

***Aeribacillus pallidus* C10'DAN ALKALİN
PROTEAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU ve BİYOTEKNOLOJİK
UYGULANABİLİRLİĞİ**

Vildan YILDIRIM

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

2014

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aeribacillus pallidus C10'DAN ALKALİN PROTEAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE
BİYOTEKNOLOJİK UYGULANABİLİRLİĞİ

Vildan YILDIRIM

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2014

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

***Aeribacillus pallidus* C10'DAN ALKALİN PROTEAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK
UYGULANABİLİRLİĞİ**

Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında, Vildan YILDIRIM tarafından hazırlanan bu çalışma 05/11/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı - Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (8./7.)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 13/11/2014 tarih ve 45/1532 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP, projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2013/297

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Aeribacillus pallidus* C10'DAN ALKALİN PROTEAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULANABİLİRLİĞİ**

Vildan YILDIRIM

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Bu çalışmada; termofilik bakteri olarak tanımlanan *Aeribacillus pallidus* C10'dan ekstra selüler alkalın proteaz enzimi saflaştırıldı ve karakterize edildi. Enzim amonyum sülfat çöktürmesi-diyaliz sonrasında DE52 anyon değişim kromatografisi ve Probond™ afinite kromatografisi teknikleri ile sırasıyla %26,9 verimle 4,85 kat ve %19,56 verimle 17,32 kat saflaştırıldı. Enzimin molekül kütlesi SDS-PAGE ile yaklaşık 38,35 kDa olarak tayin edildi. Enzim için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 9 ve 60°C olarak belirlendi. Enzimin 20-80°C sıcaklıkları arasında 1 saat sonunda aktivitesinin %80'den fazlasını özellikle 60, 70 ve 80°C sıcaklıklarda kararlılığını büyük oranda koruduğu tespit edildi. *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enzimin aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi incelendiğinde Mg⁺², K⁺, Ca⁺², Zn⁺² ve Ag⁺ iyonları varlığında enzimin aktiviteyi artırdığı gözlenirken, Fe⁺², Mn⁺² ve Co⁺² iyonları varlığında ise enzimin yüksek kararlılık sergilediği gözlemlendi. Enzimin oksidantlar, yüzey aktif maddeleri varlığında aktivite kaybettiği fakat %5 SDS varlığında enzimin aktivitesinde %16'lık bir artış olduğu belirlendi. Organik çözücüler varlığında enzimin aktivitesinin %70'den fazlasını koruduğu tespit edildi. Enzim, en yüksek aktiviteyi kazein substratı için gösterdi. Enzimin serin proteaz inhibitörü PMSF ile tamamen inhibe olduğu belirlendi. EDTA varlığında ise enzimin aktivitesini koruduğu gözlemlendi. Bu enzim için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,197 mg/ml ve 7,29 µmol.ml⁻¹.dk⁻¹ olarak hesaplandı.

2014, 90 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Termofilik bakteri, Alkalın proteaz, *Aeribacillus pallidus*, Enzimatik karakterizasyon, Saflaştırma

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF ALKALINE PROTEASE ENZYME FROM *Aeribacillus pallidus* C10

Vildan YILDIRIM

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics
Department of Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

In this study, an extracellular alkaline protease was purified and characterized by *Aeribacillus pallidus* C10 identified as thermophilic bacteria. After ammoniumsulfate precipitation-dialysis, protease was purified by DE52 anion-exchange chromatography and Probond™ affinity chromatography with 26,9% a yield and 4,85 fold, with 19,56% a yield and 17,32 fold respectively. The molecular weight of purified enzyme determined by using SDS-PAGE was approximately 38,35 kDa. The optimum pH and temperature for enzyme was 9 and 60°C respectively. The enzyme activity remained more than 80% of its original activity for 1 h between 20-80°C and was stable especially 60, 70 and 80°C. The effects of various metal ions (Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Ag^+ , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+}) on the protease enzyme activity were examined. This results showed that enzyme activity was increased in the presence of Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} ve Ag^+ ions and it was maintain stability in the presence of Fe^{+2} , Mn^{+2} ve Co^{+2} . The enzyme wasn't stable in the presence of surfactants and oxidizing agent but in the presence of 5% SDS the enzyme activity was increased %16. The enzyme activity was found to retain more than %70 in the presence of organic solvents. The protease enzyme showed highest activity together with casein. The protease was almost completely inhibited by the serine protease inhibitor PMSF. The enzyme was preserve its activity in the presence of EDTA. The kinetic parameters, V_{max} and K_M of the purified protease were determined by using Lineweaver-Burk plot 0,197 mg/ml and 7,29 $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{dk}^{-1}$ respectively.

2014, 90 Pages

Keywords: Thermophilic bacteria, alkaline protease, *Aeribacillus pallidus*, Enzymatic Characterization, Purification

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarında çalışılmıştır.

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca beni her konuda destekleyen hocam Sayın Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na gösterdiği ilgi ve hoşgöründen dolayı teşekkürlerimi sunarım. Çalışmam esnasında laboratuvarın tüm imkanlarını sunan bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a ve eğitimimin her aşamasında emeği geçen başta tüm bölüm hocalarıma teşekkür ederim. Bu çalışmayı yürütürken bilgi ve tecrübesine başvurduğum Sayın Doç. Dr. Ahmet Adıgüzel'e çalışmamın farklı aşamalarındaki yardımlarından dolayı teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca çalışmalarım sırasında geç saatlere kadar beni yalnız bırakmayıp asla unutamayacağım yardımlarından dolayı arkadaşlığı için Yeliz DEMİR'e, deneysel aşamalarda karşılaştığım sorunları çözmek için bilgilerine başvurduğum Sayın Arş. Gör. Yağmur ÜNVER'e ve Sayın Arş. Gör. Melike YILDIZ'a, ihtiyaç duyduğum her zaman yardımını ve manevi desteğini gördüğüm Sayın Arş. Gör. M. Özkan BALTACI'ya, tez yazım aşamasında yardımlarından dolayı Nurdan GÖNÜL'e, Enver F. KOÇPINAR'a çok teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca zor zamanlarımda bana manevi destek veren aynı laboratuvarı paylaştığım bütün yüksek lisans ve doktora öğrencilerine teşekkür ederim. Son olarak hayatımın her anında desteklerini ve güvenlerini hissettiğim sevgili aileme yanımda oldukları için sonsuz sevgilerimi sunarım.

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu (2013/297 nolu proje ile) tarafından desteklenmiştir.

Vildan YILDIRIM

Ekim, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Biyoteknoloji.....	1
1.2. Enzimler	2
1.2.1. Enzimlerin sınıflandırılması	4
1.2.2. Proteazlar.....	6
1.2.2.a. Proteazların sınıflandırılması.....	7
1.2.3. Bakteriyel alkalin proteazlar ve özellikleri	12
1.2.4. Proteazların uygulama alanları	13
1.2.4.a. Deterjan endüstrisi	14
1.2.4.b. Deri endüstrisi	15
1.2.4.c. Gıda endüstrisi.....	15
1.2.4.d. Peptid sentezi.....	16
1.2.4.e. Fotoğraf endüstrisi	16
1.2.4.f. Atık arıtımı ve dönüşümü	17
1.2.4.g. Kozmetik ve ilaç endüstrisi	17
1.3. Termofilik bakteriler	18
1.3.1. <i>Aeribacillus</i>	19
1.3.1.a. <i>Aeribacillus pallidus</i>	19
2. KAYNAK ÖZETLERİ	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	31
3.1. Materyal.....	31
3.1.1. Kullanılan organizma	31
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	31

3.1.3. Kullanılan cihaz ve ekipmanlar	31
3.2. Yöntem	32
3.2.1. Petride proteaz aktivitesinin belirlenmesi	32
3.2.2. Alkalın proteaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi.....	33
3.2.3. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması	33
3.2.4. Protein tayini	34
3.2.4.a. Kalitatif protein tayini	34
3.2.4.b. Bradford yöntemiyle protein tayini	34
3.2.5. Homojenat hazırlanması.....	35
3.2.6. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz.....	35
3.2.7. DE52 anyon değişim kromatografisi.....	36
3.2.8. Probond™ afinite kromatografisi	37
3.2.8.a. Probond™ kolonun hazırlanması	37
3.2.8.b. Numunenin kolona yüklenmesi.....	38
3.2.9. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü ve enzimin molekül kütlesinin tayini	38
3.2.10. Alkalın proteaz enziminin zimogram analizi	39
3.2.11. Proteaz enzimiyle ilgili yapılan karakterizasyon çalışmaları	40
3.2.11.a. Alkalın proteaz enzimi için optimum pH ve stabil pH bulunmasına yönelik çalışmalar	40
3.2.11.b. Alkalın proteaz enzimi için optimum sıcaklığın ve stabil sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar	41
3.2.11.c. Proteaz enzimin için K_M ve V_{max} parametrelerinin bulunmasına yönelik çalışmalar	41
3.2.11.d. Bazı metal iyonlarının alkalın proteaz enziminin aktivitesine etkisini belirlemeye yönelik çalışmalar.....	42
3.2.11.e. Bazı organik çözücülerin alkalın proteaz enziminin aktivitesi üzerine etkisini belirlemeye yönelik çalışmalar.....	42
3.2.11.f. Bazı inhibitörlerin alkalın proteaz enziminin aktivitesi üzerine etkisini belirlenmeye yönelik çalışmalar.....	42
3.2.11.g. Alkalın proteaz aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanın etkisinin belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	43

3.2.11.h. Alkalin proteaz enziminin doğal substratlara olan özgünlüğünün belirlenmesine yönelik çalışmalar	43
3.2.11.1. Ticari olarak satılan bazı deterjanların alkalin proteaz enzimi üzerine etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar	44
3.2.12. Verilerin istatistiksel analizi.....	44
4. ARAŞTIRMA ve BULGULAR.....	44
4.1. Kullanılan Mikroorganizma ve Petride Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	44
4.2. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	45
4.3. Proteaz Aktivitesi Hesaplamasında Kullanılan Tirozin Standart Grafiği	46
4.4. Proteaz Enziminin Saflaştırma Basamakları Sonuçları	47
4.4.1. Amonyum sülfat çöktürmesi ve sonuçları.....	47
4.4.2. DE52 anyon değişim kromatografisi sonuçları.....	48
4.4.3. Probond™ afinite kromatografisinin sonuçları.....	49
4.4.4. SDS-PAGE ile enzimin saflık kontrolü, molekül kütesinin tayini ve zimogramının belirlenmesine yönelik sonuçlar	50
4.7. K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Sonuçlar	55
4.8. Bazı Metal İyonlarının <i>A. pallidus</i> C10'dan Saflaştırılan Proteaz Enzime Etkisine Yönelik Sonuçları	56
4.9. Bazı Organik Çözücülerin <i>A. pallidus</i> C10'dan Saflaştırılan Proteaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisine Yönelik Sonuçları.....	57
4.10. <i>A. pallidus</i> C10'dan Saflaştırılan Proteaz Enzimin Aktivitesi Üzerine Bazı İnhibitörlerinin Etkisinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar	60
4.11. <i>A. pallidus</i> C10'dan Saflaştırılan Proteaz Enzimin Aktivitesi Üzerine Yüzey Aktif Maddelerinin ve Okside Edici Ajanının Etkisinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar	61
4.12. <i>A. pallidus</i> C10'dan Saflaştırılan Proteaz Enzimin Doğal Substratlara Olan Özgünlüğün Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar.....	62
4.13. <i>A. pallidus</i> C10'dan Saflaştırılan Proteaz Enzimin Aktivitesi Üzerine Bazı Endüstriyel Deterjanların Etkisinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar	63
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	64
KAYNAKLAR	78
EKLER.....	85

EK 1.....	85
EK 2.	86
EK 3.....	88
ÖZGEÇMİŞ	91

SİMGELER DİZİNİ

[S]	: Substrat konsantrasyonu
Asp	: Aspartik asit amino asiti
A.	: <i>Aeribacillus</i>
B.	: <i>Bacillus</i>
BME	: β -merkaptoetanol
BSA	: Sığır serum albümini
DEAE	: Dietilaminoetil
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E.C.	: Enzim komisyon numarası
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EU	: Enzim ünitesi
His	: Histidin amino asiti
K_M	: Enzimin substrata ilgisini gösteren sabit
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PMSF	: Fenilmetilsülfonilflorid
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakika/devir
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
Ser	: Serin amino asiti
sp.	: Cins
TCA	: Trikloroasetik asit
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Serin proteazların spesifiteleri	8
Şekil 1.2. Aspartik proteazların mekanizması	9
Şekil 1.3. Papainin üç boyutlu yapısı.....	10
Şekil 1.4. Aktif bölgelerindeki fonksiyonel gruplara göre proteazların mekanizmaları	11
Şekil 4.1. Petrideki proteaz aktivitesi	45
Şekil 4.2. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik	46
Şekil 4.3. Proteaz aktivitesi için standart tirozin grafiği.....	46
Şekil 4.4. Doygunluk aralığına göre amonyum sülfat çöktürme grafiği.....	47
Şekil 4.5. Proteaz enziminin DE52 anyon değişim kromatografisi ile elüsyonunu gösteren grafik	48
Şekil 4.6. Proteaz enziminin Probond™ afinite kromotografisi ile elüsyonunu gösteren grafik	49
Şekil 4.7. SDS-PAGE sonucu çizilen Log MK-R _f grafiği	51
Şekil 4.8. <i>A. pallidus</i> C10'dan izole edilen proteaz enziminin SDS-PAGE ve zimogram görüntüsü.....	51
Şekil 4.9. Proteaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği.....	52
Şekil 4.10. Proteaz enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.....	53
Şekil 4.11. Proteaz enzimi optimum sıcaklık ölçülmesi için çizilen sıcaklık-bağıl aktivite grafiği	54
Şekil 4.12. Proteaz enzimi için sıcaklık kararlılık grafiği.....	55
Şekil 4.13. Kazein substratı için K _M ve V _{max} bulunmasına yönelik 1/V-1/[Kazein] Lineweaver-Burk grafiği	56
Şekil 4.14. <i>A. pallidus</i> C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin organik çözücülerdeki 1 saat inkübasyon sonundaki sonuçları	59
Şekil 4.15. <i>A. pallidus</i> C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin organik çözücülerdeki 24 saat inkübasyon sonundaki sonuçları.....	59
Şekil 4.16. <i>A. pallidus</i> C10'dan saflaştırılan proteaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi	61

Şekil 4.17. *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine bazı ticari olarak satılan deterjanların etkisi63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Endüstriyel enzimler ve kullanım alanları.....	4
Çizelge 4.1. Proteaz enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite- çöktürme aralık çizelgesi.....	47
Çizelge 4.2. Proteaz enziminin DE52 anyon değişim kromatografisinden saflaştırma basamakları sonuçları.....	49
Çizelge 4.3. Proteaz enziminin Probond™ afinite kromatografisinden saflaştırma basamakları sonuçları.....	50
Çizelge 4.4. 0,1 M sodyum fosfat (pH6,0–8,0), Tris-HCl (pH 7,0–9,0) ve glisin-NaOH (pH 9,0–11,0) tampon çözeltileri kullanılarak proteaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	52
Çizelge 4.5. 0,1 M sodyum fosfat (pH 6,0–8,0), Tris-HCl (pH 7,0–9,0) ve glisin-NaOH (pH 9,0–11,0) tampon çözeltileri kullanılarak proteaz enziminin stabil pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	53
Çizelge 4.6. Proteaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık- bağıl aktivite (%) ölçüm sonuçları çizelgesi.....	54
Çizelge 4.7. Proteaz enziminin sıcaklık kararlılığını belirlemek için zaman-sıcaklık- kalan aktivite (%) ölçüm sonuçları çizelgesi.....	55
Çizelge 4.8. <i>Aeribacillus pallidus</i> C10'dan saflaştırılan proteaz enzimine metal iyonlarının etkisi.....	57
Çizelge 4.9. <i>Aeribacillus pallidus</i> C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin organik çözücülerdeki 1 saat inkübasyon sonundaki sonuçları.....	58
Çizelge 4.10. <i>Aeribacillus pallidus</i> C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin organik çözücülerdeki 24 saat inkübasyon sonundaki sonuçları.....	58
Çizelge 4.11. <i>Aeribacillus pallidus</i> C10'dan saflaştırılan proteaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi.....	60
Çizelge 4.12. <i>Aeribacillus pallidus</i> C10'dan saflaştırılan proteaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajanın etkisi.....	62
Çizelge 4.13. <i>Aeribacillus pallidus</i> C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin doğal subsratlar varlığında aktivitesi.....	62

1. GİRİŞ

1.1. Biyoteknoloji

İlk çağlardan beri enzimlerin rol aldığı şarap, peynir, ekmek ve yoğurt yapımı gibi birçok biyoteknolojik uygulamaları insanlar gündelik hayatlarında enzimlerin varlığından habersiz kullanmışlardır. 19. yüzyılın ortalarında Louis Pasteur'un çalışmaları ile mikroorganizmalarda fermantasyon olayının nedeninin enzimler olduğu ortaya çıkınca, insanlar biyoteknoloji biliminin bilincine varmışlardır (Çırakoğlu 2009). Biyoteknoloji; canlı organizma ve biyolojik sistemleri kullanarak üretim ve hizmet sektörü için moleküler ve hücresele proseslerin uygulanmasıdır (Smith 2004).

