} değerlerini de incelemişler ve konjuge enzimin ΔG_{E-S} değerini serbest enziminkinden daha düşük bulmuşlardır. Bu durum substratın (Penisilin G) konjuge penisilin asilazın aktif bölgesiyle daha sıkı bağlanması şeklinde yorumlanmıştır. Bizim çalışmamızda serbest alkalen proteaza kıyasla mono alkoller varlığında elde edilen daha büyük ΔG^\ddagger ve daha düşük ΔG_{E-T}^\ddagger değerleri

alkollerin geçiş hali destabilizasyonu ile enzimati katalizi yavaşlattığını göstermektedir. Diğer taraftan değerlerinin anlamlı değerlikler içermemesi enzim-substrat kompleksi destabilizasyonunun ya da kazeinin enzimin aktif bölgesine olan bağlanma afinitesinin monoalkollerden etkilenmediğini göstermektedir [108].

Kamal ve ark. [114]'ın yaptığı çalışmada subtilisin carlsberg'in su-organik çözücü varlığında aktif bölge titrasyon deneylerinde katalitik triadının hemen hemen bozulmadığı ve oda sıcaklığında çalışılan organik çözücüler varlığında enzimin doğal yapısını koruduğu bildirilmiştir. Difüzyon, katalitik mekanizma, pH profili ve tranzisyon hali yapısının organik çözücü karışımından anlamlı şekilde etkilenmediği rapor edilmiştir [114]. Suc-AAPF-p-Na hidrolizi esnasında reaksiyon ortamı % 40 asetonitril ya da % 50 dioksan içerdiğinde ise ΔG^\ddagger değerlerinin yükseldiği ΔG_{E-S} değerlerinin azaldığı, enzim-substrat kompleksi oluşumunun azalmasıyla katalitik etkinin azaldığı rapor edilmiştir [114]. ES kompleksinin oluşumu substrat ve enzim arasındaki (E+S) solvasyonla ve ES'nin desolvasyonu ile azalmaktadır. Kamal ve ark. [114] Subtilisin Carlsberg ile Suc-AAPF-p-Na hidrolizinde substratın solvasyonunun artmasıyla enzim substrat kompleksi oluşumunun azaldığını bildirmişlerdir. Diğer taraftan Chin ve ark. [120] genellikle organik çözücüler varlığında enzimlerin desolvasyona uğradığını ve bunun da ES kompleksinin desolvasyonuna yol açtığını dolayısıyla ES oluşumunun azaldığını rapor etmişlerdir. Kamal ve ark. [114] asetonitril ve dioksan varlığında serbest subtilisindeki kıyasla üç kat daha küçük k_{cat} değerleri elde etmişler ve bunun nedeninin ES ve ES^\ddagger komplekslerinin desolvasyonundan ve konformasyonel esneklikteki sınırlamadan kaynaklandığını ifade etmişlerdir. Bizim çalışmamızda monoalkollerin kosolvent olması ile alkali proteazın kazein hidrolizine ilişkin k_{cat} değerleri azalmış ΔG^\ddagger değerleri artmıştır. Bu bulgular Kamal ve ark. [114] ile uyumludur ancak çalışmamızda ΔG_{E-S} değerlerinin değermemesi monoalkollerin enzimimize üzerine non-kompetitif inhibisyon yapmasından dolayıdır.

Çalışmamızda kazein hidrolizine ilişkin ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger ve ΔG_{E-S} değerlerinin artan 1,4-dioksan, N,N'-DMF ve asetonitril konsantrasyonları ile azaldığı görülmüştür. Bu durum çalışılan çözücüler varlığında enzimin konformasyonel yapısındaki

değişikliğinin $ES^{\#}$ kompleksinin stabilizasyonu ile açıklanabilir [105, 106, 107, 114]. Bu da enzim için tamamlayıcı substrat formunun orijinal substrat molekülünden ziyade substratın geçiş hali formunun olduğunu işaret etmektedir. Bu durum enzim-substrat kompleksi oluşumu için gerekli enerji miktarının azaldığını, enzimin kazeine olan afinitesinin arttığını ve tranzisyon hali kompleksi oluşumunun arttığını göstermektedir [106, 107]. ΔG_{E-S} değerlerinin de artan 1,4-dioksan, asetonitril ve DMF konsantrasyonu ile doğrusal olarak azalması bu görüşü desteklemektedir [107].

Kamal ve ark. tarafından yapılan çalışmada [114] organik çözücü varlığında ΔG_{E-S} değerinin azalması ile enzim-substrat kompleksi oluşumu azaldığı dolayısıyla bunu da enzimin katalitik aktivitesinin azalmasına neden olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise bu bulgunun tam tersi bir sonuç elde edilmiştir. Çalışmamızda da artan organik çözücü konsantrasyonu ile (1,4-dioksan, N,N'-DMF, asetonitril, DMSO'nun aktivatör etki gösterdiği konsantrasyonları) ΔG_{E-S} değerlerindeki azalmaya $\Delta G^{\#}$ ve $\Delta G_{E-T}^{\#}$ değerlerindeki azalmalar da eşlik etmiştir. Böylelikle $ES^{\#}$ kompleksinin stabilizasyonu olduğundan artan organik çözücü konsantrasyonu ile enzim aktivitesinde de artış görülmüştür.

Tez çalışmamızda DMSO'nun %0-20 konsantrasyonları arasında aktivasyon kinetiği %30-45 konsantrasyonları arasında inhibisyon kinetiği çalışılmıştır. Aktivasyonun gözlemlendiği konsantrasyonlarda çözücünün artan konsantrasyonlarıyla enzimin $\Delta G^{\#}$, $\Delta G_{E-T}^{\#}$ ve ΔG_{E-S} değerleri lineer olarak azalmıştır. $\Delta G^{\#}$ değerinin azalması DMSO'nun düşük konsantrasyonlarında katalizi hızlandırıldığını göstermektedir [105, 106, 107, 114]. Tranzisyon hali serbest enerji değerinin ($\Delta G_{E-T}^{\#}$) azalması ise tranzisyon hali kompleksinin stabilizasyonunu ve buna bağlı olarak kataliz hızının arttığının termodinamik göstergesidir. ΔG_{E-S} değerinin artan DMSO konsantrasyonu ile azalması enzimin kazeine olan afinite artışının termodinamik göstergesidir [107].

DMSO'nun %30-45 konsantrasyonları aralığında çalıştığımız inhibisyon kinetiğinde elde edilen kinetik ve termodinamik değerler de inhibisyon kinetiği ile uyumluluk göstermektedir. Artan DMSO konsantrasyonu ile enzimin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin

azalması; artan DMSO konsantrasyonlarında enzimin kataliz hızını ve katalitik performansını düşürdüğünü göstermektedir. DMSO'nun inhibitör konsantrasyonlarında enzimin ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger değerleri ile doğrusal olarak artan grafikler elde edilmiştir. Bu durum DMSO'nun geçiş hali destabilizasyonu ile enzimatik katalizi yavaşlattığını göstermektedir [108]. Diğer taraftan ΔG_{E-S} parametrelerinin doğrusal olarak azalması Kamal ve ark. [114]'ün bulgularına paralel olarak enzim-substrat kompleksi oluşumunun azalmasına ve dolayısıyla enzimin kataliz gücünün azalmasına neden olmaktadır.

4.2.3 Alkalin proteazın kinetik ve termodinamik özellikleri üzerine organik çözücülerin log P ve dielektrik sabiti değerlerinin etkisi

4.2.3.1 Log P etkisi

Log P değeri 2'den küçük olan hidrofilik çözücüler varlığında hızlı bir şekilde enzim inaktivasyonu gerçekleşirken, 4'ten büyük olan hidrofobik çözücüler varlığında ise yüksek enzim kararlılığı görülmektedir [109]. Polaritesi yüksek olan hidrofilik çözücüler su içinde çözünebilirler ve enzim için gerekli su tabakasını soyarak inaktivasyona sebep olurlar. Polaritesi düşük hidrofobik çözücülerin bu tür yeteneği olmadığı için inaktivasyona daha az sebep olurlar [67]. Tez çalışmamızda organik çözücülerin artan konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri hesaplanmış ve organik çözücü konsantrasyonu arttıkça artan log P değerleri elde edilmiştir. Çalışmamızda monoalkoller varlığında alkalin proteazın kinetik (k_{cat} ve k_{cat}/K_m) değerleri artan çözücü konsantrasyonlarıyla ilişkili log P değerleri ile doğrusal olarak azalmıştır. Aktivasyon etkisi gösteren çözücüler varlığında (1,4-dioksan, N,N'-DMF, asetonitril, DMSO) ise k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri lineer olarak artarken K_m değerleri lineer olarak azalmıştır.

Pazhang ve ark. [104] termolizin enzimi kullanarak yaptıkları çalışmada organik çözücülerin log P değerleri ile K_i inhibisyon sabitleri arasında zıt ilişki gözlemlendiği belirtilmiştir. Ancak kullandıkları log P değerleri saf organik çözücülere ait olup

çalışılan çözücü konsantrasyonlarındaki log P değerleri hesaplanmamıştır. Çalışmada organik çözücü olarak DMSO, DMF, n-propanol, i-propanol kullanılmış ve organik çözücülerin log P değerleri sıralaması n-propanol>i-propanol>DMF>DMSO iken K_i değerleri sıralamasının DMSO>DMF>i-propanol>n-propanol olduğu ve çözücünün inhibisyon gücünün, hidrofobisitesinin artmasına bağlı olduğu rapor edilmiştir. Yüksek hidrofobisiteye sahip olan çözücülerin termolizinin aktif bölgesine bağlanma eğilimlerinin fazla olduğu ve daha yüksek inhibitör etkisi oluşturdukları bildirilmiştir. n-propanol ve i-propanolün DMF'ye oranla daha yüksek log P değerine sahip olması termolizin üzerinde daha şiddetli destabilizasyon etkisi oluşturduğu ve bu çözücülerin termolizinin hidrofobik cepleri ile bağ yapıp enzimin dördüncül yapısının tahribatına neden olabileceği rapor edilmiştir [104]. DMF bağıl olarak daha düşük log P değerine sahip olmakla beraber protein molekülü için zorunlu su moleküllerini uzaklaştırarak protein yapısını bozabileceği bildirilmiştir [104]. Tez çalışmamızda inhibitör etki gösteren monoalkoller varlığında (metanol, etanol, n-propanol, i-propanol) ve DMSO'nun enzim üzerinde sırasıyla non-kompetitif ve un-kompetitif inhibisyon etkisi görülmüştür. Bu nedenle inhibitör çözücüler ile substrat (kazein) arasında enzimin aktif bölgesine bağlanma için bir yarışma söz konusu değildir. Bununla birlikte hidrofobisitesi yani log P değeri daha yüksek çözücülerde daha güçlü inhibisyon etkisi görülmüştür. % 20'lik çözücü konsantrasyonlarında (DMSO için % 30) organik çözücülerin log P değerlerindeki sıralama n-propanol >i-propanol> etanol > metanol >DMSO şeklide iken çözücülere ilişkin K_i değerlerinde olan sıralama DMSO>etanol>metanol>i-propanol>n-propanol şeklindedir. Sıralamalardaki bu eğilim Pazhang ve ark. [104] tarafından belirtilen eğim ile uyum içindedir. Bu durum çözücülerin inhibitör etkisinin enzimimizin mikroçevresindeki zorunlu olarak bulunması gereken su moleküllerini kısmen uzaklaştırarak onun konformasyonel yapısını bozması şeklinde açıklanabilir.

Alkoller söz konusu olduğunda log P değerleri metilen grup sayısı arttıkça artmaktadır. En yüksek log P değerine sahip olan alkol enzimin yapısal inhibisyonu için en etkili olanıdır. Hidrokarbon içeriğinin arttırılmasına zıt olarak hidroksil içeriği arttırıldığında ise alkollerin denatürasyon yetenekleri azalmaktadır [110]. Bizim

çalışmamızda da en uzun zincirli mono alkol olan n- propanol varlığında en yüksek inhibisyon etkisi görülmüştür.

Enzimlere denatürant etkisi olan organik çözücülerin reaksiyon ortamındaki konsantrasyonları arttıkça denatürasyon etkileri de artar. Ancak log P değeri yüksek olan organik çözücülerin düşük konsantrasyonlarında denatürasyon etkisi daha az görülmektedir [110]. Bizim çalışmamızda da organik çözücülerin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak artan log P değerleri ile enzim üzerinde artan inhibitör etki gözlenmiştir.

Alkalin proteazlar için artan çözücü konsantrasyonu ile ilişkili log P değeri ile enzimin ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger , ΔG_{E-S} parametrelerinin ilişkilendirilmesine dair literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak organik çözücü (monoalkoller ve DMSO) konsantrasyonu arttıkça bu konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerleri de arttığından hesaplanan log P değerleri ile enzimin ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger değerleri arasında lineer olarak artan ilişkiler gözlenmiştir. Bu bulgu organik çözücülerin artan konsantrasyonları ile ilişkili log P değerlerinde enzim üzerinde artan inhibisyonun gerçekleştiğinin termodinamik göstergesidir. Artan mono alkol konsantrasyonları ile ilişkili log P değerlerine karşı ΔG_{E-S} değerleri de değişmediğinden ΔG_{E-S} değerinin çözücülerin log P değerlerinden etkilenmediği görülmüştür. Bu da mono alkollerin enzimin aktif bölgesi dışında bir başka bölgeye bağlandığının termodinamik göstergesidir. DMSO'nun inhibisyon gözlenen konsantrasyonları ile ilişkili log P değerlerine karşılık gelen ΔG_{E-S} değerleri ise lineer olarak azalmıştır. Bunun nedeni DMSO'nun yaptığı un-kompetitif inhibisyon sonucu K_m değerinin azalmasıdır.

Hirakawa ve ark. [87] tarafından termofilik alkol dehidrojenaz enziminin NAD^+ substratını hidrolizi üzerine organik çözücülerin log P değerlerinin etkisi incelenmiştir. Çalışmada asetonitril (log P: -0.33), DMF (log P: -1.0), ve DMSO (logP: -1.3)'nun artan konsantrasyonlarının enzim üzerinde aktivasyon etkisi oluşturduğu ve enzimin kinetik parametrelerini etkilediği, gözlenen aktivasyonun çözücülerin log P değerlerine bağlı olup çözücülerin kompozisyonlarından bağımsız olduğu bildirilmiştir [87]. Bu durumda enzim ve organik çözücü molekülü arasındaki

etkileşimin aktivite üzerinde etkisinin olmadığını ya da ihmal edilebileceğinin ve log P değeri ile değerlendirilen enzimin çevresindeki polaritenin aktivite için baskın faktör olabileceğinin göstergesi olduğu buna karşın K_m ve k_{cat} parametrelerinin ise çözücünün kompozisyonuna bağlı olduğu rapor edilmiştir [87]. Organik çözücü ilavesinin enzim üzerindeki etkisinin iki kısma ayrılması gerektiği bildirilmiştir. Birincisi enzim çevresinde polaritenin azalmasından kaynaklanan aktivasyon ve diğeri su içeriğinin azalmasından kaynaklanan inhibisyon. Çalışmada organik çözücüler varlığında aktivasyon gözlenmesinin temelini log P etkisinin oluşturduğu belirtilmiştir ve enzimin k_{cat} değerleri ile organik çözücülerin log P değerleri arasında iyi bir korelasyon gözlenirken; K_m değerleri ve log P değerleri arasında anlamlı korelasyonlar bulunmadığı bildirilmiştir [87].

Bizim çalışmamızda da 1,4-dioksan, DMF ve asetonitrilin artan konsantrasyonları varlığında Hirakawa ve ark. [87] çalışmasına benzer olarak aktivasyon etkisi gözlenmiştir. Enzimler farklı olmasına rağmen kullanılan organik çözücülerin enzim üzerindeki etkisi benzer olup enzimin katalitik performansını arttırdığı gözlenmiştir. Çalıştığımız aktivasyon gözlenen çözücüler arasında en yüksek log P değeri ve en büyük K_A değeri asetonitrilde gözlenmiştir. Bu durum Hirakawa ve ark. [87] yüksek log P değerli (yüksek hidrofobisiteli) çözücülerin enzim üzerinde daha yüksek aktivasyon yaptığı yorumuyla uyum içindedir. Buna göre asetonitril enzimin mikroçevresindeki 1,4-dioksan, N,N'-DMF ve DMSO'ya kıyasla daha fazla polarite azalmasına ve dolayısıyla daha yüksek aktivasyona neden olmaktadır. Bu durumu enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri de desteklemektedir. 1,4-dioksan, DMF ve asetonitrilin artan konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri ile enzimin K_m değerleri arasında doğrusal olarak azalan ilişkiler gözlenmiştir. Bu durum kullanılan organik çözücülerin aynı zamanda enzimin substrata olan afinitesini arttırdığını göstermektedir. Artan konsantrasyonlarla ilişkili log P değerleri ile enzimin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri arasında lineer olarak artan ilişkiler gözlenmiştir. Artan organik çözücü konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri ile enzimin termodinamik (ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger ve ΔG_{E-S}) değerleri arasında ise doğrusal olarak azalan ilişkiler görülmüştür. ΔG^\ddagger değerinin doğrusal olarak azalması enzimin kazein hidrolizi için gerekli aktivasyon serbest enerji değerini düşürdüğünü yani katalitik

etkisinin arttığını göstermektedir [105, 106, 107, 114]. $\Delta G_{E-T}^{\#}$ ve ΔG_{E-S} değerlerinin doğrusal olarak azalması ise organik çözücülerin tranzisyon halini ($ES^{\#}$) stabilize ettiğinin ve bu durumun da katalitik aktivitenin artmasının termodinamik göstergesidir [105].

Arroyo ve ark. [116] tarafından yapılan bir başka çalışmada penisilin V'nin penisilin V açılaz tarafından hidrolizinde su ile karışabilen organik çözücülerin kataliz üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmada kullanılan DMSO, dioksan, asetonitril ve DMF aprotik polar çözücüler olarak sınıflandırılmış ve bu çözücüler varlığında gerçekleşen aktivasyonun çözücünün doğasına ve ortamdaki konsantrasyonuna bağlı olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada enzim aktivitesi ile çözücülerin log P değerleri ilişkilendirilmiş ve penisilin V'nin hidrolizinin düşük log P değerlerinde (daha polar çözücülerde) daha hızlı olduğu bildirilmiştir. DMSO, dioksan, asetonitril ve DMF gibi bazı polar çözücülerin ürün olarak elde edilen 6-APA ve fenoksiasetik asitin çözünürlüğünü arttırarak difüzyonel sınırlamayı azalttığı ve aktivasyonu bu şekilde gerçekleştirdiği bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızda da Arroyo ve ark. [116] gerçekleştirdikleri çalışmada kullanılan dioksan, DMF ve asetonitril çözücülerini varlığında enzimin katalitik performansında artış görülmüştür. Ancak Arroyo ve ark. [116] penisilin V asilazın çalışılan çözücülerle aktivasyonunun çözücülerin azalan log P değerleri ile ilişkilendirmişlerdir. Aynı çözücülerini kullandığımız bizim enzimimizde ise artan log P değerlerinde daha büyük aktivasyonlar görülmüştür. Hidrolazlar sınıfına dahil enzimler için düşük log P değerinin enzim üzerinde toksik etkisi olduğu düşünülse bile [73, 117] bizim çalışmamızda düşük log P değerine sahip (polaritesi yüksek) 1,4-dioksan ve DMF ile asetonitrille olandan daha düşük aktivasyonlar elde edilmiştir. Asetonitrilin log P değerleri yani hidrofobisitesi diğerlerinden daha büyüktür. Bu da Hirakawa ve ark. [87] tarafından gerçekleştirilen çalışmada belirtildiği gibi yüksek polariteye sahip organik çözücülerin reaksiyon ortamının polaritesini aktivasyon lehine değiştirmesinden kaynaklanmaktadır.

Ruiz ve Castro [118] tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada haloalkolofilik *Natrialba magadii* tarafından üretilen hücre dışı proteazının azokazein hidrolizinin

çeşitli organik çözücüler varlığında aktivitesi ve kararlılığı incelenmiştir. Çalışmada yüksek polariteye sahip DMSO varlığında %15 (v/v)'lik konsantrasyonda enzim aktivitesinin %75'ten fazlasının korunduğu, daha yüksek konsantrasyonlarda (%30 (v/v)) kataliz hızının düştüğü bildirilmiştir. Yüksek konsantrasyondaki organik çözücü varlığında enzim aktivitesinin düşmesinin sebebi azokazeinin konformasyonel değişikliğe uğramasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Çalışmalarında DMSO (log P; -1.35), ve DMF (log P; -1.0)'nin log P değerleri birbirine yakın olmasına rağmen enzim üzerinde zıt etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise DMSO'nun düşük konsantrasyonlarında aktivite gözlenirken DMF'nin çalışılan tüm konsantrasyonlarında aktivitede artış gözlenmiştir. DMSO'nun artan konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri ile enzimin kinetik (k_{cat} , K_m , k_{cat}/K_m) ve termodinamik değerleri (ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger , ΔG_{E-S}) arasında oldukça iyi korelasyonlar veren grafikler elde edilmiştir. Enzimin; DMSO aktivasyon konsantrasyonlarında artan çözücü konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri ile ilişkili k_{cat} ve k_{cat}/K_m parametreleri arasında doğrusal olarak artan ilişkiler gözlenmiştir. Enzim aktivasyonu sırasında kataliz hızının ve katalitik performansının artması beklenen bir durumdur. Enzimin K_m değerleri ise artan konsantrasyonlarla ilişkili log P değerleri ile doğrusal olarak azalan grafikler oluşturmuştur ki bu durum organik çözücünün enzimin substrata olan afinitesini arttırdığını göstermektedir [86]. DMSO'nun aktivasyon konsantrasyonlarında artan konsantrasyonlar ile ilişkili log P değerleri ile enzimin termodinamik değerlerinin doğrusal olarak azalan ilişkiler vermesi organik çözücünün fizikokimyasal parametresi olan log P değerinin de enzimin kataliz gücünü arttırdığının termodinamik göstergesidir.