Biyoteknoloji; biyoloji, biyokimya, mikrobiyoloji, moleküler biyoloji, protein mühendisliği, hücre biyolojisi, gıda, kimya, malzeme mühendisliği ve enzimoloji bilimlerini içeren multidisipliner bir bilimdir (Higgen *et al.* 1985). Biyoteknoloji tıp, tarım, çevre, gıda ve endüstriyel biyoteknoloji olmak üzere beş temel alanda incelenir (Kolankaya 2000). Biyoteknoloji; tıpta hastalıkların teşhis ve tedavilerinde alternatif ilaç ve kit bulunmasına, tarımda istenilen genin bulunması, izolasyonu ve hedef hücreye aktarılmasına, gıdada verimli ve kaliteli yeni ürünler geliştirilmesine, çevrede atıkların artımına ve çevre kirliliğinin önlenmesine katkıda bulunur (EFB 1999).

Endüstriyel biyoteknoloji aynı zamanda beyaz biyoteknoloji olarak da adlandırılmaktadır. Endüstriyel biyoteknolojinin amacı; yenilenebilir kaynakları, canlı hücreleri ve enzimleri kullanarak minimum atık üretimi ve enerji kullanımı ile daha temiz prosesler ortaya koymaktır (Maury *et al.* 2005). Endüstriyel biyoteknolojide özellikle enzimler üzerine modifikasyonlar yaparak enzimlerin termostabilitesini artırma, geniş pH aralığında stabil kalmasını sağlama, depolama ömrünü uzatma gibi çalışmalar ile narin yapıları enzimleri endüstriyel alanda kullanılabilir hale getirmek amaçlanmaktadır. Böylece hem istenilen enzimler biyoteknoloji sayesinde ticari olarak

üretilebilir hem de daha ekonomik ve çevreye daha az zarar veren ürünlerin eldesi sağlanmış olur (Bachmann 2003).

Biyoloji ve enzimoloji biliminde meydana gelen gelişmeler sayesinde biyoteknoloji çağımızda karşılaşılan problemlere çözüm bulmaya aday bir bilimdir (Beg *et al.* 2003). Gelişmiş ülkelerin üretimini %40 oranında biyolojik ve biyoteknolojik kaynaklı ürünler oluşturmaktadır (Başaga ve Çetindamar 2000). Günümüzde biyoteknolojinin çok çeşitli alanlarda gelişme göstermesi ve moleküler biyoloji tekniklerinden biri olan rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi, çok yeni ve dikkat çeken bir alandır (Gessese 1999). Bu teknikler kullanılarak gelişen enzim teknolojisi ile yüksek sıcaklıklarda, yüksek pH değerlerinde, organik çözücülerde uzun süre kararlı kalabilen enzimler elde etmek endüstriyel biyoteknoloji alanında araştırma yapan araştırmacıların dikkatini çekmektedir.

1.2. Enzimler

Enzimler, katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç çoğunluğu protein yapısında olan, doğal olarak sadece canlılar tarafından üretilen, canlı organizmada meydana gelen tüm reaksiyonların uygun koşullarda gerçekleşmesini ve kontrolünü sağlayan spesifik biyokatalizörlerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2009; Önal 2010). Ayrıca enzimler çevre dostu olmaları ve sanayi sektöründeki geniş yelpazeli uygulamalarından dolayı yeşil kimyasallar olarak da tanımlanmaktadır (Rai and Mukherjee 2009).

Enzimlerle ilgili yapılan ilk temel çalışmaları; Spallanzai (1783)'in atmacada mide suyunun eti yumuşattığını belirlemesi, Robiquet and Chaland (1830)'in amigdalanın acı badem tarafından hidrolizlendiğini göstermesi, Payen ve Persoz'un nişastayı şekere dönüştüren bir maddeyi alkol çöktürmesiyle elde etmesi, Schwann (1834)'in pepsini saf olarak elde etmesi oluşturmaktadır. Enzimler ilk olarak ferment olarak isimlendirildi. Daha sonraki yıllarda belirli bir enzim üzerine yapılan ilk çalışmayı 1835 yılında S.S. Berzelius gerçekleştirdi ve enzimler için katalizör ifadesini kullandı. Ardından Künhe (1878) ilk enzim terimini kullanan kişi oldu (Önal 2010).

Bir hücre içinde gerçekleşen hemen hemen bütün biyokimyasal reaksiyonlar enzimler olmadan gerçekleşemez. Enzimler protein yapısında olduğu ve DNA tarafından şifrelendiği için bir hücredeki tüm olaylar DNA seviyesinde kontrol edilmektedir. Bu sebeple enzimleri, sadece katalizör olarak tanımlama yarım kalacaktır. Bu moleküller, hücrenin genetik bilgisinin tanımlandığı en önemli araçlardır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzimler, metabolizmada yapım ve yıkım reaksiyonlarında, elektron aktarımında, hidroliz reaksiyonlarında hemen hemen tüm biyokimyasal sürecin can damarını oluştururlar (Önal 2010). Ayrıca enzimler, DNA'nın sentezi ve tamiri, proteinlerin bozulması, programlı hücre ölümü, proteinlerin hücre membranları arasına alınması-verilmesi, nöronların uyarıları iletilmesi gibi canlılığın devamı için gerçekleşen tüm reaksiyonlarda görev alırlar. Her bir reaksiyon için hücre eşsiz özgüllük ile reaksiyonu katalize eden bir enzim kullanır (Whitford 2005). Enzimler hem katalizledikleri reaksiyona hem de ürüne dönüştürdükleri substrata karşı son derece seçicidirler.

Enzimler endüstriyel süreçlerde de geniş bir kullanım alanına sahiptir. Enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kimyasal katalizörlere göre avantajları şunlardır:

1. Substrat özgünlüğü; istenmeyen yan ürün oluşumunu elimine ederek maliyeti düşürür ve çevre sorunu yaratmaz.
2. Bazı stereo özgün reaksiyonlar, enzimler olmadan gerçekleşmez.
3. Reaksiyon hızı yüksektir ve maliyeti düşüktür.
4. Proses koşullarında ısıya duyarlı substratları bozma olasılığını azaltır, korozyon etkilerini ve enerji gereksinimini düşürür (Önal 2010).

Enzimler ayrıca meyve suyu ve süt üretimi, temizlik malzemeleri, tıpta teşhis ve tedavi süreci başta olmak üzere kimya, biyoyakıt, biyolojik silah, fotoğraf endüstrisi, kağıt ve ziraat endüstrileri gibi çok geniş alanlarda kullanılmaktadır. Maliyet bakımından ucuz olması, çok çeşitli alanlarda kullanılıyor olması, *in vitro* şartlarda aktif olması ve toksik, alerjik gibi etkilerinin olmaması, yüksek katalitik aktivite ve yüksek derecede substrat

spesifikliği göstermelerinden dolayı enzimleri yaşamın her alanın da görmek mümkündür (Wiseman 1987).

Çizelge 1.1. Endüstriyel enzimler ve kullanım alanları (Önal 2010)

Endütri	Enzim	Uygulama alanı
Deterjan	Proteaz	Protein uzaklaştırma
	Amilaz	Nişasta uzaklaştırma
	Lipaz	Yağları uzaklaştırma
	Selülağ	Renkleri ağartma ve temizleme
Nişasta ve yakıt	Amilaz	Nişasta sakkarifikasyonu
	Glukozizomeraz	Glukoz-fruktoğ dönüşümü
	Ksinilaz	Viskoziteyi düşürme
	Amiloglukozidaz	şekerleştirme
Gıda	Proteaz	Sütlerde tat ve lezzet geliştirme
	Lipaz	Peynir lezzetleştirme
	Laktaz	Laktoz uzaklaştırma
	Transglutaminaz	Visko-elastik özelliklerin modifikasyonu
Fırıncılık	Amilaz	Ekmek yumuşaklığı ve kabarması
	Ksinilaz	Hamur işleme
	Fosfolipaz	Hamur kararlığı
	Proteaz	Bisküvi üretimi
	Glukoz oksidaz	Hamurun güçlendirilmesi
Hayvan besleme	Fitaz	Fitik asit yıkımı
	Ksinilaz	Sindirim
	Glukanaz	Sindirim
Meşrubat	Pektinaz	Pektin yıkımı
	Amilaz	Meyve suyu işleme
	Laktaz	Meyve suyu berraklaştırma
Tekstil	Selülağ	Pamuk yumuşatma
	Amilaz	Ağartma ve taşlama
	Pektat liyaz	Kir giderme
	Peroksidaz	Boya fazlasının giderilmesi
Kağıt	Lipaz	Pitch kontrolü
	Amilaz	Nişasta kaplaması

1.2.1. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler, öncelikle katalitik etki gösterdikleri substrat adı verilen bileşiklerin adının sonuna ‘az’ eki getirilerek isimlendirildi. Enzimolojik çalışmaların ilerlemesi ve birçoğ

enzimin ortaya çıkmasıyla sistematik bir isimlendirilmeye ihtiyaç olduğu ortaya çıktı. Böylece enzimlerin, uluslararası enzim komisyonu (E.C.) tarafından, katalizledikleri reaksiyon tipi ve mekanizmalarına göre sınıflandırılması yapıldı.

Sistematik isimlendirmenin başlıca özellikleri şunlardır:

- a) Reaksiyonlar ve bu reaksiyonlara etki eden enzimler 6 gruba ayrılır ve her bir grup kendi içinde alt gruplara ayrılır.
- b) Enzimin adı iki kısımda verilir. İsmi ilk bölümü substrat, ikincisi katalizlenen reaksiyonun tipinin sonuna 'az' eki getirilir. Substratlar aralarına iki nokta konularak yazılırlar.
- c) Reaksiyonu açıklayan bir ifade gerekirse parantez içinde ismin sonunda belirtilir.
- d) Her enzime bir sistematik kod verilmiştir. Her enzim E.C. (Enzyme Commission) harflerinden sonra dört rakamdan oluşan bir kod numarasına sahiptir. Birinci rakam enzimin bağlı olduğu grubu, ikincisi kimyasal yapı ve fonksiyonel grubu, üçüncüsü alıcı grubu, dördüncüsü de enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasında sırasını gösterir.

Enzimlerin kod numaralarına göre sınıflandırılması:

1. Oksidoredüktazlar: İndirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarını katalizlerler.
2. Transferazlar: Hidrojen dışındaki grupların iki substrat arasında transferini katalizleyen enzimlerdir.
3. Hidrolazlar: Ester, eter, peptid, glikozid, C-C, C-N, C-O gibi bağlarını bir su molekülünün katılmasıyla hidrolize eden enzim grubudur.
4. Liyazlar: Hidrolitik olmayan başka bir yoldan çift bağ oluşumunu katalizleyen enzim grubudur.
5. İzomerazlar: Molekül içindeki geometrik ya da yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzim grubudur.
6. Ligazlar: ATP ve GTP gibi yüksek enerjili birleşiklerden fosfat bağının kopmasıyla açığa çıkan enerji ile iki molekülü birbirine bağlayan enzim grubudur (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

1.2.2. Proteazlar

Proteazlar ya da peptidazlar proteinlerin yapısındaki peptid bağlarını hidrolize eden ve organik çözücü varlığında peptid sentezini katalizleyen enzim grubudur (Sookkheo 2000). Proteazlar, ticari uygulamalarda önemli konuma sahip hidrolitik enzimlerdir (Joshi and Satyanarayana 2012).

Proteazlar, tüm organizma türlerinde mevcut olan toplam protein sayısının %2'sini temsil etmektedir. Peptidazları kodlayan toplam yaklaşık 500 insan geni vardır. MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) veritabanı peptidazlar ve onları kodlayan genler hakkında oldukça zengin bir bilgi kaynağıdır. Bu veritabanı bilgiyi depolama ve bilgiye erişimi hiyerarşik sınıflandırma sistemini kullanarak kolaylaştırmaktadır (Polgar 2005).

Endüstriyel uygulaması olan ticari enzimlerin en büyük sınıfını proteolitik enzimler oluşturmaktadır. Proteinleri parçalayan proteazlar; dünya enzim pazarının %60'ını içeren biyokatalizörlerin en önemli sınıfını oluştururlar. Başta çamaşır deterjanları olmak üzere, deri işleme, et yumuşatma, gıda, ilaç, protein geri kazanımı ve atık endüstrisinde proteaz enzimi kullanılmaktadır (Asokan and Jyanthi 2010). Ayrıca proteazlar; kanın pıhtılaşması, doku düzenlenmesi, protein katabolizması, hücre gelişimi ve göçü, öncül proteinlerden hormonların ve aktif peptidlerin ayrılması, mebranlardan proteinlerin geçişi gibi tüm metabolik ve fizyolojik olaylarda önemli görevlere sahiptirler (Rao *et al.* 1998).

Proteazlar, organizmada sentezlenen proteinlerin biçiminin, konformasyonunun, büyüklüğünün ve döngüsünün kontrolünde gerekli temel enzim grubudur. Bu enzimler organizmada kanın pıhtılaşması, apoptozis ve doku farklılaşması gibi yaşamsal önemi olan faaliyetlerde görev alırlar (Koçak 2005). Proteazları ayrıca hücre iletim sisteminde ve fizyolojik reaksiyonların birçok alanında görmek mümkündür. Farklı hastalıklarda farklı proteazların rol almasından dolayı son yıllarda terapötik ajanların geliştirilmesinde de proteazlara olan ilgi giderek artmıştır (Shivanad and Jayaraman 2009).

1.2.2.a. Proteazların sınıflandırılması

Proteazlar temelde katalize ettikleri reaksiyon tipine ve katalitik mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadır. Ayrıca proteazları kaynaklarına göre bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal proteazlar; aktive oldukları pH aralıklarına göre de asidik, alkalın ve nötral proteazlar olarak bir sınıflandırma yapılmaktadır (Rao *et al.* 1998).

Proteazlar katalize ettikleri reaksiyon tipine göre endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar şeklinde iki gruba ayrılır:

1. Endopeptidazlar

Polipeptid zincirin N- ve C- uçları dışında iç bölgelerdeki peptid bağları üzerine etki eden gruplardır. Endopeptidazlar katalitik mekanizmalarına göre serin, sistein, aspartik ve metalo proteaz olmak üzere dört alt gruba ayrılmaktadır (Rao *et al.* 1998).

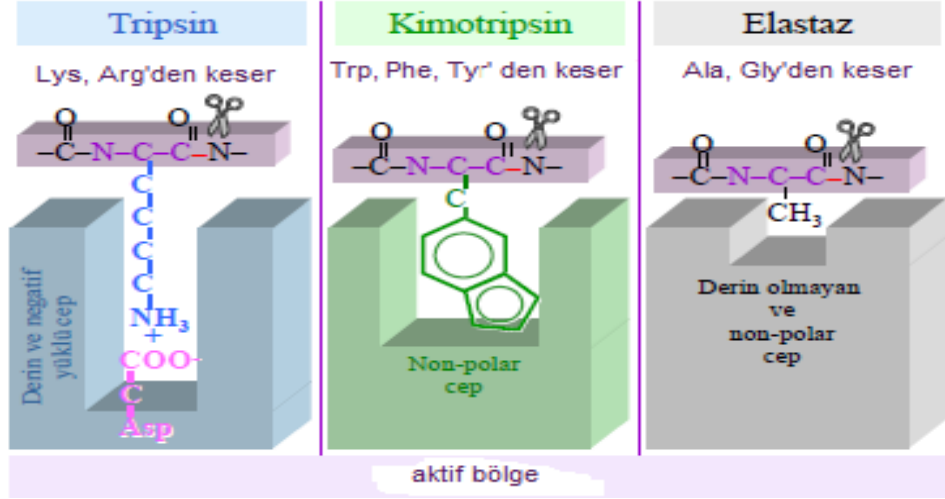
a. Serin proteazlar

Serin proteazlar ilk olarak 1960 yılında Bender *et al.* tarafından kimotripsin enziminin kinetiği üzerine yaptığı çalışmalar ile karakterize edilmiştir. Daha sonra Blow *et al.*'un kimotripsinin üç boyutlu yapısını belirlemesiyle mekanizması ortaya çıkmıştır (Polgar 2005).