4.2.3.2 Dielektrik sabiti etkisi

Muta ve Inouye [102] tarafından gerçekleştirilen *Bacillus thermoproteolyticus* soyundan saflaştırılan termolizin enzimi üzerinde metanol, etanol, n-propanol ve i-propanol'ün artan konsantrasyonlarının dielektrik sabitlerinin enzim üzerindeki etkileri de incelenmiştir. Çalışılan mono alkol konsantrasyonları ile ilişkili hesaplanan dielektrik sabitlerine karşı termolizinin özgülük sabiti, k_{cat}/K_m işaretlenmiştir. Termolizinin aktivitesi ile reaksiyon ortamının dielektrik değerleri

arasında düşük dielektrik sabitlerinde düşük aktivitenin olduğu iyi bir korelasyon bulunduğu bildirilmiştir. Dielektrik sabiti parametresinin termolizin aktivitesi için çok önemli parametrelerden biri olduğu ve düşük dielektrik sabitlerinin enzimin aktivitesini de düşürdüğü rapor edilmiştir [102]. Metanol gibi zayıf inhibitör etkisi olan alkoller varlığında dielektrik sabiti ile termolizinin aktivitesi arasında farklı davranışlar görülmüş ve alkollerin dielektrik sabitleri dışında büyüklüğünün ve şeklinin de enzim aktivitesi üzerindeki inhibitör etki için önemli olduğu bildirilmiştir [102]. Bu nedenle metanol için grup I, etanol, n-propanol ve i-propanol için grup II sınıflandırılması yapılmış alkollerin enzim ve substrat ile hidrofobik ve elektrostatik etkileşiminin termolizin inhibisyonunda önemli bir rol oynayabileceği bildirilmiştir. I. grupta yer alan metanolün, enzimin aktif bölgesinde enzim ve substrat arasındaki etkileşimi etkileyip inhibisyon yarattığı öngörülmüştür. Metanolün enzimin aktif bölge cebi ile elverişli etkileşimlerde bulunduğu termolizinin yüzeyindeki elektrostatik ve hidrofobik etkileşimleri değiştirip reaksiyon ortamının dielektrik sabitini düşürdüğü bildirilmiştir. Grup II alkollerinin ise aktif bölge ile zayıf etkileşimlerde bulunduğu ve termolizini temelde reaksiyon ortamının dielektrik sabiti değerini düşürerek inhibe ettiği rapor edilmiştir [102]. Bizim çalışmamızda Muta ve Inouye'nin [102] çalışmasına benzer olarak mono alkollerin konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabitleri azaldıkça enzim inhibisyonunda artış görülmüştür. Mono alkoller varlığında enzimin kinetik parametreleri olan k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri ile artan mono alkol konsantrasyonu ile ilişkili dielektrik sabitleri arasında lineer olarak değişen ilişkiler gözlenmiştir. Ortamın dielektrik sabiti azaldıkça k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri de azalmaktadır, dolayısıyla bulgularımız Muta ve Inouye'nin [102] bulgularıyla uyumludur.

Tez çalışmamızda etanol, n-propanol ve i-propanol varlığında alkalen proteaz aktivitesi üzerinde gerçek non-kompetitif inhibisyon gerçekleşirken metanol varlığında kısmi non-kompetitif inhibisyon gerçekleşmiştir. Muta ve Inouye [102] ise termolizin üzerinde bu alkollerin kompetitif inhibisyonunu rapor etmişlerdir. Dolayısıyla onların yaptıkları gruplandırma bizim enzimimiz bağlamında elverişli değildir, çünkü monoalkoller varlığında bizim enzimimize substrat bağlanmasında bir engel yoktur. Monoalkoller bizim enzimimize aktif bölgenin dışında bir bölgede ya da bölgelerde bağlanmaktadır. Artan alkol konsantrasyonlarıyla azalan dielektrik

sabitinden kaynaklanan enzimimiz yüzeyinde muhtemel olan elektrostatik etkileşimlerdeki enzimin konformasyonel yapısını değiştirerek non-kompetitif tip inhibisyona neden olmaktadır. Monoalkollerin enzimimiz üzerindeki non-kompetitif tip inhibisyonundan dolayı enzimin K_m değeri değişmediğinden artan alkol konsantrasyonu ile ilişkili dielektrik sabiti değerlerinden K_m etkilenmemiştir. Bu da mono alkollerin farklı bir bağlanma bölgesi bulunduğunun fizikokimyasal göstergesidir.

Arroyo ve ark. [116] tarafından gerçekleştirilen çalışmada yüksek dielektrik sabiti değerine sahip çözücülerin düşük olanlara oranla enzimleri daha fazla esnek (flexible) kılacağı ve esnekliğin de katalitik etkiyi arttıracığı ifade edilmiş, organik çözücülerin maksimal konsantrasyonları ile dielektrik sabitleri arasında doğrusal ilişkiler olduğu bildirilmiştir. Ancak Arroyo ve ark. [116] çalışılan organik çözücü konsantrasyonu ile ilişkili dielektrik sabiti değerleri yerine saf çözücü dielektrik sabitlerini kullanmıştır. Bizim çalışmamızda monoalkoller varlığında enzimimizin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri artan çözücü konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabiti değerlerinin azalmasına bağlı olarak lineer olarak azalmıştır. Enzimimiz üzerinde aktivatör etki yapan 1,4-dioksan, N,N'-DMF, asetonitril ve DMSO varlığında enzimimizin k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri artan çözücü konsantrasyonları ile ilişkili dielektrik sabiti değerlerinin azalmasına bağlı olarak lineer olarak artmıştır. Monoalkoller varlığında enzimin K_m değerleri dielektrik sabitinden etkilenmezken aktivatör çözücülerin çalışılan konsantrasyonları ile ilişkili azalan dielektrik sabiti değerlerinde azalan K_m değerleri elde edilmiştir. Bu bulgular dielektrik sabitinin aktivatör solventler varlığında enzimin substrat bağlama afinitesini arttırdığının fizikokimyasal göstergesidir.

4.2.4 Organik çözücülerin solvatokromik parametrelerinin enzimin kinetik ve termodinamik özellikleri üzerindeki etkileri

Organik çözücülerin solvatokromik parametrelerinin enzimin kinetik ve termodinamik özellikleri üzerine etkileri çoklu lineer regresyon ile incelenmiştir. Çoklu lineer regresyonda kullanılan genel denklem aşağıdaki gibidir:

$$z=a_0 + a \text{ Solvatokromik parametre I} + b \text{ Solvatokromik parametre II}$$

z; kinetik ya da termodinamik özellikleri solvatokromik parametre I ve II solvatokromik parametrelerden herhangi iki tanesini ifade etmektedir. Hangi solvatokromik parametrenin enzimin kinetik ya da termodinamik özellikleri üzerinde etkisinin daha fazla olduğuna bakmak için a ve b sabitlerinin mutlak değer oranlarına bakılmıştır [76]. a/b oranı >1 ise a sabitine ait solvatokromik parametrenin enzimin kinetik ya da termodinamik özellikleri üzerinde daha etkin olduğu, a/b oranı <1 ise b sabitine ait solvatokromik parametrenin enzimin kinetik ya da termodinamik özellikleri üzerinde daha etkin olduğu belirlenmiştir. Metanol varlığında enzimin k_{cat} özelliği üzerinde solvatokromik parametrelerin etkisi incelendiğinde $\beta > \alpha$ (tablo 4.141), $E_T^N > \alpha$ (tablo 4.142), $\pi^* > \alpha$ (tablo 4.143), $\beta > E_T^N$ (tablo 4.144), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.145), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.146) olduğu görülmüştür. Buna göre metanol varlığında k_{cat} için $\beta > \pi^* > E_T^N > \alpha$ sıralaması yapılmış ve metanol varlığında k_{cat} özelliği için en etkin parametrenin β olduğu belirlenmiştir. Aynı sıralama V_m için yapıldığında $\beta > \alpha$ (tablo 4.141), $E_T^N > \alpha$ (tablo 4.142), $\pi^* > \alpha$ (tablo 4.143), $\beta > E_T^N$ (tablo 4.144), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.145), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.146) olduğu görülmüş ve metanol varlığında V_m için $\beta > \pi^* > E_T^N > \alpha$ olduğu görülmüştür. Aynı sıralama $\Delta G^\#$ özelliği için yapıldığında $\beta > \alpha$ (tablo 4.141), $E_T^N > \alpha$ (tablo 4.142), $\pi^* > \alpha$ (tablo 4.143), $\beta > E_T^N$ (tablo 4.144), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.145), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.146) olduğu görülmüş ve $\beta > \pi^* > E_T^N > \alpha$ sıralaması yapılarak enzimin $\Delta G^\#$ özelliği için en etkin parametrenin β olduğu görülmüştür. $\Delta G_{E-T}^\#$ özelliği için solvatokromik parametrelerin etkisi incelendiğinde $\beta > \alpha$ (tablo 4.141), $E_T^N > \alpha$ (tablo 4.142), $\pi^* > \alpha$ (tablo 4.143), $\beta > E_T^N$ (tablo 4.144), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.145), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.146) olduğu görülmüştür. Buna göre metanol varlığında $\Delta G_{E-T}^\#$ için $\beta > \pi^* > E_T^N > \alpha$ sıralaması yapılmış ve enzimin kinetik ve termodinamik özellikleri üzerinde en etkili solvatokromik parametrenin β olduğu belirlenmiştir.

Aynı sıralama etanol varlığında gerçekleştirilip enzimin k_{cat} özelliği üzerinde solvatokromik parametrelerin etkisi incelendiğinde $\beta > \alpha$ (tablo 4.141), $E_T^N > \alpha$ (tablo

4.142), $\alpha > \pi^*$ (tablo 4.143), $E_T^N > \beta$ (tablo 4.144), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.145), $E_T^N > \pi^*$ (tablo 4.146) olduğu görülmüştür. Buna göre etanol varlığında k_{cat} için en etkili solvatokromik parametrenin belirlenmesi için düzenleme yapıldığında; $E_T^N > \beta > \alpha > \pi^*$ sıralamasına göre etanol varlığında k_{cat} özelliği için en etkin parametrenin E_T^N olduğu belirlenmiştir. Aynı sıralama V_m için yapıldığında $\beta > \alpha$ (tablo 4.141), $E_T^N > \alpha$ (tablo 4.142), $\alpha > \pi^*$ (tablo 4.143), $E_T^N > \beta$ (tablo 4.144), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.145), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.146) olduğu görülmüş ve etanol varlığında V_m için $E_T^N > \beta > \alpha > \pi^*$ sıralamasına göre en etkili parametrenin E_T^N olduğu görülmüştür. Benzer sıralama ΔG^\ddagger için yapıldığında $\beta > \alpha$ (tablo 4.141), $E_T^N = \alpha$ (tablo 4.142), $\alpha > \pi^*$ (tablo 4.143), $\beta > E_T^N$ (tablo 4.144), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.145), $E_T^N > \pi^*$ (tablo 4.146) olduğu görülmüş ve $\beta > E_T^N = \alpha > \pi^*$ en etkin parametre olarak β parametresi belirlenmiştir. Aynı sıralama ΔG_{E-T}^\ddagger özelliği için incelendiğinde $\beta > \alpha$ (tablo 4.141), $E_T^N > \alpha$ (tablo 4.142), $\alpha > \pi^*$ (tablo 4.143), $\beta > E_T^N$ (tablo 4.144), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.145), $E_T^N > \pi^*$ (tablo 4.146) olduğu görülmüştür. Buna göre etanol varlığında ΔG_{E-T}^\ddagger için $\beta > E_T^N > \alpha > \pi^*$ sıralamasına göre en etkin parametrenin β parametresi olduğu belirlenmiştir.