Serin proteazlar aktif bölgelerindeki serin kalıntıları ile karakterize edilirler. 13 klan ve 40 aileden oluşan serin proteazlar, tüm proteolitik enzimlerin üçte birinden fazlasını oluşturmaktadır (Cera 2009). Serin proteazlar arasında PA klanı ve S1 ailesinin tripsin benzeri peptidazları en bol bulunan serin proteazlardır.

Serin proteazları substrat tercihlerine göre dört ana grupta toplamak mümkündür. Bunlar; tripsin benzeri serin proteazlar, kimotripsin benzeri serin proteazlar, elastaz benzeri serin proteazlar ve subtilisinlerdir. Tripsin benzeri serin proteazlar, lys (lisin)

veya arg (arjinin) aminoasitlerinden sonraki peptid bağı; kimotripsin benzeri serin proteazlar, aromatik aminoasitlerin bulunduğu peptid bağı; elastaz benzeri serin proteazlar, küçük yan zincirlerdeki peptid bağı; subtilisinler, prokaryotlardaki peptid bağı hidrolizlerler (Gisha 2014).



Şekil 1.1. Serin proteazların spesifiteleri (Özden 2014)

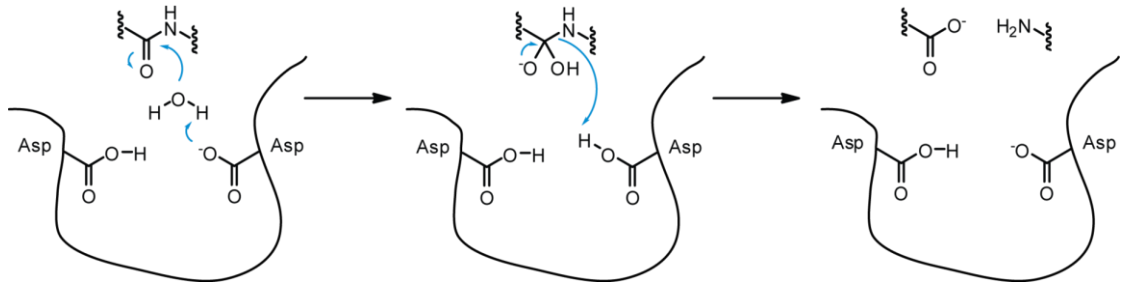
Serin proteazların ökaryot, prokaryot, arke ve virüsler de bulunması hayati öneme sahip olduğunu göstermektedir. Serin proteazlar sindirim (tripsin, kimotripsin) dahil olmak üzere immun sistemde (kompleman B, C, D), kan pıhtılaşması (faktör VIIa, IXa, Xa, XIIa) ve fibroliz (ürokinaz, plazmin) gibi çok önemli fizyolojik süreçlere katılırlar (Polgar 2005).

Serin proteazlar genellikle pH 7-11 aralığında aktiftirler. Molekül ağırlığı 18-35 kDa aralığında değişir. İzoelektrik noktaları pH 4-6 aralığındadır (Deshpande *et al.* 1998). PMSF (fenilmetilsülfonilflorür), DFP (diizopropilflorofosfat), TLCK (tosil-L-lizinklorokumarin) serin proteazların inhibitörleridir (Rao *et al.* 1998).

b. Aspartik proteaz

Asit proteazlar olarak bilinirler ve katalitik bölgelerinde aspartik asit bulunması ile karakterize edilirler. Aspartik proteazlar 3 gruba ayrılarak pepsin (A1), retropepsin (A2), pararetrovirüslerden (A3) elde edilen enzimler şeklinde sınıflandırılmıştır (Dash *et al.* 2003).

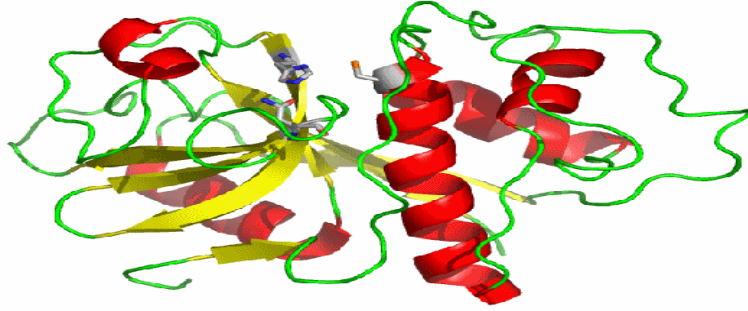
Çoğu aspartik proteazlar düşük pH değerlerinde aktiftirler. Molekül kütlesi 30-45 kDa arasında değişir. Bilinen aspartik proteaz inhibitörü pepstatindir (Rao *et al.* 1998). Pepsin, katepsin D ve E, renin aspartat en iyi bilinen aspartik proteazlardır (Bugg 1996).



Şekil 1.2. Aspartik proteazların mekanizması (Sonuç 2011)

c. Sistein proteaz

Sistein proteazlar tiyol proteazlar olarak bilinirler. Hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunurlar. Sistein proteazların katalitik aktiviteleri sistein ve histidin kalıntılarına bulunmalarına bağlı olup sistein ve HCN varlığında etki gösterirler. En iyi bilinen sistein proteaz papaindir. Sistein proteazlar, aktif bölgesinde $-SH$ grubu bulundurmaları, ağır metaller ve okside edici ajanlar varlığında inhibe olmalarından dolayı önemli enzim grubudur. Papain benzeri tiyol, tripsin benzeri tiyol, glutamik aside özel tiyol ve diğer tip tiyol proteazlar olmak üzere dört gruba ayrılarak incelenir (Genckal and Tari 2006; Dubey *et al.* 2007).



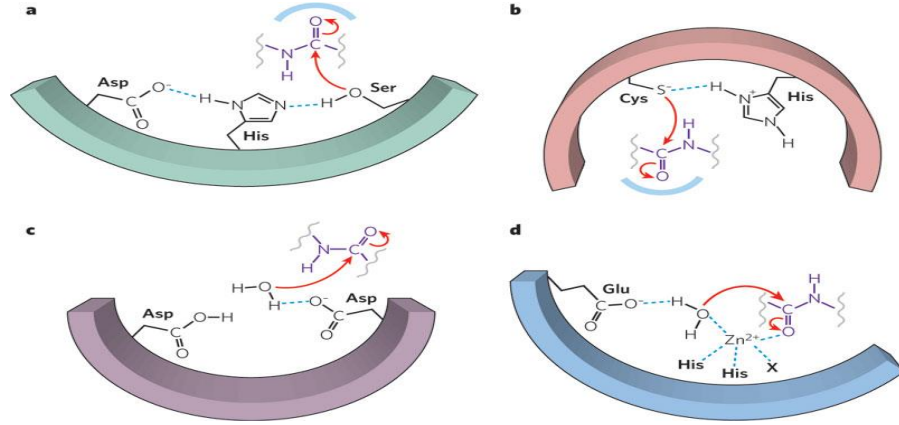
Şekil 1.3. Papainin üç boyutlu yapısı (Özden 2014)

Sistein proteazlar bitkilerin büyüme ve gelişmesinde, çekirdekte protein birikiminde, apoptozisde, biyotik ve abiyotik strese karşı yanıt oluşturma gibi fizyolojik olaylarda görev yaparlar (Grudkowska and Zagdanska 2004). Sistein proteazlar nötral pH'larda aktifitirler. PCMB (p-kloromerküribenzoat) gibi sülfidril ajanlarına karşı hassastırlar, fakat metal şelatlarından etkilenmezler (Rao *et al.* 1998).

d. Metallo proteaz

Metallo proteazların katalitik etkisi diğer proteazlardan farklıdır. Aktiviteleri için iki değerlikli özellikle çinko gibi metallere ihtiyaç duyarlar (Divakar *et al.* 2010). Metallo proteazların doku morfogenezi ve farklılaşmasında rolü vardır. Ayrıca kanser hastalıkların tedavisinde kullanılabilirler. Bakteriler de termolizin, yüksek organizmalarda yılan zehrinde bulunan hemorhagic toksin bilinen en yaygın metallo proteazlardır (Rao *et al.* 1998). Metalloproteazlar EDTA gibi şelat yapıcı ajanlar varlığında inhibe olurlar. Çinko metali enzim aktivitesi için gerekli iken kalsiyum metali protein yapısının korunması için gereklidir (Deshpande *et al.* 1998).

Aktif bölgelerindeki fonksiyonel gruplara göre proteazların mekanizmaları aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.



Şekil 1.4. Aktif bölgelerindeki fonksiyonel gruplara göre proteazların mekanizmaları
a:Serin proteaz b:Sistein proteaz c:Aspartik proteaz d:Metallo proteaz (Sonuç 2011)

2. Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar polipeptid zincirinin uç kısımlarına etki ederler. Polipeptid zincirin uç kısmındaki N- amino ucuna etki ederse aminopeptidaz, C- karboksil ucuna etki ederse karboksipeptidaz olarak isimlendirilirler.

a. Aminopeptidazlar

Aminopeptidazlar polipeptid zincirin serbest amino ucundaki aminoasitler üzerine etki ederler. Bakteriler ve mantarlar başta olmak üzere birçok mikroorganizmada bulunurlar. Fakat bunların substrat spesifikliği ve hidroliz ürünleri farklılık göstermektedir. Aminopeptidazlar genellikle hücre içi enzimlerdir. *Aspergillus oryzae*'nin bir istisna ile hücre dışı aminopeptidaz ürettiği rapor edilmiştir (Rao *et al.* 1998).

b. Karboksipeptidazlar

Karboksipeptidazlar polipeptid zincirin serbest karboksil ucundaki aminoasitler üzerine etki ederler. Karboksipeptidazlar aktif bölgelerindeki aminoasitlere göre; serin karboksipeptidaz, sistein karboksipeptidaz ve metallo karboksipeptidaz olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar. *Penicillium* sp., *Saccharomyces* sp. ve *Aspergillus* sp.

organizmalarından izole edilen serin karboksipeptidazların substrat spesifikliği aynı olmasına rağmen stabiliteleri, moleköl kütleleri ve inhibitör etkileri birbirinden farklıdır. Ayrıca *Pseudomonas* sp. ve *Saccharomyces* sp.'den izole edilen metallo karboksipeptidazların aktiviteleri için Co^{+2} ve Zn^{+2} metallerine ihtiyaç duyduğu görölmektedir (Rao *et al.* 1998).

3. Omegapeptidazlar

Omegapeptidazlar serbest bir N- amino ve C- karboksil ucuna ihtiyaç duymazlar. Bu uçlara yakın bölgelere etki ederler. Gama-glutamil hidrolazlar ve proglutamil peptidazlar omegapeptidazlara örnek verilebilir (Polaina and MacCabe 2007).

1.2.3. Bakteriyel alkalın proteazlar ve özellikleri

Günümüzde endüstride önemi olan enzimlerin %80'nini hidrolitik enzimler oluşturmaktadır (Divakar *et al.* 2010). Dünya enzim pazarının üçte ikisi mikroorganizmalar tarafından izole edilen enzimlerden oluşmaktadır. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, büyüme koşullarının kolay optimize edilmesi ve ucuz olması, yüksek saflıkta ve tek üretim prosesinde çok fazla miktarda üretilmesidir. Mikrobiyal enzimlerin yüksek sıcaklık, yüksek pH gibi ekstrem koşullarda yüksek aktivite göstermeleri enzimolojide çok fazla kullanılmalarının bir sebebidir (Wiseman 1987; Horikoshi 1999). Mikroorganizmalar ayrıca biyomühendislik ve biyokimyasal çeşitliliklerinden dolayı proteaz üretiminde kullanılan oldukça iyi kaynaktırlar (Lazim *et al.* 2009).

Bakterilerde alkalın proteaz üreticisi olarak *Bacillus* sp. cinsi bakteriler görölmektedir. Bu cinsin suşlarının çoğunun zararsız olması, izolasyonunun ve teşhisinin kolay olması, sentezledikleri proteini dış ortama vermesi, fermentasyon yöntemi ile kısa sürede fazla miktarda üretilmelerinde dolayı cazip endüstriyel organizmalardır (Boyce and Walsh 2007).

Proteaz üreten birçok mikroorganizma olmasına rağmen sadece bir kaçı ticari olarak kullanılmaktadır. Bakteriyel alkalın proteazlar Subtilisin Carlsberg, Subtilisin BPN ve Savinase gibi firmalarda deterjan enzimi olarak kullanılmaktadır. Bu enzim ilk 1914 yılında deterjan katkı maddesi olarak piyasa sunuldu ve oldukça yaygın olarak kullanıldı (Gupta *et al.* 2002).

B. subtilis, *B. amyloliquefaciens*, *Pseudomonas sp.*, *Escherichia coli*, *Lysobacter enzymogenes* gibi birkaç türün proteaz ürettiği, yapılan çalışmalar ile rapor edildi. Bunlardan üretilen alkalın proteazlar yüksek termo/pH stabilitelelerinden dolayı deterjan endüstrisinde çok önemlidir (Asokan and Jayanthi 2010). Endüstriyel sektörlerde verim almak için yüksek sıcaklık, yüksek pH, organik çözücü, oksitleyici ajanlar ve deterjan yüzey aktif maddeleri varlığında enzimin aktif ve stabil olması zorunludur (Arostoo and Zahrami 2012).

Alkalın proteazların optimum pH aralığı pH 9,0-11,0 arasında olup izoelektrik noktaları pH 6,0-12,0 aralığındadır. Optimum sıcaklık aralığı 50-70°C arasındadır. Alkalın proteazların genelde molekül kütlesi 15-30 kDa arasında değişmekle birlikte daha yüksek molekül kütlesine sahip alkalın proteazlar yayınlarda rapor edilmiştir. Bu enzim grubu maksimum aktivite için Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} gibi divalent metallere ihtiyaç duymaktadır (Kumar and Takagi 1999). Ayrıca Ba^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} ve Co^{+2} gibi metallerin varlığında enzimin aktivitesini koruduğu gözlemlendi. Alkalın proteazlar geniş substrat spesifikliğı ile en çok kazein olmak üzere azokazein, BSA, hemoglobin, jelatin gibi substratlara karşı spesifiklik göstermektedir (Gupta *et al.* 2002).

1.2.4. Proteazların uygulama alanları

Proteazlar hem fizyolojik hem de ticari alanda çeşitli uygulama alanları olan enzim grubudur (Raut *et al.* 2012). Başta çamaşır deterjanları, deri işleme, protein geri kazanımı ya da çözme, et yumuşatma, gıda endüstrilerinde yaygın şekilde kullanılırlar (Asokan and Jayanthi 2010). Proteazlar ayrıca ilaç, tekstil, peptid sentezi, atık su

arıtımı, biyokontrol, teşhis-tanı, gümüşün geri kazanımı gibi birçok alanda önemli rollere sahiptirler (Heidari *et al.* 2008; Joshi and Satyanarayana 2012).

1.2.4.a. Deterjan endüstrisi

Alkalin proteazlar deterjan sanayinin üçte ikilik bir payına sahiptir. İyi bir deterjan enziminin, birlikte kullanıldığı oksitleme ajanları ve ağartıcılara karşı dayanıklı olması beklenirken günümüzde ticari olarak kullanılan deterjan enzimleri bu ajanlar varlığında stabilitesini koruyamamaktadır. Bu sorunu çözmek amacıyla zaman, performans, kalite ve üretim maliyeti göz önüne alınarak mikrobiyal çeşitlilik üzerine çalışılmalar yapılmaktadır. Bu bakımdan dış etkenlerden bağımsız ve farklı pH/sıcaklıklarda yüksek aktivite gösterebilen kararlı enzimleri üreten mikroorganizmaları tanımlamak ve geliştirmek önemlidir (Oberoi *et al.* 2001).

Geleneksel sentetik deterjanlara göre kirliliği azaltıcı kapasiteye sahip olması ve oda sıcaklığında daha iyi fonksiyon göstermeleri ile alkalin proteazlar deterjan formülasyonlarında anahtar role sahiptir. Yıkama performansını artırmak için ideal deterjan proteaz seçiminde dikkat edilmesi gereken parametreler; yıkama sırasında farklı sıcaklık ve pH değerlerinde yüksek aktivite göstermesi ve stabil kalması, deterjan bileşenleri ve iyonik kuvvet ile uyumluluğu, lekeyi çıkarabilmesidir (Rai and Mukherjee 2009). Deterjan proteaz seçiminde dikkat edilecek bir diğer husus, izoelektrik noktalarıdır. Deterjan solüsyonun pH değeri ile izoelektrik noktaları uyumlu olduğunda, deterjan proteazlar en iyi performansı sergilerler. Ayrıca enzimin EDTA'ya karşı stabil olması da deterjan formülasyonu için istenilen bir durumdur (Gupta *et al.* 2002).

Bacillus sp. cinslerinden üretilen alkalin proteazlar kan ve süt lekeleri gibi proteinli malzemelerin çıkartılmasını kolaylaştırmak için deterjanlar içinde temizleyici katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Jayakumar *et al.* 2012).

1.2.4.b. Deri endüstrisi

Deri işleme, tarım ekonomisine bağlı gelişmekte olan birçok ülkede önemli ekonomik bir faaliyettir. Tabakalama öncesinde süreç dehidrasyon-hidrasyon, kireçleme-kireçsizleştirme, asitleme-bazifikasyon, kürlenme ve ıslatma gibi aşamalardan oluşur. Deri işleme sürecinde geleneksel yöntemler kullanımı, hidrojen sülfid ve diğer kimyasallar çevre kirliliği ve güvenlik riski oluşturmaktadır. Deri işleme sürecinde oluşan kirliliğin %70'i sepilme aşamasında meydana gelir. Bu da ekolojik dengesizliğe ve verimsizliğe sebep olur.

Deriden kıl ayırma sürecinde kullanılan kireç, istenmeyen çamur oluşumuna neden olur. Aynı zamanda kullanılan sodyum sülfid, yüksek derecede toksiktir ve kötü kokuya sahiptir. Tüm bu nedenlerden dolayı deri işleme sürecinde kontrolü kolay, süreci kısa zamanda gerçekleştirecek, çevre dostu enzimatik yöntemler tercih edilmelidir (Kandasamy *et al.* 2011).

1.2.4.c. Gıda endüstrisi

Gıda endüstrisinde proteazların kullanımı çok eskiye dayanmaktadır. Proteazların temel işlevi proteinleri hidroliz etmektir ve bu özelliğiyle yüksek besin değerinde protein hidrolizatları hazırlanmasını sağlamaktadır. Protein hidrolizatları kan basıncının düzenlenmesinde, bebek mamalarının formülasyonlarında, meyve suyu ve meşrubatların raf ömrünü uzatmada ve özel diyet ürünlerinde önemli role sahiptir. Alkalın proteazlar çeşitli doğal substratlardan hidrolizat üretiminde de kullanılmaktadır (Gupta *et al.* 2002).

Proteazlar ayrıca fırıncılık, peynir yapımı, et yumuşatma ve soya hidrolizatı hazırlama gibi çeşitli uygulama alanlarına sahiptirler (Mahajan and Badgular 2010).

1.2.4.d. Peptid sentezi

Bergman ve Frankel-Conrat (1937), hidrolizin revers enzimatik reaksiyonu kullanılarak proteaz katalizli peptid sentezini rapor ettiği andan bu yana; proteazlar, peptid sentezinde kullanılmaktadır. Enzimatik peptid sentezi kimyasal metodlara göre birçok avantajlara sahiptir. Bu avantajları; reaksiyonları stereo spesifik olarak gerçekleştirebilir olması ve reaktanların yan zincir korumasına, polar olmayan subsratların artan znrlğine ya da değişen termodinamik dengeye ihtiyaç duymaması şeklinde sıralamak mümkündür. Proteazlar, dipeptid ve tripeptid sentezi için başarılı bir şekilde kullanılabilmektedir.

Organik çözücülerin proteaz enzimi üzerine güçlü etkisi vardır (Gupta *et al.* 2002). Organik çözücülerde kararlı proteazlar, sentetik biyoteknoloji için susuz ortamlarda biyokatalizör olarak kullanılmaktadırlar. Organik çözücülerde enzimatik peptid sentezi; polar olmayan subsratların çözünürlüğünün artması, hidroliz reaksiyonlarında termodinamik dengenin tersine çevrilmesi, suya bağlı yan reaksiyonların bastırılması ve mikrobiyal kontaminasyonun önlenmesi gibi birçok avantajlara sahiptir. Organik çözücülerin toksik etkisinin önüne geçmek için organik çözücülere dayanıklı bakteriler; hızlı membran tamir mekanizması, toluen akış pompaları ve cis-trans yağ asitlerin izomerleştirilmesi gibi uygulamaları gerçekleştirirler (Arostoo and Zahrami 2012).

1.2.4.e. Fotoğraf endüstrisi

Alkalin proteazlar X ışını veya fotoğrafik flimlerden gümüşün geri kazanımında önemli rol oynarlar. Çok çeşitli amaçlar için iyi bir gümüş kaynağı olarak kullanılan bu atık flimler, ağırlık olarak %1,5-2,0 gümüş içerir. Gümüşün elde edilmesi geri dönüşümsüz olarak evre kirliliğine sebep olan flimlerin yakılması ile olur. Ayrıca polyesterden yapılan flimlerden bu metod ile gümüşün geri kazanılması mümkün değildir.

Gümüü, jelatine bağı olduğu için proteolitik muameleler ile protein tabakasından uzaklaştırılabilir. Jelatinin enzimatik hidrolizi ile hem gümüü geri kazanılmış olur hem de polyesterden yapılmış flim tekrar geri dönüştürülebilir.

B. subtilis'den izole edilen alkalın proteazın, 50-60°C'de 30 dakikada jelatinden gümüü ayırdığı yapılan bir çalışma ile gösterildi. Ishikawa *et al.* (1993) tarafından yapılan çalışmada, X-ray fliminde jelatin tabakasından gümüü partiküllerini ayırmak için *Bacillus* sp. B21-2'den izole edilen alkalın proteazın kullanıldığı rapor edildi (Gupta *et al.* 2002).

1.2.4.f. Atık arıtımı ve dönüüümü

Proteazlar evsel ve gıda endüstrisinden gelen atıkların işlenmesinde uygulama alanına sahiptir. Proteazlar proteinli atıkların çözündürülmesi ve su sistemlerinin biyolojik oksijen taleplerini azaltmaya yardımcıdırlar. Son zamanlarda çeşitli gıda endüstrilerinde ve evsel atıkların arıtımında alkalın proteaz kullanımı önem kazanmıştır.

Kümes hayvanlarının vücut ağırlığının yaklaşık %5'ini oluşturan atık tüyler, sert keratin yapının parçalanması ile gıda ve yem için yüksek protein kaynağı olarak kabul edilmektedir (Gupta *et al.* 2002). Proteazlar; kıl, boynuz, tırnak, saç gibi atıkları yararlı biyokütle haline dönüştürmektedir. Ayrıca balıkçılıkta da proteazların proteolitik aktivitelerinden yararlanılmaktadır. Balık atık malzemeleri balık ağırlığının %50'sini oluşturmaktadır. Yüzgeç, kemik gibi atıklar imha edilmezse ciddi sorunlar yaratabilirler. Bu nedenle protein, lipid, enzim ve kitin gibi değerli biyomateryallere dönüştürmek için bu atıklar iyi bir kaynak olabilirler (Kandasamy *et al.* 2011).

1.2.4.g. Kozmetik ve ilaç endüstrisi

Alkalın proteazlar, aynı zamanda tıbbi öneme sahip ürünler geliştirmek için de kullanılırlar. Kudrya ve Simonenko (1994) tarafından *B. subtilis* 316M'nin elastolitik aktivitesi açıklandı ve elasteraz enziminin yanık, yatak yaraları, çıban ve derin apseleri

tedavi etmede kullanılabileceğini açıkladılar (Gupta *et al.* 2002). Ayrıca mikrobiyal proteazların tanımlanması ve karakterizasyonu, enfeksiyon hastalıklarındaki patogenezin rolünü anlamının ön koşuludur (Asokan and Jayanthi 2010). Ayrıca proteaz inhibitörü kullanılarak özellikle HIV olmak üzere virüs kaynaklı hastalıkların tedavisi yapılmaktadır (Sevinç 2010).

Kozmetikte proteazlar saç bakım ürünlerinde, diş macunlarında, istenmeyen tüylerden kurtulmak için ve kontak lens solüsyonlarında kullanılmaktadır (Langmaier *et al.* 2002).

1.3. Termofilik bakteriler

Mikroorganizmaların yaşamasal faaliyetlerini etkileyen en önemli çevresel etkenlerden birisi sıcaklıktır. Mikroorganizmaların büyümesi için gereken sıcaklık ile tolerans gösterdiği sıcaklık değerleri birbirinden farklıdır. Termofilik bakterilerin büyük çoğunluğu maksimum sıcaklıklar üzerinde büyüme gösterirler (Brock 2001).

Ekstremofilik organizmalar; halofil, termofil, psikofil, barofil ve asidofil gruplarını içerir. Bunlar arasında termofiller sıcaklık toleransına göre alt gruplara ayrılırlar; fakültatif termofiller optimum 50-65°C'de-en düşük 37°C'de, zorunlu termofiller optimum 65-70°C'de-en düşük 40°C'de, ekstrem termofiller optimum 65°C'de, çoğunluğunu arkelerin oluşturduğu hipertermofiller optimum 80-115°C'de-en düşük 90°C'de büyüme ve gelişme gösterirler (Kikani *et al.* 2010).

Termofilik mikroorganizmalar ilk kez 1888 yılında Miquel tarafından toprak, çöp, akarsu çamurları, drenaj ve kirlere, 1982 yılında ise Stetter tarafından oldukça sıcak olan su ortamından izole edildiler. Bundan sonra yapılan çalışmaların çoğu *B. stearothermophilus* ile gerçekleştirildi ve son zamanlarda, *Bacillus* cinsinden ayrılan çok sayıda yeni organizma literatüre kazandırıldı. Nazina *et al.* (2001) tarafından *B. stearothermophilus* yeniden gruplandırıldı ve *Geobacillus* ailesinin tip türü olarak kabul edildi. Bu güne kadar bu cinse ait 17 tür (*Geobacillus stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius*, *G.*

thermodenitrificans, *G. subterraneus*, *G. uzenensis*, *G. toebii*, *G. lituanicus*, *G. vulcani*, *G. gargensis*, *G. debilis*, *G. tepidamans*, *G. caldxylosilyticus*, *G. jurassicus* and *G. galactosidasius*) tanımladı. Bu cinse ait *Geobacillus pallidus* Minana-Galbis *et al.*(2010) tarafından *Aeribacillus* cinsine dahil edildi ve tip türü olarak kabul edildi (Yanmış and Adıgüzel 2014).

Ekstrem şartlarda yaşamak ve çoğalmak için organizmalar bu ortama adapte olmak zorundadırlar. Termofillerin bu ortamda yaşamlarını sürdürebilmesinin sebeplerinden birisi membranlarında ki doymuş yağ asitleridir. Ayrıca DNA'larında pozitif süper sarmallar oluşturan geri dönüşümü sağlayan ve DNA'nın erime noktasını organizmanın maksimum büyüme sıcaklığına çıkaran DNA giraz ihtiva ederler. Elektrostatik disülfüt köprüsü ve hidrofobik etkileşimleri kullanarak yüksek sıcaklıklara adapte olurlar. Bununla birlikte ATP (adenozintrifosfat), GTP (guanozintrifosfat), NAD (nikotinamid adenin dinükleotid) ve FAD (flavin adenin dinükleotid) gibi yüksek sıcaklıklarda denatüre olan molekülleri, termofil organizmalar kullanacakları zaman üretirler (Çanakçı 2003; Güven 2011).

1.3.1. *Aeribacillus*

Minana-Galbis *et al.* (2010) tarafından *Geobacillus* cinsinden çıkarılarak yeni bir cins olarak literatüre kazandırılan *A. pallidus* cinsi G ve C içeriği, yağ asit ve polar lipid profillerine göre farklılık gösterir. Bu mikroorganizma, termofil, gram pozitif, alkalitolerant, aerop ve çubuk şeklindedir. Eliptik ve silindirik endosporlara sahiptir. Öncül polar lipitler fosfotidilgliserol ve difosfotidilgliseroldür. Katalaz ve oksidaz reaksiyonları pozitifdir (Minana-Galbis *et al.* 2010).

1.3.1.a. *Aeribacillus pallidus*

Cihan *et al.* (2011), yaptıkları çalışma ile Türkiye'nin farklı jeotermal bölgelerinden izole ettikleri *Geobacillus* ve *Aeribacillus* arasındaki filogenetik farklılığı incelemişler. *A. pallidus*'un dairesel krem veya soluk sarı renge koloniler oluşturduğu ve hem

merkezde hemde merkeze yakın endospor formu içerdiği gözlemlendiler. Ayrıca izolatin proteaz ve amilaz aktivitesinin bulunmadığını ifade ettiler.

Yasawong *et al.* (2011), *A. pallidus* TD1 olarak isimlendirdikleri izolatin; hareketli, gram pozitif, aerobik, çubuk şeklinde ve spor form ihtiva ettiği, 0,4 µm çapında 2,0-4,0 µm uzunluğunda, optimum büyüme gösterdiği pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla 7,8,55-60°C olduğunu belirttiler. Bu suşun %10 tuz varlığında büyüebildiğini, G ve C oranının ise %38,9 olduğunu tespit ettiler.

Radchenkova *et al.* (2013), yaptıkları çalışma ile *A. palidus* 418 izolatin iki yeni eksopolisakkariti sentezlendiğini, 0,8-2,5 µm çapında, gram pozitif, spor oluşturan, aerop, nötrofil, çubuk şeklinde hücrelere sahip olduğunu ve 35-72°C sıcaklıkları arasında büyüme gösterdiğini rapor ettiler.

Mnif *et al.* (2013), termofil, gram pozitif, halotolerant ve spor oluşturan bir suş tanımladılar. Bu suşun *A. pallidus* ile %99 benzerlik gösterdiğini rapor ettiler.

Bu tez çalışması kapsamında, *A. pallidus* C10'dan proteaz enzimi saflaştırılmış ve karakterizasyon çalışmaları kapsamında optimum sıcaklık ve pH, stabil sıcaklık ve pH, enzime metal iyonlarının, organik çözücülerin, doğal substratların, deterjan yüzey aktif maddelerin, yükseltgenlerin, inhibitörlerin ve bazı ticari olarak satılan deterjanların etkisi incelendi.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Joo and Chang (2004), bir halotolerant olan *B. clausii* I-52'den endüstriyel öneme sahip alkalın proteaz enzimini saflaştırmışlardır. Enzimi sırasıyla dianyon HPA75, Fenil Sefaroz ve DEAE-Sefaroz kolon kromatografisi tekniklerini kullanarak %79 verimle 10 kat saflaştırmışlar ve molekül kütesinin 28 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin optimum pH'sını 11 ve optimum sıcaklığını 45°C olarak tespit etmişlerdir. K_M değerini 83,9 μmol^{-1} , V_{max} değerini ise 238,6 s^{-1} olarak hesaplanmışlardır. SDS ve H_2O_2 varlığında enzimin kararlı olduğunu rapor etmişlerdir.

Miyaji *et al.* (2005), *B. pumilus* MS-1 bakterisinden, subtilisin benzeri alkalın proteaz enzimi BPP-A'yı saflaştırmışlar ve moleküler olarak karakterize etmişlerdir. Enzimi %13 verimle 5,5 kat saflaştırmışlar ve molekül kütesini SDS-PAGE ile 33 kDa olarak belirlemişlerdir.

Kim *et al.* (2006), *B. subtilis* TP-6'dan fibronolitik subtilisin benzeri alkalın proteaz enzimi saflaştırmışlardır. Enzimi amonyum sülfat, Octyl Sepharose, SP Sepharoz tekniklerini kullanarak %26 verimle 200 kat saflaştırmışlar ve molekül kütesini SDS-PAGE ile 29 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin maksimum aktiviteyi 50°C'de ve pH 7'de gösterdiğini bildirmişlerdir. Enzimi 37°C'de 24 saat farklı tamponlarla muamele etmişler ve stabil pH'yı 6,0-6,5 aralığında olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin; 1 mM PMSF (%53), 1 mM EDTA (%36) ve %10 β -merkaptoetanolda (%46) ile inhibe edildiğini göstermişlerdir. %1 ve %10'luk etanol, metanol ve izopropanol varlığında, enzimin kararlı olduğunu belirtmişlerdir.