Aynı sıralama n-propanol varlığında gerçekleştirilip enzimin k_{cat} özelliği üzerinde solvatokromik parametrelerin etkisi incelendiğinde $\beta > \alpha$ (tablo 4.141), $E_T^N > \alpha$ (tablo 4.142), $\alpha > \pi^*$ (tablo 4.143), $\beta > E_T^N$ (tablo 4.144), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.145), $E_T^N > \pi^*$ (tablo 4.146) olduğu görülmüştür. Buna göre n-propanol varlığında k_{cat} için en etkili solvatokromik parametrenin belirlenmesi için düzenleme yapıldığında; $\beta > E_T^N > \alpha > \pi^*$ sıralamasına göre n-propanol varlığında k_{cat} özelliği için en etkin parametrenin β olduğu belirlenmiştir. Aynı sıralama V_m için yapıldığında $\beta > \alpha$ (tablo 4.141), $E_T^N > \alpha$ (tablo 4.142), $\alpha > \pi^*$ (tablo 4.143), $E_T^N > \beta$ (tablo 4.144), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.145), $E_T^N > \pi^*$ (tablo 4.146) olduğu görülmüş ve n-propanol varlığında V_m için $E_T^N > \beta > \alpha > \pi^*$ sıralamasına göre en etkili parametrenin E_T^N olduğu görülmüştür. Benzer sıralama ΔG^\ddagger için yapıldığında $\beta > \alpha$ (tablo 4.141), $E_T^N > \alpha$ (tablo 4.142), $\alpha = \pi^*$ (tablo 4.143),

$\beta > E_T^N$ (tablo 4.144), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.145), $E_T^N > \pi^*$ (tablo 4.146) olduğu görülmüş ve $\beta > E_T^N > \alpha = \pi^*$ en etkin parametre olarak β parametresi belirlenmiştir. Aynı sıralama $\Delta G_{E-T}^\#$ özelliği için incelendiğinde $\beta > \alpha$ (tablo 4.141), $E_T^N > \alpha$ (tablo 4.142), $\alpha > \pi^*$ (tablo 4.143), $\beta > E_T^N$ (tablo 4.144), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.145), $E_T^N > \pi^*$ (tablo 4.146) olduğu görülmüştür. Buna göre n-propanol varlığında $\Delta G_{E-T}^\#$ için $\beta > E_T^N > \alpha > \pi^*$ sıralamasına göre en etkin parametrenin E_T^N parametresi olduğu belirlenmiştir.

Benzer sıralama i-propanol varlığında gerçekleştirilip enzimin k_{cat} özelliği üzerinde solvatokromik parametrelerin etkisi incelendiğinde $\beta > \alpha$ (tablo 4.141), $E_T^N > \alpha$ (tablo 4.142), $\pi^* > \alpha$ (tablo 4.143), $\beta > E_T^N$ (tablo 4.144), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.145), $E_T^N > \pi^*$ (tablo 4.146) olduğu görülmüştür. Buna göre i-propanol varlığında k_{cat} için en etkili solvatokromik parametrenin belirlenmesi için düzenleme yapıldığında; $\beta > E_T^N > \pi^* > \alpha$ sıralamasına göre i-propanol varlığında k_{cat} özelliği için en etkin parametrenin β olduğu belirlenmiştir. Aynı sıralama V_m için yapıldığında $\beta > \alpha$ (tablo 4.141), $E_T^N > \alpha$ (tablo 4.142), $\pi^* > \alpha$ (tablo 4.143), $\beta > E_T^N$ (tablo 4.144), $\pi^* > \beta$ (tablo 4.145), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.146) olduğu görülmüş ve i-propanol varlığında V_m için $\pi^* > \beta > E_T^N > \alpha$ sıralamasına göre en etkili parametrenin π^* olduğu görülmüştür. Benzer sıralama $\Delta G^\#$ için yapıldığında $\beta > \alpha$ (tablo 4.141), $E_T^N > \alpha$ (tablo 4.142), $\pi^* > \alpha$ (tablo 4.143), $\beta > E_T^N$ (tablo 4.144), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.145), $E_T^N > \pi^*$ (tablo 4.146) olduğu görülmüş ve $\beta > E_T^N > \pi^* > \alpha$ en etkin parametre olarak β parametresi belirlenmiştir. Aynı sıralama $\Delta G_{E-T}^\#$ özelliği için incelendiğinde $\beta = \alpha$ (tablo 4.141), $E_T^N > \alpha$ (tablo 4.142), $\pi^* > \alpha$ (tablo 4.143), $\beta > E_T^N$ (tablo 4.144), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.145), $E_T^N > \pi^*$ (tablo 4.146) olduğu görülmüştür. i-propanol varlığında $\Delta G_{E-T}^\#$ için $E_T^N > \alpha$ ile $\beta > E_T^N$ sıralaması $\beta = \alpha$ eşitliği ile uyum içinde bulunmamaktadır. Bu yüzden i-propanol varlığında $\Delta G_{E-T}^\#$ özelliği için $\beta > E_T^N > \pi^*$ sıralaması belirlenmiş ve buna göre en etkin parametrenin β parametresi olduğu görülmüştür.

Benzer sıralama aprotik çözücüler için de yapılmıştır. Ancak aprotik çözücülerde α değeri sıfır olduğundan sıralama β , E_T^N , π^* parametreleri arasında gerçekleştirilmiştir. Buna göre N,N-DMF varlığında k_{cat} özelliği için $\beta > E_T^N$ (tablo 4.147), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.149), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.151) sıralaması belirlenmiş ve $\beta > \pi^* > E_T^N$ olarak düzenlenerek N,N-DMF varlığında k_{cat} için en etkin solvatokromik parametrenin β olduğu belirlenmiştir. Aynı sıralama V_m için gerçekleştirildiğinde; $\beta > E_T^N$ (tablo 4.147), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.149), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.151) sıralaması belirlenmiş ve $\beta > E_T^N > \pi^*$ olarak düzenlenerek N,N-DMF varlığında V_m için en etkin solvatokromik parametrenin β olduğu belirlenmiştir. Benzer sıralama K_m için gerçekleştirildiğinde; $\beta > E_T^N$ (tablo 4.147), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.149), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.151) sıralaması belirlenmiş ve $\beta > \pi^* > E_T^N$ olarak düzenlenerek N,N-DMF varlığında tüm kinetik parametreler için en etkin solvatokromik parametrenin β olduğu belirlenmiştir. Aynı sıralama enzimin termodinamik parametreleri için gerçekleştirildiğinde; enzimin ΔG^\ddagger özelliği için $\beta > E_T^N$ (tablo 4.148), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.150), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.152) ve $\beta > \pi^* > E_T^N$ sıralaması, ΔG_{E-T}^\ddagger özelliği için $\beta > E_T^N$ (tablo 4.148), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.150), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.152) ve $\beta > \pi^* > E_T^N$ sıralaması, ΔG_{E-S} özelliği için $\beta > E_T^N$ (tablo 4.148), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.150), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.152) ve $\beta > \pi^* > E_T^N$ sıralaması belirlenmiş ve enzimin N,N-DMF varlığında termodinamik özellikleri için en etkin parametrenin β olduğu gözlenmiştir.

1,4-dioksan varlığında k_{cat} özelliği için $\beta > E_T^N$ (tablo 4.147), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.149), $E_T^N = \pi^*$ (tablo 4.151) sıralaması belirlenmiş ve $\beta > E_T^N = \pi^*$ olarak düzenlenmiş V_m için $\beta > E_T^N$ (tablo 4.147), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.149), $E_T^N > \pi^*$ (tablo 4.151) sıralaması belirlenmiş ve $\beta > E_T^N > \pi^*$ olarak düzenlenmiş, K_m için; $\beta > E_T^N$ (tablo 4.147), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.149), $E_T^N > \pi^*$ (tablo 4.151) sıralaması belirlenmiş ve $\beta > E_T^N > \pi^*$ olarak düzenlenerek 1,4-dioksan varlığında tüm kinetik parametreler için en etkin solvatokromik parametrenin β olduğu belirlenmiştir. Aynı sıralama enzimin termodinamik parametreleri için gerçekleştirildiğinde; enzimin ΔG^\ddagger özelliği için $\beta > E_T^N$ (tablo

4.148), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.150), $E_T^N > \pi^*$ (tablo 4.152) sıralaması, $\Delta G_{E-T}^\#$ özelliği için $\beta > E_T^N$ (tablo 4.148), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.150), $E_T^N > \pi^*$ (tablo 4.152) sıralaması, ΔG_{E-S} özelliği için $\beta > E_T^N$ (tablo 4.148), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.150), $E_T^N > \pi^*$ (tablo 4.152) sıralaması belirlenmiş ve $\beta > E_T^N > \pi^*$ olarak düzenlenerek 1,4-dioksan varlığında tüm termodinamik parametreler için en etkin solvatokromik parametrenin β olduğu belirlenmiştir.

DMSO varlığında aktivasyon gözlemlendiği konsantrasyonları varlığında k_{cat} özelliği için $\beta > E_T^N$ (tablo 4.147), $\pi^* > \beta$ (tablo 4.149), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.151) sıralaması belirlenmiş ve $\pi^* > \beta > E_T^N$ olarak düzenlenmiş V_m için $\beta > E_T^N$ (tablo 4.147), $\pi^* > \beta$ (tablo 4.149), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.151) sıralaması belirlenmiş ve $\pi^* > \beta > E_T^N$ olarak düzenlenmiş, K_m için; $\beta > E_T^N$ (tablo 4.147), $\pi^* > \beta$ (tablo 4.149), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.151) sıralaması belirlenmiş ve $\pi^* > \beta > E_T^N$ olarak düzenlenerek DMSO'nun aktivatör gibi davrandığı konsantrasyonlar varlığında tüm kinetik parametreler için en etkin solvatokromik parametrenin π^* olduğu belirlenmiştir. Aynı sıralama enzimin termodinamik parametreleri için gerçekleştirildiğinde; enzimin $\Delta G^\#$ özelliği için $\beta > E_T^N$ (tablo 4.148), $\pi^* = \beta$ (tablo 4.150), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.152) sıralaması, $\Delta G_{E-T}^\#$ özelliği için $\beta > E_T^N$ (tablo 4.148), $\pi^* > \beta$ (tablo 4.150), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.152) sıralaması, ΔG_{E-S} özelliği için $\beta > E_T^N$ (tablo 4.148), $\pi^* > \beta$ (tablo 4.150), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.152) sıralaması yapılmış ve $\pi^* > \beta > E_T^N$ olarak düzenlenerek DMSO'nun aktivatör gibi davrandığı konsantrasyonlar varlığında tüm kinetik parametreler için en etkin solvatokromik parametrenin π^* olduğu belirlenmiştir.