Gupta and Khare (2005) tarafından yapılan çalışmada sikloheksanla zenginleştirilmiş topraktan izole ettikleri *Pseudomonas aeruginosa* tarafından salgılanan proteazın hidrofobik organik çözücüler varlığında dikkate değer bir stabilite sergilediğini ve enzimin %25 çözücü konsantrasyonunda 10 gün süreyle aktivitesini muhafaza ettiğini göstermişlerdir. İzole ettikleri bu suştan salgılanan proteazın %75'lik yüksek çözücü

konsantrasyonunda 48 saat kadar dayanabilecek özellikte olduğunu vurgulamışlardır. *Pseudomonas aeruginosa* ve onun ürettiği proteazın su olmayan ortamda biyotransformasyon, atık su arıtımı ve çözücü biyoremediasyonu için uygulama alanına sahip olabileceğini belirtmişlerdir.

Arulami *et al.* (2006) yılında yaptıkları çalışmada *B. laterosporus*-AK1'den termostabil alkalın proteaz enzimini Sephadex G-200 jel filtrasyon ve DEAE selüloz iyon değişim kromatografisi tekniklerini kullanarak %34,3 verimle 11,1 kat saflaştırmışlardır. Saflaştırdıkları enzim maksimum ilgiyi kazein substratına gösterdiği ve enzimin molekül kütlelerinin SDS-PAGE ile 86,29 kDa olduğunu belirlemişlerdir. Enzimin optimum pH'sını 9,0 ve optimum sıcaklığını 75°C olarak bildirmişlerdir. Enzimin aktivitesinin bir serin proteaz inhibitörü olan PMSF tarafından, güçlü bir şekilde inhibe olması ile saflaştırdıkları enzimin bir serin proteaz olduğunu tespit etmişlerdir. Enzim aktivitesi üzerine Ca^{+2} ve Mg^{+2} metal iyonlarının artırıcı etkisi olduğunu belirlemişlerdir. Ticari olarak satılan Ariel deterjanı ile bir saat inkübasyon sonucunda enzimin %75 kararlılığını muhafaza ettiğini bildirmişlerdir. Saf enzim Wheel deterjanının kan lekesi üzerine uygulandığında kan lekesinin çıktığını göstermişlerdir.

Basu *et al.* (2007), yaptıkları çalışmada balık pulu ve balık atıkları üzerinde büyüyen mutant *Aspergillus niger* AB100'un proteaz enzimini ürettiğini gösterip karakterize etmişlerdir. Proteaz enzimin optimum pH'sının 7,0 olduğu ve pH 5,0-9,0 aralığında aktivitesinin %60'dan daha fazla oranda stabil kaldığını rapor etmişlerdir. Enzimin en yüksek aktiviteyi 50°C'de gösterdiği ve 30°C'de bir saat inkübasyon sonunda stabil kaldığını bildirmişlerdir. Enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve CM-Selüloz iyon değişim kromatografisi teknikleri ile %21,5 verimle 26,07 kat saflaştırmışlardır. Enzimin molekül kütlelerini SDS-PAGE ile 30,09 kDa olarak belirlemişlerdir. Saflaştırılan enzimi EDTA güçlü bir şekilde inhibe ettiği için enzimin metalloproteaz olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin metal testinde Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} ve Mn^{+2} ile aktivite olduğunu Hg^{+2} varlığında ise inhibe olduğunu rapor etmişlerdir.

Jaouadi *et al.* (2008), yaptıkları çalışmada *B. pumilis* CBS'den yüksek katalitik etkisi olan alkalın proteaz enzimini saflaştırmışlar ve enzimi moleküler olarak karakterize etmişlerdir. Enzimi saflaştırmışlar, klonlanmışlar, dizilemişler ve buna karşılık gelen geni ifade etmişlerdir. Enzimi tuz çöktürmesi, jel filtrasyon ve HPLC tekniğini kullanarak saflaştırmışlardır. Enzimin molekül kütlelerini MALDI-TOF kütle spektrometresi ile 34598,19 Da olarak belirlemişlerdir. Enzimin PMSF ile tamamen inhibe olduğunu, dolayısıyla enzimin bir serin proteaz olduğunu tespit etmişlerdir. Saflaştırılan enzimin optimum pH'sının 10,6 ve optimum sıcaklığının ise 65°C olarak belirlemişlerdir. Ayrıca enzimin pH 7,0-10,6 arasında ve 30-55°C sıcaklıkları arasında kararlı olduğunu rapor etmişlerdir. Enzimin %5 Tween-80, %1 SDS, %15 üre ve %10 H₂O₂ varlığında 40°C'de 24 saat sonra aktivitesini muhafaza ettiğini belirtmişlerdir. Ca⁺² ve Mg⁺² metalleri enzimin aktivitesini artırırken Mn⁺², Ba⁺², Cu⁺² metallerinin önemli bir etki yapmadığını ve Hg⁺² da ise inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. 0,1 M NaCl'ün enzim aktivitesini kısmen artırdığı 0,5 M NaCl'ün de kısmen azalttığını gözlemlemişlerdir.

Charles *et al.* (2008), yaptıkları çalışma ile *Aspergillus nidulans* HA-10'u alkalın proteaz üretiminde kullanılan çok güçlü bir mantar olarak tanımlamışlardır. Enzimi saflaştırırken sırasıyla amonyum sülfat ve Sephadex G-200 kolon kromatografisi yollarını takip etmişlerdir. Enzimi %39 verimle 42,4 kat saflaştırmışlar ve enzimin molekül ağırlığını SDS-PAGE ile 42 kDa olarak tayin etmişlerdir. Enzimin 50°C'de ve pH 6,0-10,0 arasında stabil olduğunu rapor etmişlerdir. Enzimin PMSF ile tamamen inhibe olmasından dolayı enzimin serin proteaz olduğunu tespit etmişlerdir. Saflaştırılan enzimin kristalizasyonu PEG6000 kullanılarak damla buharı difüzyon metodu ile gerçekleştirmişlerdir.

Haddar *et al.* (2008) yaptıkları çalışma ile, deniz suyu örneğinden izole ettikleri *B. mojavensis* A21'in ağartıcılara karşı kararlı ve hücre dışı alkalın proteaz ürettiğini rapor etmişlerdir. Enzimi saflaştırırken sırasıyla aseton çöktürmesi, Sephadex G-75 jel filtrasyon ve CM-Sepharoz iyon değişim kromatografisi kullanılarak enzimi %16,4 verimle 6,43 kat saflaştırmışlardır. Enzimin molekül kütlelerini, 20 kDa olarak tayin

etmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığını 60°C olarak belirlemişler ve CaCl₂ varlığında enzimin termostabilitesini arttırdığını tespit etmişlerdir. Enzimin en aktif olduğu pH'yi 8,5 olarak tayin etmişlerdir. %0,1 SDS, %1 ve %5 Tween-80, %1 Triton-X-100 varlığında enzimin kararlılığını koruduğunu bildirmişlerdir. Okside edici ve ağartıcı ajanlar ile bir saat inkübasyondan sonra (%1 H₂O₂ ve %0,1 sodyum perborat) kalan aktiviteyi sırasıyla %79 ve %70 olarak bulmuşlardır. Bu yüzden saflaştırdıkları enzimin katı-sıvı deterjanlar için potansiyel uygulanabilir olduğu yorumunu yapmışlardır. Enzimin metal testinde Ca⁺² ve Mg⁺² tarafından aktive olurken, K⁺ ve Na⁺ metallerinin hiçbir etki göstermediğini rapor etmişlerdir. Ticari olarak satılan Ariel, Axion, Dixan, Nadhif ve New Det gibi çamaşır deterjanları ile farklı sıcaklıklarda enzimi bir saat inkübasyona bırakmışlardır. 30 ve 40°C de aktivitelerini muhafaza ettiğini, fakat 50°C'de Axion ve Ariel'de enzimin başlangıçtaki aktivitesinin %80'nini koruduğunu, Nadhif ve New Det'de ise aktivitesinin %75'ini kaybettiğini bildirmişlerdir.

Rao *et al.* (2008), *B. circulans*'dan izole etikleri alkalın proteazın deterjan ve deri endüstrisinde uygulanabilirliğini göstermek, enzimin çevre dostu ve dayanıklılığı üzerine çalışmışlardır. Enzimin molekül kütlesini SDS-PAGE ile 39,5 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve Sephadex G-100 ile iki basamakta %20 verimle 11,9 kat saflaştırmışlardır. Enzimin optimum pH'sını 11 ve optimum sıcaklığını ise 70°C olarak bulmuşlardır. K_M değerini 0,597 mg ml⁻¹, V_{max} değerini 13825 µmol.min⁻¹ olarak hesaplamışlardır. Metal testinde Ca⁺², Mg⁺², Mn⁺² ve Na⁺ metallerinin enzim aktivitesini arttırdığını tespit etmişlerdir. Enzim %1 Triton-X-100 ve Tween-20 varlığında sırasıyla %15 ve %20 aktivitesini artırdığı, %1 SDS varlığında aktivitesinin %75'ini muhafaza ettiğini ve %1 H₂O₂ varlığında inhibisyon gözlemlenmediğini bildirmişlerdir. Kan lekesi ve deri üzerinde yaptıkları uygulamalı çalışma ile kimyasal kullanmadan lifli proteinler hidroliz olmadan leke çıkarma ve deri işleme sürecini göstermişlerdir.

Rai and Mukherjee (2008), yaptıkları çalışmada *B. subtilis* DM-04'den alkalın proteaz enzimini, zwitter iyon formunda katyon ve anyon iyon değiştirici kromatografisi, etanol çöktürmesi ve HPLC tekniklerini kullanarak 23,5 kat saflaştırmışlar ve enzimin molekül

kütlesini 16,9 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığını 45°C’de ve optimum pH’sını 10,0 olarak rapor etmişlerdir. Saflaştırılan enzimin kazein substrat olarak kullanıldığında K_M değerini 59 μM ve V_{max} değerini 336 $\mu\text{g min}^{-1}$ olarak hesaplamışlardır. Enzimin 40 mM SDS, %1 Triton-X-100, Tween-20, Tween-80 ve 6M üre varlığında aktivitesini muhafaza ettiğini bildirmişlerdir. Yaptıkları uygulama çalışmaları ile saflaştırdıkları enzimin iyi bir leke çıkarıcı ve deri işlemede oldukça etkili olduğunu tespit ederek endüstriyel uygulamalarda kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Divakar *et al.* (2010), endüstriyel atıklardan izole ettikleri *Aeromonas veronii* PG01’den termostabil, hücre dışı ve organik çözücülere karşı dayanıklı proteaz enzimini saflaştırmışlar ve karakterize etmişlerdir. Enzim sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel permeasyon (GPC) teknikleri kullanılarak %32 verimle 53 kat saflaştırmışlardır. GPC-HPLC ile belirlenen molekül kütlesi 67 kDa olarak tespit edilirken SDS-PAGE ile 33 kDa olarak iki alt birime sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin pH 6,0-10,0 arasında stabil kaldığını ve optimum pH’sını 7,5 olduğunu gözlemlemişlerdir. Saflaştırılan proteaz için optimum sıcaklığı 60°C olarak belirlemişler ve enzimin 50-60°C sıcaklıklarında bir saat inkübasyondan sonra aktif kaldığını tespit etmişlerdir. Enzimin DMSO, metanol, benzende oldukça karalı olduğunu n-hekzan ve n-dodekanın sırasıyla enzim aktivitesini 1,3 ve 1,5 kat artırdığını belirlemişlerdir. Enzim üzerine Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} metallerinin aktiviteyi artırıcı, Hg^{+2} ve Zn^{+2} metallerinin ise inhibe edici etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca enzimin yüzey aktif maddelere ve okside edici ajanlara karşı aktif ve kararlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Cihan *et al.* (2011), yaptıkları çalışmada, Türkiye’nin farklı jeotermal bölgelerinden izole ettikleri *Geobacillus* ve *Aeribacillus* cinslerine ait izolatların filogenetik çeşitliliklerini araştırmışlardır. Türkiye’de 31 cins termofilik *Bacillus* sp. tanımlanmış ve bunların 27’si *Geobacillus*, 4’ünün *Aeribacillus*’a ait olduğunu belirlemişlerdir. Yaptıkları analizde *A. pallidus*’un amilaz ve proteaz aktivitesinin olmadığını rapor etmişlerdir.

Deepti *et al.* (2011), haloalkalin, termoaktif, organik çözücülerde kararlı proteaz üretebilen *Bacillus* sp. SM2014 suşunu tanımlanmışlardır. Enzimi amonyum sülfat, diyaliz ve Sephadex jel filtrasyon ile %54 verimle 64 kat saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin molekül kütleini 71 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin en iyi aktiviteyi pH 10'da, 60°C'de ve 3 M tuz varlığında gösterdiğini tespit etmişlerdir. Enzim için K_M değerini 0,57 mg/ml ve V_{max} değerini ise 445,23 U/ml olarak hesaplamışlardır. Aseton, toluen, benzen, DMSO, bütanol, n-dekan, hekzan, n-heptan, ksilan ve izooktanın %15 ve %25'lik konsantrasyonlarda 15 gün boyunca kararlılıklarını muhafaza ettiklerini ve %50 konsantrasyonlarda ise 192 saat sonra n-dekan, hekzan ve n-heptan varlığında enzim aktivitesinde bir değişiklik gözlenmezken diğer organik çözücüler varlığında ise enzim aktivitesinde azalma olduğunu belirtmişlerdir. %50'lik konsantrasyonlarda enzimin kararlı olmasından dolayı, peptid sentezinde bu enzimin kullanılabilceği yorumuna varmışlardır. Enzimin yıkama performans testinde deterjan içeriği ve sürfaktanlar ile uyumluluğu sayesinde çamaşır deterjan endüstrisinde uygulanabilirliğini doğrulamışlardır.

Kandasamy *et al.* (2011) yaptıkları çalışmada, balık viseral atıklarından izole ettikleri *Pseudomonas fluorescens* tarafından üretilen proteazın, deri işleme sürecinde kullanımını göstermişlerdir. Enzim için optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 10,5 ve 40°C olarak tayin etmişlerdir. Ham proteazın keçi derisinden kireç ve sodyum sülfat kullanmadan kıl ayırma işlemini gerçekleştirdiğini göstermişlerdir. Sonuç elektron mikroskobu ile incelenmiş ve deri işleme sürecinde enzimlerin kullanılmasının daha iyi olduğunu rapor etmişlerdir. Zehirli kimyasallar yerine biyolojik doğal atıklardan türetilen doğal kaynaklar kullanılarak deri işleme sürecinin daha temiz ve bir süreç olmasının mümkün olacağı yorumuna varmışlardır

Joshi and Satyanarayana (2012), alkalifilik bir bakteri olan *B. lehensis*'den alkalın proteaz enzimini klonlamışlardır. Bu alkalın proteazın 27 aminoasiti salgılama, 83 amino asiti prosequense, 269 aminoasiti olgun alkalin proteazı şifreleyen subtilisin S8 ailesine ait olduğunu belirlemişler ve ilgili gen bölgesini belirlemişlerdir. Rekombinant alkalin proteazın molekül kütleini 39 kDa olarak tayin etmişlerdir. Rekombinat

enzimin pH 8,0-12,0 aralığında ve sıcaklık olarak 30-60°C arasında aktif olduğunu tespit etmişlerdir. Doğal alkalin proteaz ile rekombinant alkalin proteazı karşılaştırdıklarında enzimin sıcaklığa toleransının arttığını ve spesifik aktivitenin yükseldiğini belirtmişlerdir. Enzimin metal testinde Ca^{+2} ve Co^{+2} metallerinin enzimi aktive ettiği, Hg^{+2} metalinin ise inhibe ettiğini göstermişlerdir. Enzim %5'lik organik çözücülerde metanol tarafından aktive olurken diğerlerinde oldukça kararlı olduğunu bildirmişlerdir. Buna ilaveten %10'luk organik çözücülerde etanol, metanol, etilen glikol, izopropanol ve gliserolün enzimi aktive ettiğianca bütanol, kloroform, benzen ve toluenin ise inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Yüzey aktif maddeler ve okside edici ajanlar varlığında da enzimin dayanıklı olduğunu göstermişlerdir. *B. lehensis*'den izole edilen proteazın sentezinden sorumlu gen *Escherichia coli*'ye klonlandığında proteaz üretiminin 4 kat arttığını göstermişlerdir. Ayrıca yaptıkları uygulama çalışmaları ile X-ray/fotoğrafik flimlerden gümüşün geri kazanımını sağlayarak bu süreçte enzimin kullanılabilceği yorumuna varmışlardır.

Annamalai *et al.* (2012) yaptıkları çalışmada, deniz tortularından izole edilen *B. halodurans* CAS6'dan termostabil, haloalkalin ve organik çözücülere karşı dayanıklı proteaz enzimi saflaştırmışlardır. Proteaz üretimi için optimum kültür koşullarını belirlemişlerdir. Enzimin 70°C sıcaklıkta, pH 10,0'da ve %30 tuz varlığında bir saat inkübasyon sonrasında aktivitesini muhafaza ettiğini tespit etmişlerdir. Enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE iyon değişim kromatografisi ve Sephadax G-50 kromatografisini kullanarak %12,6 ile 7,96 kat saflaştırmışlardır. Enzimin molekül kütlesini 28 kDa olarak tayin etmişlerdir. %0,5 konsantrasyonunda organik çözücülerde 50°C sıcaklıkta dört saat sonunda ksilen ve hekzanın enzimi aktive ettiğini izopropanol ve benzen de ise kararlı olduğunu belirlemişlerdir. Yüzey aktif maddeleri ve ticari deterjanların %1'lik konsantrasyonlarında enzimin aktivitesinde kararlılık gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Raut *et al.* (2012), deniz suyundan izole ettikleri *Saccharopolyspora* sp. A9'dan organik çözücülerde ve deterjanlarda kararlı proteaz enzimini sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE iyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-200 jel filtrasyon ile

%20 verimle 23,28 kat saflaştırmışlardır. Enzimin molekül kütlesini 32 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin optimum pH'sı 10,0 ve pH 8,0-12,0 arasında kararlı olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı zamanda enzimin 70-80°C sıcaklıklarında kararlı olmasına enzimin termostabil olduğu yorumunu yapmışlardır. Enzimin metal testinde Mg^{+2} ve Co^{+2} metallerinin enzimi aktive ettiğini rapor etmişlerdir. Enzim PMSF ile tamamen inhibe olduğu için serin proteaz ailesine ait olduğunu bildirmişlerdir. Eksizyon yaralarda yaranın iyileşme yeteneğini ölçmüşler ve elde etikleri enzimin yara iyileştirici özellikte olduğunu uygulama ile göstermişlerdir.

Jayakumar *et al.* (2012) *B. pumilus* MCAS8 'den izole ettikleri proteazı, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile %44,3 verimle %1,9 kat saflaştırmışlardır. Enzimin optimum pH'sını 9,0 ve stabil pH'sını 6,0-11,0 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığını 60°C olarak tayin etmişler ve enzimin 20-70°C sıcaklıkları arasında kararlı olduğunu da rapor etmişlerdir. Enzimin molekül kütlesini 36 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin Ba^{+2} , Ca^{+2} ve Mg^{+2} metallerin varlığında aktive olduğunu, Fe^{+2} , Zn^{+2} , Sr^{+2} ve Hg^{+2} metallerin varlığında ise inhibe olduğunu bildirmişlerdir. %5'lik DMSO ve aseton varlığında bir saat inkübasyondan sonra enzimin başlangıçtaki aktivitesini %50 oranında muhafaza ettiğini rapor etmişlerdir. Enzimin yıkama performans analizinde, pamuklu kumaştaki kan lekesini çıkardığı için deterjan katkı maddesi olarak kullanılabilineceği yorumuna varmışlardır. Enzimin aynı zamanda keçi derisinden kıl ayırma işleminde de oldukça başarılı olduğunu göstermişlerdir.

Pandey *et al.* (2012), yaptıkları çalışma ile Hindistan kıyı Gujarat'dan izole ettikleri *Oceanobacillus* sp. (GQ162111)'da organik çözücüler varlığında alkalın proteaz enziminin salgılandığını göstermişlerdir. %30 konsantrasyonlarda hekzan, heptan, izooktan, dodekan ve dekan gibi organik çözücüler varlığında önemli derecede organizmanın büyüdüğü ve proteaz enzimi ürettiğini kanıtlamışlardır. Enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve Fenil Sepharoz 6FF ile %28 verimle %27,83 kat saflaştırmışlardır. Enzimin molekül kütlesini 30 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığının 50°C olduğunu ve %10 izooktan varlığında aktivitesini %70 muhafaza

ettiğini bildirmişlerdir. Organik çözücü içinde enzimin pH 8,0-11,0 aralığında aktif olduğunu ve en iyi aktiviteyi pH 10'da gösterdiğini rapor etmişlerdir. 2-3 M tuz varlığında 18 saat sonunda enzimin stabilitesini koruduğunu göstermişlerdir.

Anbu (2013), Güney Kore'de deterjan atıklarından izole ettikleri *B. koreensis* (BK-P21A) olarak tanımladıkları toplam 18 proteaz üreten suşun morfolojik, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Organizmanın büyüme ve proteaz üretim koşullarını optimize etmişlerdir. Enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, Superdex 200 10/300 ve Superdex 75 10/300 GL kromatografik teknikleri kullanılarak %23 verimle 5 kat saflaştırmışlardır. Enzimin molekül kütleini 48 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin optimum pH'sını 9,0 ve optimum sıcaklığını 60°C olarak tayin etmişlerdir. Enzimin Ca^{+2} ve Co^{+2} metalleri ile aktive olduğu göstermişlerdir. Enzimin %1 H_2O_2 varlığında %81 aktivitesini muhafaza ettiğini vurgulamışlardır. Ayrıca enzimin hidrofilik organik çözücülerde oldukça aktif ve kararlı olduğunu rapor etmişlerdir.

Wang *et al.* (2013) yaptıkları çalışma ile, *B. amyloliquefaciens* SYB-001'den nötral metallo proteaz enzimi saflaştırmışlardır. Enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim, hidrofobik etkileşim ve jel filtrasyon kromatografisi tekniklerini kullanarak 4 basamakta 5,6 kat saflaştırmışlardır. Enzimin molekül kütleini 36,8 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin en yüksek aktiviteyi pH 7,0'de ve 50°C'de gösterdiğini bulmuşlardır. Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} gibi metallerin enzimi aktive ettiğini göstermişlerdir. Enzim EDTA tarafından tamamen inhibe olduğu için enzimin metallo proteaz olduğunu tespit etmişlerdir.

Nam *et al.* (2013), Kore ginseng rizosferde izole edilen *Serratia marcescens* S3-R1 suşundan alkalın proteaz enzimini saflaştırmışlardır. Enzimi 3 aşamada amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE anyon değişim kromatografisi, Mono Q kromatografisi ile 5,8 kat saflaştırmışlar ve tek bant için dördüncü aşama olarak sıvı kromatografisini kullanmışlardır. Enzimin molekül kütleini 50,3 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin en yüksek aktiviteyi 40°C ve pH 7,0-9,0 arasında gösterdiğini bildirmişlerdir. Enzimin

N-terminal ucundaki aminoasitleri Ala-Val-Thr-Ile-Glu-Asp-Ala-Val-Asp-Asp olarak belirlemişler ve enzimin bir metallo proteaz olduğuna bildirmişlerdir.

Papgianni and Sergedilis (2014) yaptıkları çalışmada, *Penicillium nalgiovense* PNA9'dan yeni bir alkalın proteaz enzimini saflaştırmışlardır. Enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve ultrafiltrasyon ile 12,1 kat saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin moleköl kütlesini 45,2 kDa olarak tayin etmişlerdir. Enzimin 10-45°C sıcaklıkları arasında, pH 4,0-10,0 aralığında ve 0-3 M tuz varlığında aktif olduğunu fakat maksimum aktiviteyi 35°C'de, pH 8,0'de ve 0,25 M tuz varlığında gösterdiğini rapor etmişlerdir. 5 mM Mn^{+2} ve Zn^{+2} metalleri ve %0,5 SDS varlığında enzimin inhibe olduğunu belirtmişlerdir. Enzimin PMSF ile inhibe olmasından dolayı serin proteaz olduğunu tespit etmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan organizma

Tez çalışmasında Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL (Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü) tarafından izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilen *Aeribacillus pallidus* C10 bakterisi kullanılmıştır (Yanmış and Adıgüzel 2014).

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar şunlardır: Tris, kazein, amonyum sülfat, folin reaktörü, akrilamid bisakrilamid, N,N,N',N'-Tetra metilenetilen diamin (TEMED), Etilen daimin tetra asetik asit (EDTA), SDS, Triton-X-100, Tween-80, amonyum persülfat (PER), DTNB, PMSF, β -merkaptoetanol, hidrojen peroksit, metanol, aseton, izopropanol, formaldehit, DMSO, imidazol (Sigma), sodyum karbonat, Commanse Brilliant Blue G-250, sodyum fosfat, bütanol, glisin, bromtimol mavisi, BSA, potasyum, kalsiyum, magnezyum, kobalt, mangan, nikel metalllerinin klorlu tuzları (Merck), TCA, Tween-20 (Riedel de Haen) sodyum asetat, kloroform (Carlo Erba), ProbondTM Nickel Chelating Resin (invitrogen).

3.1.3. Kullanılan cihaz ve ekipmanlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır:

- Steril Kabin (Telstar AV -100)
- Spektrofotometre (Beckman Coulter DU'730 Life science UV/V is spectrophotometer)
- Santrifüj (Hettich)

- Magnetik Karıştırıcı (Stirrer HS31)
- Etüv (Termo Scientific Heraus Incubator)
- Vorteks (WiseMix)
- Çalkalayıcı (Midii Dual 14)
- İnkübatör (Sanyo)
- Deep-Freeze (Harris, -20 °C)
- Hassas Terazi (Geg, Avery)
- Otoklav (Hiclave Hv-50L)
- Su Banyosu (Grant 6G)
- Sterilizatör (Heraus)
- pH metre (Metler Toledo)
- Kar makinesi (Scotsman AF-20)
- Saf su cihazı (Bamstead Pure Easy)
- Peristaltik pompa (Ismatec)
- Elektroforez tankı (Biorad (dikey))
- Güç kaynağı (1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus Corporation EC 135)
- Buzdolabı (Siemens)

3.2. Yöntem

3.2.1. Petride proteaz aktivitesinin belirlenmesi

A. pallidus C10 suşundan bir lup bakteri alınarak nutrient broth besi ortamına inoküle edildi ve 56°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Daha sonra Skim milk agar besiyerine bu sıvı kültüründen agar wel difüzyon metodu kullanılarak ekim yapıldı ve petri 56°C'ye ayarlı inkübatörde 24 saat süreyle bekletildi (Panda *et al.* 2013).

3.2.2. Alkalin proteaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi

Proteaz aktivitesi Takami *et al.* (1989), tarafından uygulanan kazeinin substrat olarak kullanıldığı yöntemin modifiye edilmesi ile belirlendi. 0,5 ml enzim çözeltisi üzerine 100 mM pH'sı 8,5 olan Tris-HCl tampon çözeltisinde hazırlanan %0,65'lik kazein çözeltisinden 2,5 ml eklenerek reaksiyon çözeltisi 37°C'de ve 10 dakika süre ile inkübasyona bırakıldı. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 100 mM pH 8,5 Tris-HCl tampon çözeltisi ilave edilen reaksiyon karışımı kullanıldı. İnkübasyon sonunda reaksiyon karışımlarına 110 mM trikloroasetik asit (TCA) çözeltisinden 2,5 ml ilave edilerek reaksiyonun sonlanması sağlandı. Bu karışım, 37°C'de ve 30 dakika boyunca su banyosunda bekledikten sonra 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantın 1 ml'sine 0,5 M Na₂CO₃ çözeltisinden 2,5 ml ve 0,5 M Folin-Ciocalteu reaktifinden 0,5 ml eklenerek, karışım 37°C'de 30 dakika bekletildikten sonra 660 nm'de spektrofotometrik olarak absorbans köre karşı ölçüldü. Enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı **Ek 1**'de gösterilmiştir. Enzim aktivitesi önceden oluşturulmuş tirozin standart grafiğinin eğimi kullanılarak aşağıda verilen formül ile hesaplandı:

$$\text{Proteaz Aktivitesi (EU/ml)} = \frac{(\text{A660/Eğim}) \times \text{Toplam Hacim}}{\text{Enzim Hacmi} \times \text{İnkübasyon Süresi}} \times \text{Seyreltme Faktörü}$$

Bir ünite proteaz aktivitesi, 37°C'de, pH 8,5'da gerçekleşen hidroliz reaksiyonunda %0,65 kazeinden 1 µg/dak tirozin oluşturan enzim miktarı olarak ifade edildi (Takami *et al.* 1989).

3.2.3. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması

Proteaz enzimin aktivitesinin hesaplamasında kullanılacak olan tirozin standart grafiğinin oluşturulması için 100 mM pH 8,5 Tris-HCl tamponu ile 1 mg/ml tirozin çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu stok çözeltilerden 10, 20, 30, 40, 50 µl hacimlerde tüplere alındı ve her bir tüp 100 mM pH 8,5 Tris-HCl tamponu ile 0,5 ml'ye

tamamlandı. Farklı miktarlarda tirozin içeren çözeltilerden 0,5 ml temiz tüplere alınarak üzerine 0,5 M Na₂CO₃ çözeltisinden 2,5 ml ve 0,5 M Folin reaktifinden 0,5 ml ilave edildi. Bu karışım, 37°C’de ve 30 dakika bekletilip spektrofotometrede köre karşı 660 nm’de absorbans değerleri ölçüldü. Kör olarak 0 µg/ml tirozin içeren 100 mM pH 8,5 Tris-HCl tamponu kullanıldı. Elde edilen sonuçlara göre 660 nm’deki absorbans değerinde meydana gelen değişimi gösteren tirozin standart grafiği çizildi. Çizilen tirozin standart grafiğindeki doğrunun eğimi belirlenerek alkalın proteaz enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanıldı (Takami *et al.* 1989).

3.2.4. Protein tayini

3.2.4.a. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm’de proteinlerin yapısında bulunan triptofan, fenilalanin ve tirozin aminoasitlerinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Bu özellikten yararlanılarak örnekteki protein miktarının yaklaşık olarak bulunmasını temel alan hızlı bir yöntemdir. Kromatografi işlemlerinin ardından eşit hacimlerde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvartz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometrede köre (100 mM Tris-HCl pH 8,5) karşı okundu.

3.2.4.b. Bradford yöntemiyle protein tayini

Bu yöntem, proteine coomassie brilliant blue G-250’nin bağlanması esasına dayanır. Bu yöntemde kullanılan boya negatif yüke sahip olup, protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Oluşan kompleks 595 nm’de maksimum absorbans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Protein–boya kompleksi, çözeltilerde uzun süre kalır. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşmesini sağlar. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Protein miktarını belirlemek amacıyla standart grafiğin hazırlanması için, 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden ayrı tüplere sırayla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alınarak, saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı. Tüpteki karışımlara 5 ml renklendirme reaktifi ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 ml aynı tampon ve 5 ml renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Protein tayini yapılan numuneler için aynı yöntem uygulandı ve standart grafikten miktar tayini yapıldı.

Numune çalışmaları için; homojenat, amonyum sülfat çökelti numunesi, diyaliz sonrası ve iyon değişim kromatografisinden elde edilen saflaştırılmış enzim çözeltileri için ayrı ayrı tüplere sırasıyla 0,1 ml konularak üzerlerine 4,9'er ml renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakılıp, sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu.

3.2.5. Homojenat hazırlanması

A. pallidus C10'un hücre izolatları 5000 rpm de 10 dakika süreyle santrifüj edildi ve çökelek uzaklaştırıldı. Böylece homojenat elde edildi (Divakar *et al.* 2010).

3.2.6. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Yüksek tuz konsantrasyonlarında proteinlerin çözünürlüğü azalır ve proteinler çöker (salting-out). Bunun nedeni ortamdaki konsantre iyonların, protein etrafındaki hidrat kılıfını kendilerine doğru çekmesidir. Yüksek iyonik şiddet oluşturması ve çözünürlüğün yüksek olmasından dolayı amonyum sülfat en çok kullanılan tuzdur. Her proteinin çöktüğü nötral tuz konsantrasyonu farklı olduğu için bu methodla proteinler birbirinden kısmi olarak ayrıştırılabilir. Yapılan amonyum sülfat çöktürmesi deneyleri, proteinlerin bu özellikleri esasına dayanmaktadır.