DMSO'nun inhibisyon gözlemlendiği konsantrasyonları varlığında k_{cat} özelliği için $\beta > E_T^N$ (tablo 4.147), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.149), $E_T^N > \pi^*$ (tablo 4.151) sıralaması yapılmış ve $\beta > E_T^N > \pi^*$ olarak düzenlenmiş k_{cat} özelliği için en etkili parametre β olarak belirlenmiş, V_m için $\beta > E_T^N$ (tablo 4.147), $\pi^* > \beta$ (tablo 4.149), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.151) sıralaması yapılmış ve $\pi^* > \beta > E_T^N$ olarak düzenlenmiş bu özellik için en etkin

parametre π^* olarak belirlenmiş, K_m için; $E_T^N > \beta$ (tablo 4.147), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.149), $E_T^N > \pi^*$ (tablo 4.151) sıralaması belirlenmiş ve $E_T^N > \beta > \pi^*$ olarak düzenlenerek DMSO'nun inhibitör gibi davrandığı konsantrasyonlar varlığında K_m özelliği için en etkin solvatokromik parametrenin E_T^N olduğu belirlenmiştir. Aynı sıralama enzimin termodinamik parametreleri için gerçekleştirildiğinde; enzimin ΔG^\ddagger özelliği için $\beta > E_T^N$ (tablo 4.148), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.150), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.152) ve $\beta > \pi^* > E_T^N$ sıralaması, ΔG_{E-T}^\ddagger özelliği için $\beta > E_T^N$ (tablo 4.148), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.150), $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.152) ve $\pi^* > \beta > E_T^N$ sıralaması, ΔG_{E-S} özelliği için $\beta > E_T^N$ (tablo 4.148), $\beta > \pi^*$ (tablo 4.150), $E_T^N > \pi^*$ (tablo 4.152) ve $\beta > E_T^N > \pi^*$ sıralaması yapılmıştır.

Benzer sıralama asetonitril varlığında gerçekleştirilip enzimin k_{cat} özelliği üzerinde solvatokromik parametrelerin etkisi incelendiğinde $\beta > \alpha$, $E_T^N > \alpha$, $\pi^* > \alpha$, $\beta > E_T^N$, $\pi^* > \beta$, $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.153) olduğu görülmüş ve $\pi^* > \beta > E_T^N > \alpha$ sıralamasına göre asetonitril varlığında k_{cat} özelliği için en etkin parametrenin π^* olduğu belirlenmiştir. Aynı sıralama V_m için yapıldığında $\beta > \alpha$, $E_T^N > \alpha$, $\pi^* > \alpha$, $\beta > E_T^N$, $\pi^* > \beta$, $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.153) olduğu görülmüş ve $\pi^* > \beta > E_T^N > \alpha$ sıralamasına göre asetonitril varlığında V_m özelliği için en etkin parametrenin π^* olduğu belirlenmiştir. Benzer sıralama ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger için yapıldığında $\beta > \alpha$, $E_T^N > \alpha$, $\pi^* > \alpha$, $\beta > E_T^N$, $\pi^* > \beta$, $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.154) olduğu görülmüş ve $\pi^* > \beta > E_T^N > \alpha$ sıralamasına göre asetonitril varlığında termodinamik özellikler için en etkin parametrenin π^* olduğu belirlenmiştir. Aynı sıralama ΔG_{E-S} için yapıldığında $\beta > \alpha$, $\alpha > \pi^*$, $E_T^N > \alpha$, $\pi^* > \beta$, $\beta > E_T^N$, $\pi^* > E_T^N$ (tablo 4.154) olduğu görülmüştür. Sıralamada $\pi^* > E_T^N$, $\alpha > \pi^*$, $\pi^* > E_T^N$ sıralaması birbiri ile uyu göstermemektedir. Bu yüzden bu çözücü varlığında enzimin ΔG_{E-S} değeri için $\beta > E_T^N > \alpha$ sıralaması yapılmıştır.

Organik çözücülerin alkalin proteaz üzerindeki solvatokromik parametrelerinin etkinlik sırası Tablo 4.152'de özetlenmiştir.

Tablo 4. 152: Organik çözücülerin alkale proteaz üzerindeki solvatokromik parametrelerinin etkinlik sırası

Çözücü	Solvatokromik parametrelerde etkinlik sırası				
	k_{cat}	V_m	$\Delta G^\#$	$\Delta G_{E-T}^\#$	ΔG_{E-S}
Metanol	$\beta > \pi^* > E_T^N > \alpha$	$\beta > \pi^* > E_T^N > \alpha$	$\beta > \pi^* > E_T^N > \alpha$	$\beta > \pi^* > E_T^N > \alpha$	-
Etanol	$E_T^N > \beta > \alpha > \pi^*$	$E_T^N > \beta > \alpha > \pi^*$	$\beta > E_T^N = \alpha > \pi^*$	$\beta > E_T^N > \alpha > \pi^*$	-
n-propanol	$\beta > E_T^N > \alpha > \pi^*$	$E_T^N > \beta > \alpha > \pi^*$	$\beta > E_T^N > \alpha = \pi^*$	$\beta > E_T^N > \alpha > \pi^*$	-
i-propanol	$\beta > E_T^N > \pi^* > \alpha$	$\pi^* > \beta > E_T^N > \alpha$	$\beta > E_T^N > \pi^* > \alpha$	$\beta > E_T^N > \pi^*$ ¹	-
1,4-Dioksan	$\beta > E_T^N = \pi^*$	$\beta > E_T^N > \pi^*$	$\beta > E_T^N > \pi^*$	$\beta > E_T^N > \pi^*$	$\beta > E_T^N > \pi^*$
N,N-DMF	$\beta > \pi^* > E_T^N$	$\beta > \pi^* > E_T^N$	$\beta > \pi^* > E_T^N$	$\beta > \pi^* > E_T^N$	$\beta > \pi^* > E_T^N$
Asetonitril	$\pi^* > \beta > E_T^N > \alpha$	$\pi^* > \beta > E_T^N > \alpha$	$\pi^* > \beta > E_T^N > \alpha$	$\pi^* > \beta > E_T^N > \alpha$	$\beta > E_T^N > \alpha$ ²
DMSO(inhibisyon)	$\beta > E_T^N > \pi^*$	$\pi^* > \beta > E_T^N$	$\beta > \pi^* > E_T^N$	$\beta > \pi^* > E_T^N$	$\beta > E_T^N > \pi^*$
DMSO(aktivasyon)	$\pi^* > \beta > E_T^N$	$\pi^* > \beta > E_T^N$	$\pi^* = \beta > E_T^N$	$\pi^* > \beta > E_T^N$	$\pi^* > \beta > E_T^N$

¹ Bakınız sayfa 288

² Bakınız sayfa 291

Tablo 4.152'nin incelemesinden monoalkollerin enzimimizin kinetik ve termodinamik değerleri üzerinde en etkin solvatokromik parametrelerin sırasıyla β ve E_T^N olduğu görülmüştür. β çözücünün protein molekülleriyle (enzim ya da substrat) hidrojen bağı oluşturmada proton kabul edebilme yeteneğinin ölçüsüdür. E_T^N ise çözücünün polaritesi ile ilgili olup protein moleküllerini üzerindeki polar gruplar üzerinden çözebilme yeteneğidir. Monoalkoller enzim-substrat kompleksinin tranzisyon hali üzerindeki polar gruplarla hidrojen bağı oluşturarak kompleksin destabilizasyonuna neden olmaktadır.

Aktivatör etki gösteren çözücülerin (1,4-dioksan, N,N'-DMF, asetonitril, DMSO) kinetik ve termodinamik değerleri üzerinde en etkin solvatokromik parametrelerin sırasıyla β ve π^* olduğu görülmüştür. π^* organik çözücünün polarize olabilme yeteneğidir. Aktivatör etki yapan çözücüler asetonitril dışında aprotik çözücülerdir. Dolayısıyla protein molekülleriyle hidrojen bağı oluşturmada proton verebilme yetenekleri yoktur. Aktivatör çözücülerin protein molekülleri ile oluşturdukları hidrojen bağları monoalkollerin aksine enzim-substrat kompleksi tranzisyon hali üzerinde stabilizasyona ve dolayısıyla katalitik aktivitenin artmasına yol açmıştır.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Tez çalışmamızda su ile karışabilen organik çözücüler olan –monoalkoller- metanol, etanol, n-propanol, i-propanol –aprotik çözücüler- N,N'-DMF, 1,4-dioksan, DMSO ve asetonitrilin *Bacillus clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının kinetik ve termodinamik özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında kullanılan organik çözücülerin artan konsantrasyonlarının çalışma pH'sı olan pH 10.5 değerini değiştirip değiştirmediğine bakılmış ve çalışılan organik çözücü konsantrasyonlarının çalışma pH'sını etkilemedikleri belirlenmiştir.

Organik çözücü yokluğunda başlangıç hızı koşullarında enzimin K_m değeri 1.67 ± 0.054 (mg/mL kazein), k_{cat} değeri 84.64 (dak^{-1}) olarak belirlenmiştir. Sonraki adımda enzim çözeltisi artan organik çözücü konsantrasyonu varlığında ve daha sonra 6 kat seyreltilmiş durumda 30°C 'de 120 dakika uğratılmış inkübasyon sonunda enzim üzerinde yarattıkları inhibisyon etkisi incelenmiştir. İnceleme sonucu monoalkoller varlığında 6 kat seyreltme yapıldıktan sonra aktivitenin geri kazanılmasından dolayı enzim üzerinde tersinir inhibisyon etkisi oluşturduğu belirlenmiştir. Organik çözücülerin çalışılan üst sınır konsantrasyonları substrat olan kazeini çözebilme konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Metanol varlığında kazein en fazla % 30 metanol konsantrasyonunda çözünebildiği için metanol için çalışma üst sınır konsantrasyonu % 30, etanol için % 50, n-propanol için % 30 ve i-propanol için % 35 olarak belirlenmiştir. Monoalkoller varlığında başlangıç hızı koşullarında enzimin K_m ve V_m değerleri ve organik çözücülerin enzim üzerinde yarattıkları tersinir inhibisyon etkileri belirlenmiştir. Buna göre monoalkoller varlığında enzim çözeltisinin K_m değeri değişmemiş V_m değeri ise artan organik çözücü konsantrasyonu ile azalmıştır. Lineweaver-Burk diyagramından inhibisyon tipinin non-kompetitif inhibisyon olduğu belirlenmiş, bu diyagramdan elde edilen intersept

ve eğimlerden yararlanılarak ikincil çizimlere gidilmiştir. İkincil çizimlerin lineer doğrular vermesi ile etanol, n-propanol ve i-propanol varlığında gerçek non-kompetitif inhibisyon etkisi belirlenirken, metanol varlığında ikincil çizimlerin hiperboller oluşturması ile üçüncül çizimlere gidilmiş ve metanolün kısmi non-kompetitif inhibisyon etkisi yaptığı görülmüştür.

Çalışılan tüm monoalkol konsantrasyonlarında enzimin kinetik (k_{cat} , K_m , k_{cat}/K_m) ve termodinamik (ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger , ΔG_{E-S}) değerleri hesaplanmıştır. Çalışılan monoalkollerin artan konsantrasyonlarında enzimin k_{cat} , k_{cat}/K_m parametrelerinin azaldığı ve K_m değerinin değişmediği gözlenmiştir. Termodinamik değerlerden ΔG_{E-S} değeri artan monoalkol konsantrasyonundan etkilenmemiş, ΔG^\ddagger , ΔG_{E-T}^\ddagger değerleri ise artan monoalkol konsantrasyonu ile doğrusal ilişkili olarak artmıştır. Organik çözücü varlığında ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger değerlerinin artması organik çözücülerin geçiş hali destabilizasyonu ile enzimatik katalizi yavaşlattığını ΔG_{E-S} parametresinin monoalkol konsantrasyonundan etkilenmemesi monoalkollerin enzim-substrat etkileşmesini etkilemediğinin termodinamik göstergesidir.