Amonyum sülfat çöktürmesi için;

Katı amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formülden hesaplandı:

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V : Enzim çözeltisinin hacmi

S_1 : 1'in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S_2 : 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

Homojenatta, %0-20, %20-40, %40-60, %60-80, %80-90 aralıklarında ayrı ayrı amonyum sülfat çöktürmeleri yapıldı. Yapılan amonyum sülfat çöktürmesinin her aralığında çökeltide ve süpernatantta aktivite ölçümü yapılarak enzimin aktif olduğu aralık belirlendi. Enzim aktivitesinin çökelekte en fazla olduğu aralık enzimin amonyum sülfat doygunluk aralığı olarak kabul edildi. Bundan sonra çöktürme işlemi belirlenen aralıkta yapıldı. Bütün bu işlemler +4°C'de buzun üzerinde gerçekleştirildi. Her defasında homojenatlar 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlar ayrı behere alındı, çökelekler çözülebilecek kadar 100 mM Tris-HCl pH'sı 8,5 olan tampon ile çözüldü. Daha sonra hem süpernatantta hem de çökelekte ayrı ayrı enzim aktivitesine bakıldı (Ravindran *et al.* 2011).

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirildi, 100 mM Tris-HCl pH 8,5 olan tamponda 2-3 saat süreyle diyaliz edildi. Diyaliz işlemi magnetik karıştırıcı üzerinde +4°C'de gerçekleştirildi, daha sonra protein ve aktivite tayini yapıldı (Ravindran *et al.* 2011).

3.2.7. DE52 anyon değişim kromatografisi

Bu çalışmada DE52 anyon değişim kromatografisinde kullanılan kolon dolgu materyali hazır olarak satın alındı. 10 gr DE52 kolon materyalinden tartılıp, behere konuldu ve

üzerine pH'sı 7,8 olan 200 mM Tris-HCl başlangıç çözeltisi dediğimiz tampondan 150 ml ilave edildi. Hafif hızdaki karıştırıcıda homojen hale getirildikten sonra karışımın pH'sı 7,8'e ayarlandı. Jelin dibe çökmesi beklendi ve süpernatant dekante edildi. Başlangıç çözeltisinde 150 ml eklenerek tekrar jelin dibe çökmesi beklenildi ve supernatant dekante edildi. Bu olay üç kere tekrar edildi ve son seferde üzerinde biraz tampon bırakıldı. Karıştırılmış jel çözeltisi, içerisinde pH'sı 8,5 olan 50 mM Tris-HCl dengeleme tamponu varken kolona dökülerek yerçekimine karşı jelin yatak hacmi sabit kalana kadar bu şekilde kolon paketlenildi. Daha sonra saatte 45 ml akacak şekilde peristaltik pompa ile kolon akış hızı sabitlenerek kolonun dengelenme tamponu ile dengelenmesi sağlandı. Jel üzerindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirilerek diyalizden elde edilen 10 ml homojenat pipet vasıtasıyla dikkatli bir şekilde kolona tatbik edildi. Daha sonra dengeleme tamponu ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemine, üstten ilave edilen yıkama tamponununun 280 nm'deki absorbans değerlerinin kolonun altından alınan elüatların 280 nm'deki absorbans değerleri eşit oluncaya kadar devam edildi. Yıkama tamamlandıktan sonra 50-500 mM NaCl içeren 50 mM pH'sı 8,5 olan Tris-HCl ile artan iyonik şiddetli lineer gradient elüsyonu uygulandı. Elüatlar kolondan 5 ml halinde tüplere alındı ve her bir elüatın 280 nm'de absorbans ölçümü yapılarak absorbans gösteren tüplerde bölüm 3.2.2'de belirtildiği gibi aktivite tayini yapıldı. Aktivite tayini yapılan elüat çözeltileri için kantitatif protein tayini yapıldı. Son aşama olarak spesifik aktivite hesaplandı ve saflaştırma oranı belirlendi (Romero *et al.* 2001; Thangam and Rajkumar 2002). Kullanılan tamponların hazırlanışı **EK 2**'de anlatılmıştır.

3.2.8. Probond™ afinite kromatografisi

3.2.8.a. Probond™ kolonun hazırlanması

Proteaz enzimini ikinci bir saflaştırma işlemi uygulayarak histidin aminoasitlerini tutan Probond™ afinite kromatografisi kullanıldı. Öncelikle kolon materyali hazırlandı. Bu işlem için; 10 ml'lik saflaştırma kolonuna 2 ml nikel şelatlayıcı reçine döküldü ve yer çekimine karşı kolona yerleşimi sağlandı. Sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı.

Sonra 6 ml steril distile su ilave edilip reçine ters çevrilerek yeniden süspansiyon edildi. Reçinenin yer çekimi ile kolona yerleşimi sağlandıktan sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. Doğal şartlar altında saflaştırma için 6 ml 'doğal bağlanma tamponu' ilave edildi. Reçine ters çevrilerek yeniden süspansiyon edildi. Reçinenin yer çekimi ile kolona yerleşimi sağlandıktan sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. Son işlem tekrar edildi.

3.2.8.b. Numunenin kolona yüklenmesi

%0-90 amonyum sülfat çöktürmesi yapıp 2 saat boyunca tamponda diyalize bırakılan örnek kolona yüklendi. Numunenin kolona iyice tutunması için yavaşça çalkalama ile 180 dk bağlanması sağlandı. Reçinenin yer çekimi ile kolona yerleşimi sağlandıktan sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. 8 ml 'doğal yıkama tamponu' ile yıkama yapıldı. Reçinenin yer çekimi ile kolona yerleşimi sağlandıktan sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi 3-4 kez tekrarlandı. Dik pozisyonda kelepçe ile bağlanan kolonun alt uçtaki kapağı çıkarılarak 8-12 ml 'doğal elüsyon tamponu' ile protein elüe edilip, diyaliz işleminden sonra SDS-PAGE ile analiz edildi. Probond™ afinite kolonu için gereken doğal bağlanma tamponu, doğal yıkama tamponu, doğal elüsyon tamponunun hazırlanışı **EK 2**'de anlatılmıştır.

3.2.9. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü ve enzimin molekül kütlesinin tayini

Saflaştırılan enzimin saflık derecesi ve molekül kütlesi %3-10 kesikli sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak kontrol edildi. Bunun için, elektroforez plakaları önce su ve daha sonra alkol ile iyice yıkandı. İki cam plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, jel hazırlama kabineye konuldu. Daha sonra ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Hava kabarcıklarının oluşmasını engellenmek için izopropanol plaklardan taşınmaya kadar döküldü. Jelin donması için yarım saat beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra

jelin üstündeki izopropanol uzaklaştırıldı. Ardından yığıma jeli hazırlandı. Ayırma jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığıma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu, enzim örnekleri 9 µl ve yükleme tamponu da 9 µl olacak şekilde 1/1 oranında katıldı. Sonra numuneler beş dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Öncelikle markır 1µl ilk kuyucuğa yüklendi. 18 µl örneklerde diğer kuyucuklara yerleştirildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anota, üst taraftan ise (-) katota yerleştirildi. Önce 60 voltta 30 dakika yürütüldü ve akrilamid yoğunluğunun düşük olması ve pH 6,8 olduğundan dolayı örnekler hızlı şekilde ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra akım 120 volt'a çıkartılarak numuneler jelin alt sınırına gelinceye kadar yürütüldü. Ayırma jelinde akrilamid yoğunluğunun fazla olması ve pH 8,8 olduğundan dolayı proteinler yavaş yürüyerek molekül kütesine göre ayrılacaklardır. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisini yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Daha sonra gümüş boyama yapıldı. Boyama işleminin sonunda bantlar belirginleştğinde fotoğraf çekildi (Laemmli 1970). SDS-PAGE jel elektroforezinde ve gümüş boyamada kullanılan çözeltilerin hazırlanışı **Ek 3**'de anlatılmıştır.

3.2.10. Alkalın proteaz enziminin zimogram analizi

A. pallidus C10'dan üretilen alkalın proteaz enziminin zimogramı için, SDS-PAGE jel elektroforezi kullanıldı. Öncelikle yığıma ve ayırma jeli hazırlandı ve elektroforez tankına döküldü. Kuyucuklara yüklenmek üzere %0,65'lik kazein katılan yükleme tamponu ve enzim çözeltisi (1:1:1) karıştırıldı. Bu karışım kaynatma işlemi olmadan direk kuyucuklara yüklendi. Elektroforez sisteminde önce 60 voltta 30 dakika ardından voltu 120'e çıkararak numunelerin jelin alt sınırına kadar yürütülmesi sağlandı. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisini yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel

dikkatlice çıkarıldı. Çıkarılan jelden SDS'nin uzaklaştırılması için %2'lik Triton-X-100 çözeltisinde 37°C 150 rpm hızındaki çalkalayıcıda 30 dakika bekletildi. Ardından jel ikinci basamak olarak 100 mM Tris-HCl pH'sı 8,5 olan tamponda 37°C 150 rpm hızındaki çalkalayıcıda 20 dakika bekletildi. Sonrasında jel, %0,65'lik kazein çözeltisinde 37°C 150 rpm hızındaki çalkalayıcıda 30 dakika bekletildi ve süre bitiminde gümüş boyama yapılarak jelin fotoğrafı çekildi (Kazan *et al.* 2005).

3.2.11. Proteaz enzimiyle ilgili yapılan karakterizasyon çalışmaları

3.2.11.a. Alkalın proteaz enzimi için optimum pH ve stabil pH bulunmasına yönelik çalışmalar

A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla 0,5 ml enzim çözeltisi ile 0,1 M farklı pH değerlerindeki sodyum fosfat (pH 6,0–8,0), Tris-HCl (pH 7,0–9,0) ve Glisin-NaOH (pH 9,0–11,0) tampon çözeltilerinde hazırlanan 2,5 ml %0,65'lik kazein karıştırıldı. Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi aktivite tayini yapıldı (Haddar *et al.* 2008; Ravindran *et al.* 2011). Enzimin pH profilinin grafik çiziminde en yüksek aktivitenin gözlemlendiği pH değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar ona göre bağlı aktivite (%) cinsinden birbiriyle kıyaslandı.

Enzimin stabil olduğu pH'yı tesbit etmek için sodyum fosfat (pH 6,0–8,0), Tris-HCl (pH 7,0–9,0) ve glisin-NaOH (pH 9,0–11,0) tamponları kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki 2 ml tampon çözeltisine ile 2 ml enzim çözeltisi ilave edilerek oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon öncesinde ve sonrasında bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi aktivite tayini yapıldı. Enzimin pH stabilitesi grafiğinin çiziminde, farklı pH değerlerinde, inkübasyondan önceki aktivite miktarı 100 olarak kabul edilerek inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi (%) olarak ifade edildi (Rahman *et al.* 2006; Venugapol and Saramma 2007).

3.2.11.b. Alkalın proteaz enzimi için optimum sıcaklığın ve stabil sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar

A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 0,5 ml enzim çözeltisi ile 100 mM pH 8,5 Tris-HCl tamponunda hazırlanan %0,65'lik kazein çözeltisinin 2,5 ml'si karıştırıldı ve 20°C'den 80°C'ye kadar olan sıcaklık aralığında 10 dakika süreyle su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası her bir sıcaklık değeri için bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi aktivite tayini yapıldı (Rahman *et al.* 2006). Enzimin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen grafikte en yüksek aktivitenin gözlemlendiği sıcaklık değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar ona göre bağlı aktivite (%) cinsinden birbiriyle kıyaslandı.

Enzimin sıcaklık stabilitesini belirlemek için; 1,5 ml enzim çözeltisi 20°C'den 80°C'ye kadar olan sıcaklık aralığında her bir sıcaklık için 15, 30 ve 60 dk'lık sürelerin sonunda bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi aktivite tayini yapıldı (Venugopal and Saramma 2007; Rao *et al.* 2008). Enzim sıcaklık kararlılığını gösteren grafiğinin çiziminde, farklı sıcaklık değerlerinde, inkübasyondan önceki aktivite miktarı 100 olarak kabul edilerek inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi (%) olarak ifade edildi.

3.2.11.c. Proteaz enzimin için K_M ve V_{max} parametrelerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek amacıyla 0,5 ml enzim çözeltisi, 100 mM pH 8,5 Tris-HCl tamponunda %0,02-0,6 aralığında 6 farklı konsantrasyonda hazırlanmış kazein çözeltilerinin 2,5 ml'si ile karıştırıldı. Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten yararlanılarak K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Laemmli 1970; Rao *et al.* 2008).

3.2.11.d. Bazı metal iyonlarının alkalın proteaz enziminin aktivitesine etkisini belirlemeye yönelik çalışmalar

Co^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} gibi +2 değerlikli metal iyonlarının ve K^+ , Ag^+ gibi +1 değerlikli metal iyonların *A. pallidus* C10'dan izole edilen alkalın proteaz enziminin aktivitesine etkisi incelendi. Bunun için bu iyonların klorlu tuzları kullanıldı. 0,5 ml enzim çözeltisi, içerisinde 1, 5 ve 10 mM metal iyonu içeren pH'sı 8,5 olan 100 mM Tris-HCl tamponunda hazırlanan %0,65'lik kazeinin 2,5 ml'si karıştırıldı ve bölüm 3.2.2'deki gibi aktivite tayini yapıldı. Metal iyonları içermeyen enzim çözeltisinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi ve metal iyonu içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplandı (Ferrero *et al.* 1996).

3.2.11.e. Bazı organik çözücülerin alkalın proteaz enziminin aktivitesi üzerine etkisini belirlemeye yönelik çalışmalar

A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin organik çözücüler varlığında aktivitedeki değişimini incelemek için; metanol, etanol, kloroform, izopropanol, bütanol, aseton, DMSO gibi organik çözücülerin %15, %25, %50'lik konsantrasyonları kullanıldı. Her bir organik çözücü pH 8,5 olan 100 mM Tris-HCl tampon içinde hazırlandı. 50 µl enzim çözeltisi üzerine 450 µl organik çözücülerden oluşan tampon çözeltisi eklendi. 1 ve 24 saatlik inkübasyon sonunda aktiviteleri bölüm 3.2.2'deki gibi belirlendi. 50 µl enzim çözeltisi üzerine 450 µl pH'sı 8,5 olan 100 mM Tris-HCl tamponu kullanılarak aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. Organik çözücü içermeyen enzim çözeltisinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi ve organik çözücü içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplandı (Ferrero *et al.* 1996).

3.2.11.f. Bazı inhibitörlerin alkalın proteaz enziminin aktivitesi üzerine etkisini belirlenmeye yönelik çalışmalar

A. pallidus C10'dan izole edilen alkalın proteaz enziminin aktif bölgesinde hangi grubun yer aldığını belirlemek amacı ile inhibitörlerden; serin proteaz inhibitörü PMSF

(2mM ve 5mM), metalloproteaz inhibitörü EDTA (2mM ve 5mM), β -mekaptoetonal (%1 ve %5), sistein proteaz inhibitörü DTNB (2 mM ve 5 mM) kullanıldı. EDTA, β -merkaptoetanol, DTNB 100 mM Tris-HCl pH'sı 8,5 olan tamponda hazırlanırken PMSF %96 etanol çözeltisinde hazırlandı. 50 μ l enzim çözeltisi üzerine hazırlanan çözeltilerden 450 μ l eklenip 37°C 180 rpm'de yarım saat çalkalayıcıda bekletildikten sonra bölüm 3.2.2'deki gibi aktivite ölçümü yapıldı. 50 μ l enzim çözeltisine 450 μ l pH'sı 8,5 olan 100 mM Tris-HCl tamponu eklenerek aynı koşullarda inkübe edilen inhibitör içermeyen çözeltinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi ve inhibitör içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplandı (Ferrero *et al.*1996).

3.2.11.g. Alkalın proteaz aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanın etkisinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

Yüzey aktif maddelerinden SDS (%1 ve %5), Triton X-100 (%1 ve %5), Tween-20 (%1 ve %5), Tween-80 (%1 ve %5) ve okside edici ajan H₂O₂ (%1 ve %5) varlığında *A. pallidus* C10'dan elde edilen alkalın proteaz enziminin aktivitesinde meydana gelen değişim incelendi. 50 μ l enzim çözeltisi belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerin 450 μ l'si ile karıştırıldı ve 37°C'de, 30 dk 180 rpm hızındaki çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında bölüm 3.2.2'deki gibi aktivite tayini yapıldı. 50 μ l enzim çözeltisine 450 μ l pH'sı 8,5 olan 100 mM Tris-HCl tamponu eklenerek aynı koşullarda inkübe edilen örneğin aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve inkübasyon sonrası aktiviteler kalan aktivite olarak değerlendirildi (Johnvesly and Naik 2001; Kazan *et al.* 2005; Shah *et al.* 2010).