Çalışılan monoalkol konsantrasyonlarında, organik çözücüler için makroskobik fizikokimyasal özellik olan dielektrik sabiti ve organik çözücü hidrofobisitesi hakkında bilgi veren log P parametreleri hesaplanmış ve çalışılan monoalkol konsantrasyonları ile ilişkili log P değerleri ile enzimin kinetik ve termodinamik değerleri arasında lineer ilişkiler gözlenmiştir.

Monoalkollerin mikroskobik özellik olarak tanımlanan solvatokromik parametrelerinin de enzimin kinetik ve termodinamik özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışılan monoalkol konsantrasyonları ile ilişkili solvatokromik parametreler olan α , β , π^* ve E_T^N parametreleri hesaplanmış ve çoklu lineer regresyon denklemleri ile hangi solvatokromik parametrenin enzimin kinetik ve termodinamik özellikleri üzerinde daha fazla etkisi olduğu belirlenmiştir. Buna göre monoalkollerin enzimimizin kinetik ve termodinamik değerleri üzerinde en etkin solvatokromik parametrelerin sırasıyla β ve E_T^N olduğu görülmüştür.

Aprotik çözücüler varlığında ise N,N'-DMF ve 1,4-dioksanın artan konsantrasyonları varlığında enzimin aktivasyona uğradığı gözlenmiştir. N,N'-DMF varlığında %60 konsantrasyona 1,4-dioksan varlığında ise en fazla %40 konsantrasyona kadar çıkılmıştır. DMSO varlığında ise %50 konsantrasyona kadar çıkılmış %20 konsantrasyona kadar enzim üzerinde aktivasyon etkisi, daha yüksek konsantrasyonlarda ise enzim üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği gözlenmiştir. N,N'-DMF, 1,4-dioksan ve DMSO'nun %20 konsantrasyonuna kadar enzim üzerinde aktivasyon etkisi gözleendiğinden bu çözücüler varlığında aktivasyon kinetiği çalışılmıştır. Çalışılan aprotik çözücü konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk diyagramları ve bu diyagramlardan elde edilen veriler yardımı ile çizilen ikincil ve üçüncül grafiklerden bu çözücülerin enzim üzerinde zorunlu olmayan (non-essential) aktivatör etkisi oluşturduğu gözlenmiştir. Aktivasyonun gözleendiği aprotik çözücülerin çalışılan konsantrasyonlarında enzimin kinetik parametreleri olan k_{cat} ve k_{cat}/K_m doğrusal olarak artmış K_m değeri ise doğrusal olarak azalmıştır. K_m değerinin artan aprotik çözücü konsantrasyonları ile azalması bu çözücülerin enzimin substrata olan afinitesini arttırdığını k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin artması ise bu çözücüler varlığında enzimin katalitik performansını arttırdığını göstermektedir. Enzimin termodinamik değerleri de artan aprotik çözücü konsantrasyonlarında lineer olarak azalmıştır. Bu durum aprotik çözücülerin geçiş hali stabilizasyonu ile enzimatik katalizi hızlandırdığını göstermektedir.

Aprotik çözücülerin çalışılan konsantrasyonlar ile ilişkili log P ve dielektrik sabiti değerleri de hesaplanmış ve bu değerler ile enzimin kinetik ve termodinamik değerleri arasında lineer ilişkiler belirlenmiştir.

Aktivatör etki gösteren aprotik çözücülerin çalışılan konsantrasyonlardaki solvatokromik parametrelerinin enzimin kinetik ve termodinamik özellikleri üzerine etkileri incelendiğinde en etkin solvatokromik parametrelerin sırasıyla β ve π^* olduğu görülmüştür .

DMSO'nun % 20 konsantrasyonu üzerinde enzim üzerinde inhibitör etki oluşturmasından dolayı % 30–45 konsantrasyonları arasında inhibisyon kinetiği çalışılmış ve DMSO'nun enzim üzerinde gerçek un-kompetitif tipi inhibisyon

oluşturduğu görülmüştür. DMSO'nun inhibisyon etki gösterdiği konsantrasyonlar ile enzimin kinetik ve termodinamik değerleri arasında da lineer ilişkiler gözlenmiştir. Artan DMSO konsantrasyonu ile enzimin k_{cat} , K_m , k_{cat}/K_m değerleri azalmıştır. k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin azalması bu çözücü varlığında enzimin katalitik performansının azaldığını göstermektedir. Artan DMSO konsantrasyonu ile ΔG^\ddagger ve ΔG_{E-T}^\ddagger değerlerinin artması ise enzimatik katalizin bu konsantrasyonlarda azaldığının termodinamik göstergesidir.

DMSO'nun inhibitör etki gösterdiği konsantrasyonlar ile ilişkili log P ve dielektrik sabitleri değerleri hesaplanmış ve bu değerler ile enzimin kinetik ve termodinamik değerleri arasında lineer ilişkiler gözlenmiştir.

Asetonitril aprotik çözücü olmadığından ve asetonitril varlığında aktivasyon gözlemlendiğinden bu çözücü ayrı değerlendirilmiştir. Asetonitril varlığında çalışılan üst sınır konsantrasyonu % 60 olarak belirlenmiş ve % 30 asetonitril konsantrasyonuna kadar enzim bu çözücüden etkilenmemiştir. Ancak % 30 konsantrasyon üzerinde enzim üzerinde aktivasyon etkisi gözlenmiştir. Asetonitrilin artan konsantrasyonları varlığında Lineweaver-Burk diyagramı çizildiğinde elde edilen grafik zorunlu olmayan aktivasyon modeline uygun olmakla birlikte ikincil ve üçüncül çizimlere gidildiğinde modele uygun grafikler elde edilememiş ve zorunlu olmayan aktivasyon kinetiği modeline oturtulamamıştır. Ancak asetonitrilin artan konsantrasyonlarına karşı enzimin kinetik değerleri işaretlendiğinde lineer olarak artan doğrular elde edilmesi katalitik performansın arttığını, termodinamik parametrelerin ise doğrusal olarak azalması asetonitril varlığında katalizin hızlandığını göstermektedir.

Asetonitrilin artan konsantrasyonlar ile ilişkili log P ve dielektrik sabitleri değerleri hesaplanmış ve bu değerler ile enzimin kinetik ve termodinamik değerleri arasında lineer ilişkiler gözlenmiştir. Asetonitrilin çalışılan konsantrasyonlardaki solvatokromik parametreleri hesaplanmış ve kinetik ve termodinamik özellikler için en etkin parametrenin π^* olduğu belirlenmiştir.

5.2 Öneriler

Tez çalışmamızda kullanılan alkalen proteaz enziminin su ile karışabilen organik çözücü ortamında ciddi aktivite kaybına uğramadığı görülmüştür. İleride yapılacak potansiyel çalışmalar aşağıda özetlenmiştir:

- Kazein ya da farklı substratlar varlığında su ile karışmayan organik çözücülerin enzimin kinetik ve termodinamik özelliklerine etkisi
- Su ile karışabilen ya da karışamayan çözücüler varlığında alkalen proteazın biyosentetik kataliz (peptid sentezi gibi) gücünün incelenmesi
- Enzimin pH'ya bağımlı kinetiğinin detaylı çalışılması
- Organik çözücü ortamında enzimin termal kararlılığının incelenmesi
- Enzim yüzeyindeki yük yoğunluğunu değiştirecek bazı kimyasal modifikasyonlarla kararlılığın geliştirilmesi

KAYNAKLAR

- [1] Nelson, D.L., Cox, M.M., 'Lehninger Principles of Biochemistry', Fourth edition, **Worth Publishers**, New York 191-193, (2004).
- [2] Fox, J.W., Shannon, J. D., Bjarson J.B., 'Proteinase and Their Inhibitors in Biotechnology', **American Chemical Society**, **460**, 62-79, (1991).
- [3] Uhling, H., 'Industrial Enzymes and Their Applications', **John Wiley and Sons**, 1-13, England (1998).
- [4] Walsh, G., 'Proteins Biochemistry and Biotechnology', **John Wiley and Sons**, 421-436, England (2002).
- [5] Kumar, C.G., Takagi, H., 'Microbial Alkaline Proteases: From a Bioindustrial Viewpoint', **Biotechnology Advances**, **17**, 561-594, (1999).
- [6] Anwar, A., Saleemuddin, M., 'Alkaline Proteases: A Review', **Bioresource Technology**, **64**, 175-183, (1998).
- [7] Zhang, X., Wang X., Chen, S., Fu, X., Wu, X., Li, C., 'Protease-Catalyzed Small Peptide Synthesis in Organic Media', **Enzyme and Microbial Technology**, **19**, 538-544, (1996).
- [8] Voet, D., Voet, J.G., Pratt C., 'Fundamentals of Biochemistry', **John Wiley and Sons**, 307 USA, (1999).
- [9] Kazan, D., Denizci, A.A., Öner, M.N.K., Erarslan, A., 'Purification and Characterization of Serine Alkaline Protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42', **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, **32**, 335-344, (2005).
- [10] Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., 'Molecular and Biotechnical Aspects of Microbial Proteases', **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **62**, 597-695, (1998).
- [11] Gupta, R., Beg, Q. K., Lorenz, P., 'Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Applications', **Applied Microbiology and Biotechnology**, **59**, 15-32, (2002).
- [12] Denizci, A.A, Kazan, D., Abeln, E.C.A., Erarslan, A., 'Newly Isolated *Bacillus Clausii* GMBAE 42: An Alkaline Protease Producer Capable Grow

Under Highly Alkaline Conditions', *Journal of Applied Microbiology*, **96**, 320-327, (2004).

[13] 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).

[14] Maurer, K.-H., 'Detergent Proteases', *Current Opinion in Biotechnology*, **15**, 330-334, (2004).

[15] Banik, R.M., Prakash, M., 'Laundry Detergent Combatibility of the Alkaline Protease from *Bacillus cereus*', *Microbiological Research*, **159**, 135-140, (2004)

[16] Saeki, K., Ozaki, K., Kobayashi, T., Ito, S., 'Detergent Alkaline Proteases: Enzymatic Properties, Genes, and Crystal Structures', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **103**, 501-508, (2007).

[17] Kumar, C.G., Malik, R.K., Tiwari, M.P., 'Novel Enzyme-Based Detergents: An Indian Perspective', *Indian Academy of Science*, (1998)

[18] Takami, H., Horikoshi, K., 'Analysis of the Genome of An Alkaliphilic *Bacillus* Strain from An Industrial Point of View' *Extremophiles*, **4**, 99-108, (2000).

[19] Amory, A., Andre, C., Janda-K.G., 'Uses of Alkaline Proteases in Industrial Textile Laundering Processes', *U.S. Patents*, Patent Number, 6,165,960, Date of Patent, Dec.26, (2000).

[20] Niehaus, F., Bertolodo, C., Kahler, M., Antranikian, G., 'Extremophiles As a Source of Novel Enzymes for Industrial Application' *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51**, 711-729, (1999).

[21] 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).

[22] Jasvir, S., Navdeep, G., Dvasahayam, G., Sahoo, D.K., 'Studies on Alkaline Protease Produced by *Bacillus* sp. NG312', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **76**, 57-63, (1999).

[23] Kaur, S., Vohra, R.M., Kapoor, M., Beg, Q.K., Hoodal, G.S., 'Enhanced Production and Characterization of an Highly Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus* sp. P-2', *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **17**, 125-129, (2001).

[24] Kobayashi T., Hakamada, Y., Hitomo, 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).

[25] Gupta, A., Roy, I., Patel, R.K., Singh, S.P., Khare, S. K., Gupta, M.N., ‘One Step Purification and Characterization of an Alkaline Protease from Haloalkaliphilic *Bacillus* sp.’, *Journal of Chromatography*, **1075**, 103-108, (2005).

[26] *Papain*–*Wikipedia, the free encyclopedia* [online], <http://en.wikipedia.org/wiki/Papain#Structure>, (**Ziyaret tarihi:5 Kasım 2007**).

[27] *Papain*–*Mercuripapain* [online], <http://www.worthington-biochem.com/pap/default.html>, (**Ziyaret tarihi: 5 Kasım 2007**).

[28] *Papatya Ektresi* [online], <http://www.bitkisel-tedavi.com/papaya.htm>, (**Ziyaret tarihi: 5 Kasım 2007**).

[29] *Bromelain* [online], <http://www.solgar.com.tr/Literatur.asp?KK=350>, (**Ziyaret tarihi: 5 Kasım 2007**).

[30] *Bromelain* – *Wikipedia the free encyclopedia* [online], <http://en.wikipedia.org/wiki/Bromelain>, (**Ziyaret tarihi: 5 Kasım 2007**).

[31] *Bromelain* –*Ananas* [online], <http://www.bitkisel-tedavi.com/bromelain.htm>, (**Ziyaret tarihi: 5 Kasım 2007**).

[32] *Tyripsin and chmotrypsin* By *Jennifer McDowall* [online], http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2003_5/Page1.htm, (**Ziyaret tarihi: 6 Kasım 2007**).

[33] *Tyripsin* *The Columbia Encyclopedia, Sixth Edition.2001-05* [online], <http://www.bartleby.com/65/tr/trypsin.html>, (**Ziyaret tarihi: 6 Kasım 2007**).

[34] *Tyripsin* - *Wikipedia the free encyclopedia* [online], <http://en.wikipedia.org/wiki/Trypsin>, (**Ziyaret tarihi: 6 Kasım 2007**).

[35] Shamaladevi, N., Pattabhi, V., ‘Secondary Binding Site of Trypsin: Revealed by Crystal Structure of Trypsin-Peptide Complex’, *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, vol.22, issue number 6, pp. 635-642, (2005).

[36] *Chymotrypsin* [online], <http://www.worthington-biochem.com/CHY/default.html>, (**Ziyaret tarihi: 7 Kasım 2007**).

[37] *The Serine Proteases*, [online], <http://images.google.com.tr/imgres?imgurl=http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY252/All-3.jpg&imgrefurl=http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY252/Peptidase3.html&h=600&w=523&sz=150&hl=tr&start=38&um=1&tbnid=i7sJNy-9Kd2F7M:&tbnh=135&tbnw=118&prev=/images%3Fq%3Dchymotrypsin%26start%3D36%26ndsp%3D18%26svnum%3D10%26um%3D1%26hl%3Dtr%26sa%3DN>, (**Ziyaret tarihi: 7 Kasım 2007**).

- [38] *Chymotrypsin - Wikipedia the free encyclopedia* [online], <http://en.wikipedia.org/wiki/Chymotrypsin>, (**Ziyaret tarihi: 7 Kasım 2007**).
- [39] *Pepsin - Wikipedia the free encyclopedia* [online], <http://en.wikipedia.org/wiki/Pepsin>, (**Ziyaret tarihi: 7 Kasım 2007**).
- [40] *Pepsin Product Information* [online], <http://www.worthington-biochem.com/PM/cat.html>, (**Ziyaret tarihi: 7 Kasım 2007**).
- [41] *Aspartate Proteases I* [online], http://images.google.com.tr/imgres?imgurl=http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/1qrp-3pep.jpg&imgrefurl=http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Peptidase13.html&h=386&w=594&sz=78&hl=tr&start=47&um=1&tbnid=wSC5T_WWOeG1GM:&tbnh=88&tbnw=135&prev=/images%3Fq%3Dpepsin%26start%3D36%26ndsp%3D18%26svnum%3D10%26um%3D1%26hl%3Dtr%26sa%3DN, (**Ziyaret tarihi: 7 Kasım 2007**).
- [42] *TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi* [online], http://www.biltek.tubitak.gov.tr/merak_ettikleriniz/index.php?kategori_id=2&soru_id=3388, (**Ziyaret tarihi: 7 Kasım 2007**).
- [43] *Chymosin - Wikipedia the free encyclopedia* [online], <http://en.wikipedia.org/wiki/Rennin>, (**Ziyaret tarihi: 7 Kasım 2007**).
- [44] *Fungal Technologies* [online], <http://www.personal.psu.edu/mab568/EnzymeV2.htm>, (**Ziyaret tarihi: 7 Kasım 2007**).
- [45] Babe, L.M., Craik, C.S., ‘Viral Proteases: Evolution of Diverse Structural Motifs to Optimize Function’, *Cell*, vol.91, pp. 427-430, (1997).
- [46] Perona, J., Craik, C.S., ‘Structural Basis of Substrate Specificity in the Serine Proteases’, *Protein Science*, vol. 4, pp. 337-360, (1995).
- [47] Hedstrom, L., ‘Serin Protease Mechanisim and Specificity’, *Chem. Rev.*, vol. 102, pp. 4501-4523, (2002).
- [48] *Serine Protease* [online], <http://www.answers.com/topic/serine-protease?cat=technology>, (**Ziyaret tarihi: 8 Kasım 2007**).
- [49] Czapinska, H., Otlewski, J., ‘Structural and energetic determinants of the S1-site specificity in serine proteases’ *European Journal of Biochemistry* **260**, 571-595 (FEBS 1999).
- [50] Malikova, L.A., Mardonova, A.M., Sokolova, O.V., Balaban, N.P., ‘Conditions of the Biosynthesis of an Extracellular Subtilisin – Like Proteinase by *Bacillus pumilis*’, *Microbiology*, **76**, 273–279, (2007).

[51] Siezen, R.J., Leunissen, J.A.M., 'Subtilases: The Superfamily of Subtilisin – Like Serine Protease', *Protein Science*, **6**, 501 - 523, (1997).

[52] *Aspartyl Proteases, Role and Function of Aspartyl Proteases*, [online], <http://www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/AspProtease/FUNCTION.HTML>, (Ziyaret tarihi: 9 Kasım 2007).

[53] Dash, C., Kulkarni, A., Dunn B., Rao, M., 'Aspartic Peptidase Inhibitors: Implications in Drug Development' *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **38(2)**, 89–119 (2003).

[54] Brik, A., Wong, C-H., 'HIV-1 Protease: Mechanisim and Drug Discovery', *Organic and Biomolecular Chemistry*, **1**, 5-14, (2003).

[55] Dubey, V.K., Pande, M., Singh, M.P., Jagannadham, M.V., 'Papain Like Proteases: Application of Their Inhibitors', *African Journal of Biotechnology*, **6 (9)**, 1077-1086 (2007).

[56] Ghosh, R., Dattagupta, J.K., Biswas, S., 'A thermostable cysteine protease precursor from a tropical plant contains an unusual C-Terminal Propeptide: cDNA Cloning, Sequence Comparision and Molecular Modeling Studies', *Biochemical and Biophysical Research Communications* **362**, 965–970, (2007).

[57] *The Cysteine Proteases – II* [online], <http://images.google.com.tr/imgres?imgurl=http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Papain6.gif&imgrefurl=http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Peptidase10.html&h=546&w=698&sz=16&hl=tr&start=3&tbnid=IdnmOK1fAdRqaM:&tbnh=109&tbnw=139&prev=/images%3Fq%3Dcysteine%2Bproteases%2B%26gbv%3D2%26svnum%3D10%26hl%3Dtr%26sa%3DG>, (Ziyaret tarihi: 11 Kasım 2007).

[58] Hase, C.C., Finkelstein, R.A., 'Bacterial Extracellular Zinc-Containing Metalloproteases', *Microbiological Reviews*, **57**, 823-837, (1993).

[59] Lipscomb, W.N., Stra'ter, N., 'Recent Advances in Zinc Enzymology', *Chemistry Reviews*. **96**, 2375-2433, (1996).

[60] Saghatelian, A., Jessani, N., Joseph, A., Humphrey, M., Cravatt B. F., 'Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases', *Proceeding of the National Acedemy of Science (PNAS)*, **101**, no. 27, 10000-10005, (2004).

[61] Raksakulthai; R., Hard, N.F., 'Exopeptidases and Their Application to Reduce Bitterness in Food: A Review', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **43 (4)**, 401-445, (2003).

[62] Rawlings, N.D., Baret, A.J., 'Evolutionary Families of Peptidases', *Biochemical Journal* **290**, 205-218, (1993).

- [63] Najafi, M.F., Deobagkar, D., Deobagkar, D., 'Potential Application of Protease Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100', *Electronic Journal of Biotechnology*, **8** (2), 197-203, (2005).
- [64] 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*, **18**, 309-315, (2002).
- [65] Thanikaivelan, P., Rao, J.R., Nair, U.B., Ramasami, T., 'Progress and Recent Trends in Biotechnological Methods for Leather Processing', *Trends in Biotechnology* **22**, no. 4 181 – 188 (2004).
- [66] Wang, H.Y., Liu, D.M., Liu, Y., Cheng, C.F., Ma, Q.Y., Huang, Q., Zhang, Y.Z., 'Screening and Mutagenesis of a Novel *Bacillus pumilus* Strain Producing Alkaline Protease for Dehairing', *Letters in Applied Microbiology* **44**, 1–6, (2007).
- [67] Klibanov, A., 'Improving Enzymes by Using Them in Organic Solvents', *Nature*, **409**, 241-246, (2001).
- [68] Bacheva, A.V., Filippova, I., Lysogorskaya, E.N., Oksenoit, E.S., 'Stability and Catalytic Properties of Subtilisin in Acetonitril/Dimethylformamid Mixtures with Low Water Content', *Journal of Molecular Catalysis B*: **11**, 89-96, (2000).
- [69] Sears, P., Witte, K., Wong, C.H., 'The Effect of Counterion, Water Concentration and Stirring on Stability of Subtilisin BPN' in Organic Solvents', *Journal of Molecular Catalysis B* **6**, 297-304, (1999).
- [70] Dordick, J.S., 'Enzymatic Catalysis in Monophasic Organic Solvents', *Enzyme and Microbiology Technology*, **11**, 194-211, (1989).
- [71] Bacheva, A.V., Baibak, O.V., Belyaeva, A.V., Oksenoit, E.S., Velichko, T.I., Lysogorskaya, E.N., Gladilin, A.K., Lozinsky, V.I., Filippova, I., 'Activity and Stability of Native Subtilisins in Various Media', *Biochemistry (Moscow)*, **68**, 1261-1266, (2003).
- [72] Klibanov, A., 'Why are Enzymes Less Active in Organic Solvents Than in Water?', *Focus*, **15**, 97-101, (1997).
- [73] Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C., 'Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents', *Biotechnology and Bioengineering*, **30**, 81-87, (1986).
- [74] Maurel, P., 'Relevance of Dielectric Constant and Solvent Hydrophobicity to the Organic Solvent Effect in Enzymology', *The Journal of Biological Chemistry*, **253**, 1677-1683, (1978).
- [75] Park, H., Chi, Y.M., 'The Enhancement of Electrostriction Caused by Lowering the Solvent Dielectric Constant Leads to the Decrease of Activation Energy in Trypsin Catalysis', *Biochimica et Biophysica Acta*, **1568**, 53-59, (2001).

- [76] Reichhardt, C., 'Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators', *Chemistry Reviews*, **94**, 2319-2358, (1994).
- [77] Kamlet, M.J., Abboud, J., Abraham, M.H., Taft, R.W., 'Linear Solvation Energy Relationships. 23. A. Comprehensive Collection of Solvatochromic Parameters π^* , α and β and Some Methods for Simplifying the Generalized Solvatochromic Equation', *Journal of Organic Chemistry*, **48**, 2877-2887, (1983).
- [78] Johnson, B.P., Gabrielsen, B., Matulenko, M., Dorsey, J.G., 'Solvatochromic Solvent Polarity Measurement in Analytical Chemistry: Synthesis and Applications of ET-30', *Analytical Letters*, vol. 19, pp: 939-962, (1986).
- [79] Yangjeh, A.H., 'A Model for Correlation Various Solvatochromic Parameters with Composition in Aqueous and Organic Binary Solvent Systems', *Bulletin of the Korean Chemical Societ.*, **25**, 1165-1170, (2004).
- [80] Bornscheuer U.T., Kazlauskas, R.J., 'Hydrolases in Organic Synthesis Regio- and Stereoselective Biotransformations', 2nd edition, pp:186-187 *Wiley-VCH*, [online], <http://books.google.com/books>, (ziyaret tarihi: 22 Kasım 2007).
- [81] Stepanov, V.M., 'Proteinases as Catalysts in Peptide Synthesis', *Pure & Applied Chemistry*, **68**, no 6, 1335-1339, (1996).
- [82] Wayne, S.I., Fruton, J.S., 'Thermolysin-Catalyzed Peptide Bond Synthesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **80**, 3241-3244, (1983).
- [83] Kidd, R.D., Sears, P., Huang, D. H., Witte, K., Wong, C.H., Farber, G.K., 'Breaking the Low Barrier Hydrogen Bond in a Serine Protease', *Protein Science*, **8**, 410-417, (1999).
- [84] Hou, R.Z., Zhang, N., Huang, Y.B., Wang, H., Xiao, Y.P., Liu, T.J., Yang, Y., Zhao, L., Zhang, X.Z., 'Synthesis of tripeptide RGD Amide by a Combination of Chemical and Enzymatic Methods', *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **37**, 9-15, (2005).
- [85] Kawashiro, K., Sugahara, H., Sugiyama, S., Hayashi, H., 'Effect of Organic Solvents on Enantioselectivity of Protease Catalysis', *Biotechnology and Bioengineering*, **53**, 26-31, (1996).
- [86] Segel, J.H., 'Enzyme Kinetics', *John Wiley and Sons*, New York, 1st ed., (1975).
- [87] Hirakawaa, H., Kamiyab, N., Kawarabayashic, Y., Nagamunea, T., 'Log P Effect of Organic Solvents on a Thermophilic Alcohol Dehydrogenase', *Biochimica et Biophysica Acta*, **1748**, 94- 99, (2005).
- [88] Travers, F., Douzou, P., 'Dielectric Constant of Alcoholic-Water Mixtures at Low Temperature', *Journal of Physical Chemistry*, **74**, 2243-2244, (1970).

- [89] Akerlöf, G., 'Dielectric Constant of Some Organics Solvent – Water Mixtures at Various Temperatures', *The Journal of the American Chemical Society*, **54**, 4125–4139, (1932).
- [90] Maryott, A.A., Smith, E.R., 'Table of Dielectric Constants of Pure Liquids', United States Department of Commerce *National Bureau of Standards Circular 514*, Issued August 10, (1951).
- [91] Sukovataya, I.E., Tyulkova, N.A., 'Effect of Dielectric Properties Of Media on Kinetic Parameters of Bioluminescent Reaction', *Vestnik Moskovskogo Univerciteta. Khimiya*, **41**, no. 6, 8-11, (2000).
- [92] Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., 'Analitik Kimya Temelleri', 7. baskıdan çeviri, 3. Baskı, *Bilim Yayıncılık*, Ankara, 1. cilt pp: 21-31
- [93] Özbek, H., Keskin, S., 'Standart Sapma mı Yoksa Standart Hata mı?', *Van Tıp Dergisi*; **14(2)**, 65-67, (2007).
- [94] Takami H., Akiba T., Horikoshi K., 'Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No.AH-101', *Applied Microbiology and Biotechnology*, **30**, 120-124, (1989).
- [95] A. Alam 'A Model for Formulation of Protein Assay', *Analytical Biochemistry*, **203**, 121-126, (1991).
- [96] Gupta, A., Roy, I., Patel, R.K., Singh, S.P., Khare, S.K., Gupta, M.N., 'One-Step Purification and Characterization of an Alkaline Protease from Haloalkaliphilic *Bacillus* sp.', *Journal of Chromatography A*, **1075**, 103–108, (2005).
- [97] Ghorbel, B., Kamoun, A.S., Nasri, M., 'Stability Studies of Protease from *Bacillus cereus* BG1', *Enzyme and Microbial Technology*, **32**, 513–518, (2003).
- [98] Seemek. J.J., Grosberg, S.E., 'A Rapid, Sensitive and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250.', *Analytical Biochemistry*, **79**, 544-552, (1977).
- [99] Spector, T., 'Refinement of the Coomassie Blue Method of Protein Quantitation', *Analytical Biochemistry*, **86**, 387-393, (1978).
- [100] Chaudhari, A., Patil, C.S., Shankarwar, A.G., Arbad, B.R., Mehrotra, S.C., 'Temperature Depend Dielectric Relaxation Study of Aniline in Dimethylsulphoxide and Dimethylformamide Using Time Domain Technique' *Journal of the Korean Chemical Society*, **45**, no. 3, 201-206, (2001).
- [101] Gagliardi, L.G., Castells, C.B., Rafols, C., Roses, M., Elisabeth, B., 'Static Dielectric Constant of Acetonitrile/Water Mixtures at Different Temperatures and Debye – Hückel and a_0B Parameters for Activity Coefficient', *Journal of Chemical and Engineering Data*, **52**, 1103-1107, (2007).

- [102] Muta, Y., Inouye, K., 'Inhibitory Effects of Alcohols on Thermolysin Activity as Examined Using a Fluorescent Substrate' *The Journal of Biochemistry*, **132**, 945-951, (2002).
- [103] Alam, M.N., Tadasa, K., Maeda, T., Hiroshi, K., 'Kinetics of inhibition of Thermolysin – Catalyzed Peptide Synthesis by Alcohols in Aqueous Organic One – Phase System', *Biotechnology Letters*, **19**, 563-568, (1997).
- [104] Pazhang, M., Khajeh, K., Ranjbar, B., Hosseinkhani, S., 'Effects of Water-Miscible Solvents and Polyhydroxy Compounds on the Structure and Enzymatic Activity of Thermolysin', *Journal of Biotechnology*, **127**, 45-53, (2006).
- [105] Fersht, A., 'Enzyme Structure and Mechanism', Second edition , **W. H. Freeman and Company**, New York 311-317, (1985).
- [106] Siddiqui, K.S., Saqip, A.A.N., Rashid, M.H., Rajoka, M.I., 'Carboxyl Group Modification Significantly Altered the Kinetic Properties of Purified Carboxymethylcellulase from *Aspergillus niger*' *Enzyme and Microbial Technology*, **27**, 467-474, (2000).
- [107] Bhatti, H.N., Rashid, M.H., Nawaz, R., Khalid, A.M., Asgher, M., Jabbar, A., 'Effect of Aniline Coupling on Kinetic and Thermodynamic Properties of *Fusarium solani* glucoamilase', *Applied Microbiology and Biotechnology*, **73**, 1290-1298, (2007).
- [108] Ozturk, D.C., Kazan, D., Erarslan, A., 'Stabilization and Functional Properties of *Escherichia coli* Penicilin G Acylase by Covalent Conjugation of Anionic Polysaccharide Carboxymethylcellulase', *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **18**, 881-888, (2002).
- [109] Cowan, D.A., 'Thermophilic Proteins: Stability and Function in Aqueous and Organic Solvents', *Comperative Biochemistry and Physiolog.*, **118A**, no. 3, 429-438, (1997).
- [110] Arroyo, M., Guzman, R.T., Mata, I., Castillon, M.P., Acebal, C., 'Prediction of Penicilin V Acylase Stability in Water-Organic Co-Solvent Monophasic Systems as a Function of Solvent Composition', *Enzyme and Microbial Technology*, **27**, 122-126, (2000).
- [111] Simon, L.M, Laszlo, K., Vertesi, A., Bagi, K., Szajani, B., 'Stability of Hydrolytic Enzymes in Water-Organic Solvent Systems', *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **4**, 41-45, (1998).
- [112] Simon, L.M., Kotoroman, M., Garab, G., Laczko, I., 'Structure and Activity of α -Chymotrypsin and Trypsin in Aqueous Organic Media', *Biochemicial and Biophysical Research Communications*, **280**, 1367-1371, (2001).

- [113] Simon, L.M., Kotoroman, M., Szabo, A., Nemcsok, J., Laczko, I., 'The Effect of Organic Solvent/Water Mixtures on the Structure and Catalytic Activity of Porcine Pepsin', *Process Biochemistry*, **42**, 909-912, (2007).
- [114] Kamal, J.K., Xia, T., Pal, S.K., Zhao, L., Zewail, A.H., 'Enzyme Functionality and Solvation of Subtilisin *Carlsberg*: from Hours to Femtosecond', *Chemical Physics Letters*, **387**, 209-215, (2004).
- [115] Mansfeld, J., Hofmann, R.U., 'The Stability of Engineered Thermostable Neutral Proteases from *Bacillus stearotherophilus* in Organic Solvents and Detergents', *Biotechnology and Bioengineering*, **97**, 672-679, (2007).
- [116] Arroyo, M., Torrers, R., Mata, I., Castillon, M.P., Acebal, C., 'Interaction of Penicilin V Acylase with Organic Solvents: Catalytic Activity Modulation on the Hydrolysis of Penicilin V', *Enzyme and Microbial Technology*, **25**, 378-383, (1999).
- [117] Reslow, M., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., 'Organic Solvents for Bioorganic Synthesis: 1. Optimization of Parameters for a Chymotrypsin Catalyzed Process', *Applied Microbiology and Biotechnology*, **26**, 1-8, (1987).
- [118] Ruiz, D.M., Castro, R.E., 'Effect of Organic Solvents on the activity and Stability of an extracellular protease secreted by the haloalkaliphilic archean *Natrialba magadii*', *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **34**, 111-115, (2007).
- [119] Eremeev, N.L., 'Interaction of α -Chymotrypsin with Dimethyl Sulfoxide: A Change of Substrate Could 'Change' the Interaction Mechanism', *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **29**, 434-440, (2003).
- [120] Chin, J.T., Wheeler, S.L., Klibanov, A.M., 'On Protein Solubility in Organic Solvent', *Biotechnology and Bioengineering*, **44**, 140-145, (1994)

ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Batman'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Bursa'da tamamladı. 1994 yılında girdiği Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 1998 yılında mezun oldu. 1999 yılında başladığı yüksek lisans eğitimini 2001 yılında tamamladı. 1999 yılından beri Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.