3.2.11.h. Alkalın proteaz enziminin doğal substratlara olan özgünlüğünün belirlenmesine yönelik çalışmalar

A. pallidus C10'dan izole edilen alkalın proteaz enziminin doğal substratlardaki aktivite miktarının belirlenmesi için kazein, azokazein, hemoglobin, sığır serum albumini (BSA) ve jelatin kullanıldı. Substratların %0,65'lik çözeltileri 100 mM Tris-HCl pH'sı 8,5 olan tamponda hazırlandı. 0,5 ml enzim çözeltisi ile 2,5 ml substrat çözeltisi karıştırıldı ve

bölüm 3.2.2'deki gibi aktivite tayini yapıldı. En yüksek aktivite gösteren substratın aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğerleride ona göre hesaplandı (Johnvesly and Naik 2001).

3.2.11.1. Ticari olarak satılan bazı deterjanların alkalın proteaz enzimi üzerine etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

A. pallidus C10'dan izole edilen alkalın proteaz enziminin T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆ ve T₇ gibi endüstriyel deterjanlar varlığında aktivitesinin durumu tespit edildi. Bu deterjanlardan %1 (w/v) konsantrasyonlarındaki çözeltileri çeşme suyu ile hazırlandı. 50 µl enzim çözeltisine 450 µl deterjanları içeren çözeltilerden eklenerek 37°C'de bir saat inkübasyona bırakıldı. İçinde deterjan çözeltisi olmayan bir örnek kontrol olarak aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 3.2.2.'deki gibi aktivite tayini yapıldı. Kontrolün aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğer örneklerin aktiviteleri buna göre hesaplandı (Skoog *et al.* 1997).

3.2.12. Verilerin istatiksel analizi

Verilerin değerlendirilmesinde GraphPad Prism 5 (Graphpad, La, Jolla, CA) Software 7,0 istatistik programı kullanıldı. Bütün sonuçlarda mean±standart hata (SEM) değerleri analiz edildi.

4. ARAŞTIRMA ve BULGULAR

4.1. Kullanılan Mikroorganizma ve Petride Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında kullanılan *A. pallidus* C10 aerop, termofilik, gram pozitif, spor formu içeren, katalaz ve oksidaz reaksiyonları pozitif, optimum büyüme gösterdiği pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 7,5-9,0 ve 56°C olarak belirlendi (Yanmış and Adıgüzel

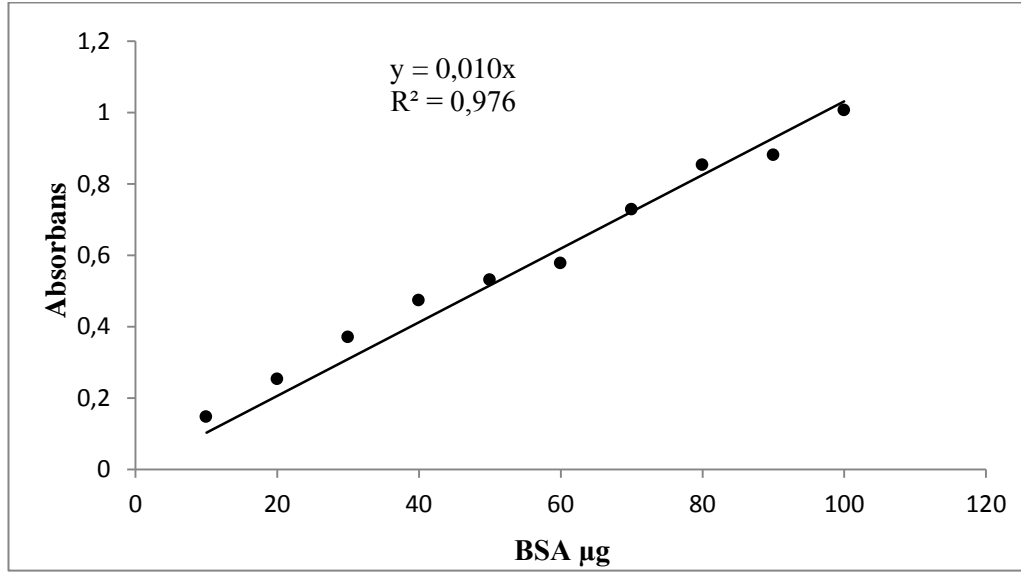
2014). İnkübasyon sonunda petride gözlemlenen açık zon suşun proteaz aktivitesi açısından pozitif olduğunu gösterdi.



Şekil 4.1. Petrideki proteaz aktivitesi

4.2. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

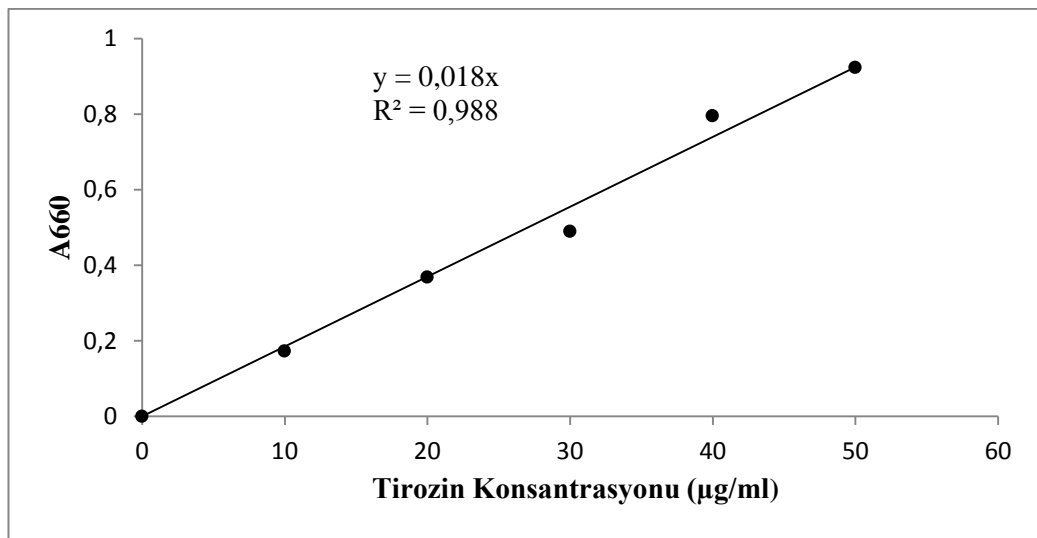
Araştırma boyunca elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla bölüm 3.2.4.'de anlatıldığı gibi standart grafik hazırlandı. Protein tayinine ait standart grafik Şekil 4.2'de verilmiştir. Ham homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi, DE52 anyon değişim ve Probond™ afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak hesaplandı.



Şekil 4.2. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik

4.3. Proteaz Aktivitesi Hesaplamasında Kullanılan Tirozin Standart Grafiği

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan tirozin standart grafiği bölüm 3.2.3’de anlatıldığı gibi hazırlandı ve standart çözeltileri $\mu\text{g/ml}$ proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.3’de gösterildi.



Şekil 4.3. Proteaz aktivitesi için standart tirozin grafiği

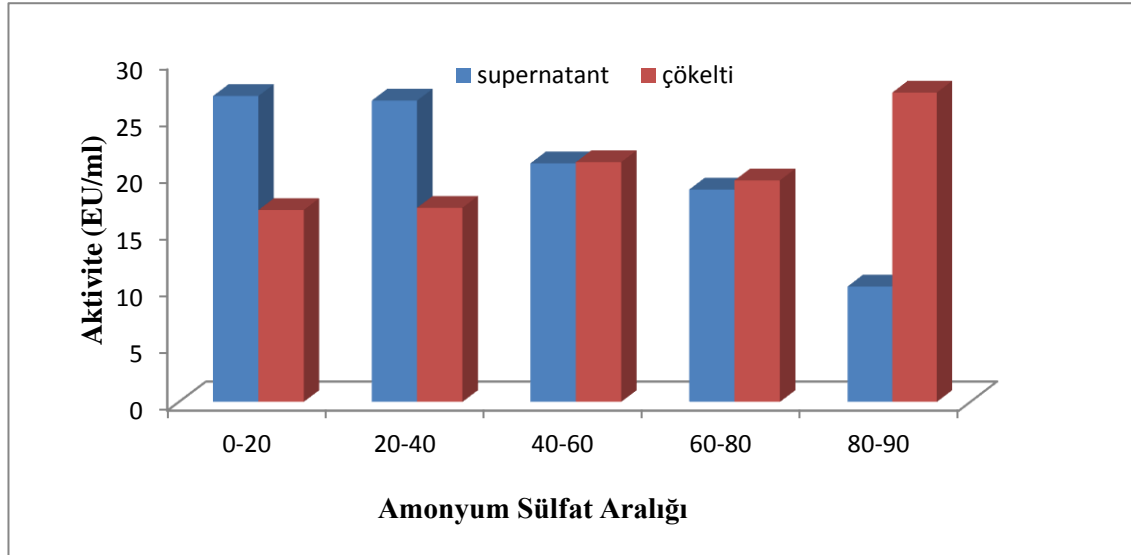
4.4. Proteaz Enziminin Saflaştırma Basamakları Sonuçları

4.4.1. Amonyum sülfat çöktürmesi ve sonuçları

A. pallidus C10'dan proteaz enziminin saflaştırılmasında ilk aşama olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Amonyum sülfat aralığı bölüm 3.2.6.'da anlatılan yöntem ile %0-90 olarak belirlendi. Elde edilen çökelek pH'sı 8,5 olan 100 mM Tris-HCl tampon çözeltisinde çözülerek bir sonraki işlem için hazır hale getirildi.

Çizelge 4.1. Proteaz enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite- çöktürme aralık çizelgesi

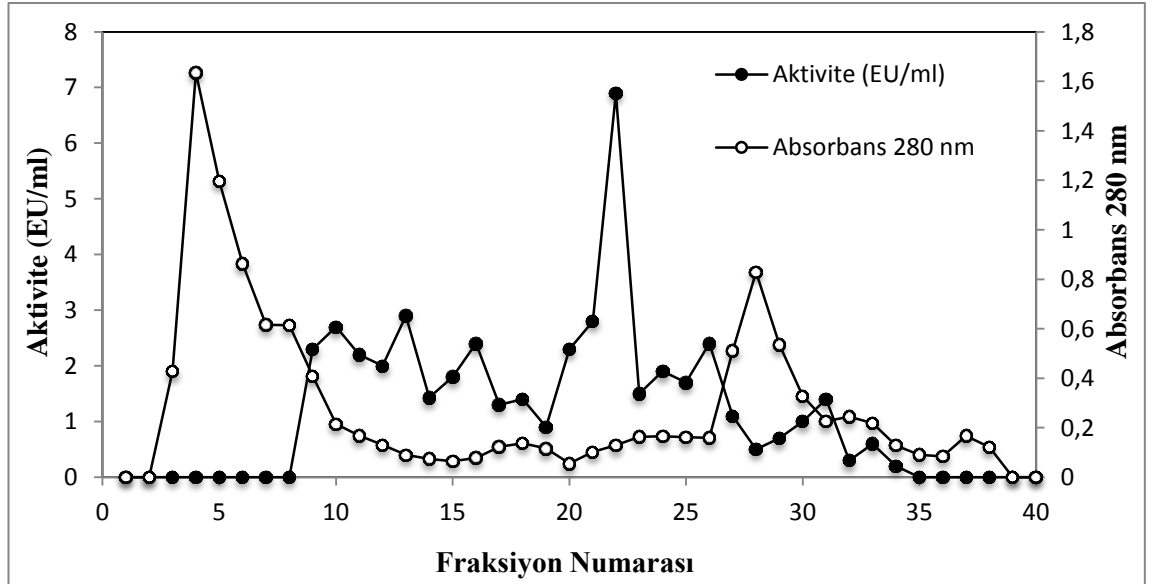
Amonyum sülfat aralığı (%)	0-20	20-40	40-60	60-80	80-90
Süpernatant	0,941	0,796	0,631	0,563	0,306
Çökelti	0,485	0,515	0,633	0,579	0,812



Şekil 4.4. Doygunluk aralığına göre amonyum sülfat çöktürme grafiği

4.4.2. DE52 anyon değişim kromatografisi sonuçları

Saflaştırmada ikinci aşama olarak amonyum sülfat çöktürmesi sonrası diyaliz edilen numune DE52 anyon değişim kolonuna tatbik edildi. 50 mM Tris-HCl (pH 8,5) tamponuyla hazırlanan 50-500 mM arasında NaCl içeren çözeltiler ile elüe edildi. Her bir fraksiyon için 280 nm’de protein miktarı ve 660 nm’de aktivite tayini yapıldı. Enzim %26,9 verimle 4,85 kat saflaştırıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.5 ve Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.



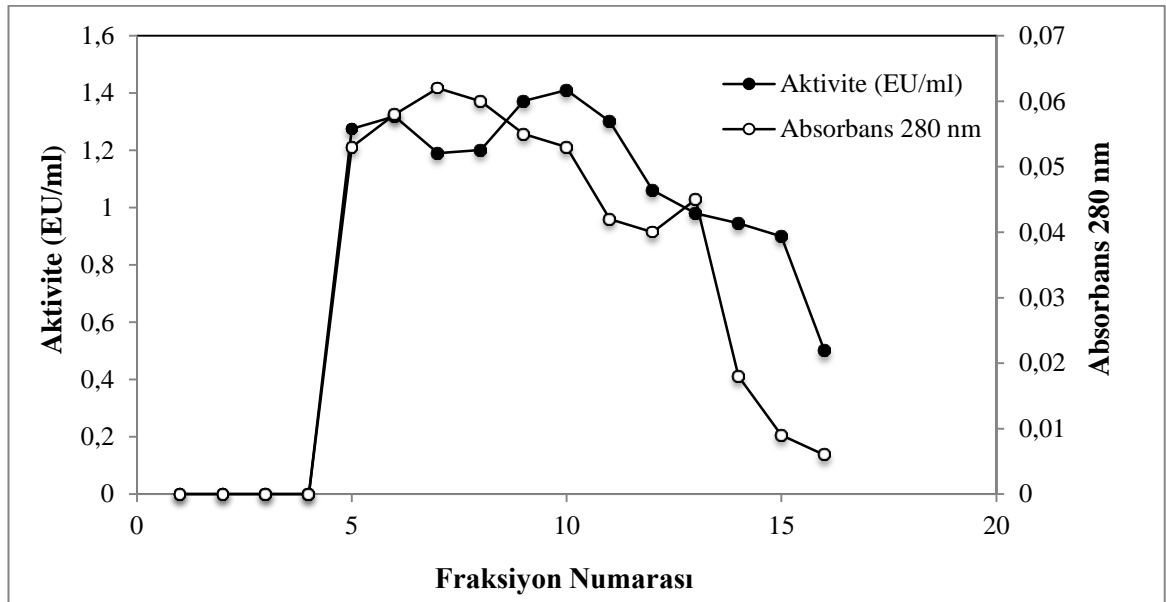
Şekil 4.5. Proteaz enziminin DE52 anyon değişim kromatografisi ile elüsyonunu gösteren grafik

Çizelge 4.2. Proteaz enziminin DE52 anyon değişim kromatografisi sonucu elde edilen saflaştırma basamakları sonuçları

Numune türü	Total Hacim (ml)	Aktivite (EU/ml)	Protein (mg/ml)	Total Aktivite (EU/ml)	Total Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham ekstrakt	60	35,8	716	2148	42960	0,056	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi	10	28,6	161	283,6	1610	0,176	13,02	3,14
DE52 Anyon değişim kromatografisi	5	15,26	56	76,3	280	0,272	26,9	4,85

4.4.3. Probond™ afinite kromatografisinin sonuçları

Enzim Probond™ afinite kolonu kullanılarak %19,56 verimle 17,32 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan proteaz enziminin Probond™ afinite kromatografisi sonuçları Şekil 4.6'de ve Çizelge 4.3'de gösterildi.



Şekil 4.6. Proteaz enziminin Probond™ afinite kromatografisi ile elüsyonunu gösteren grafik

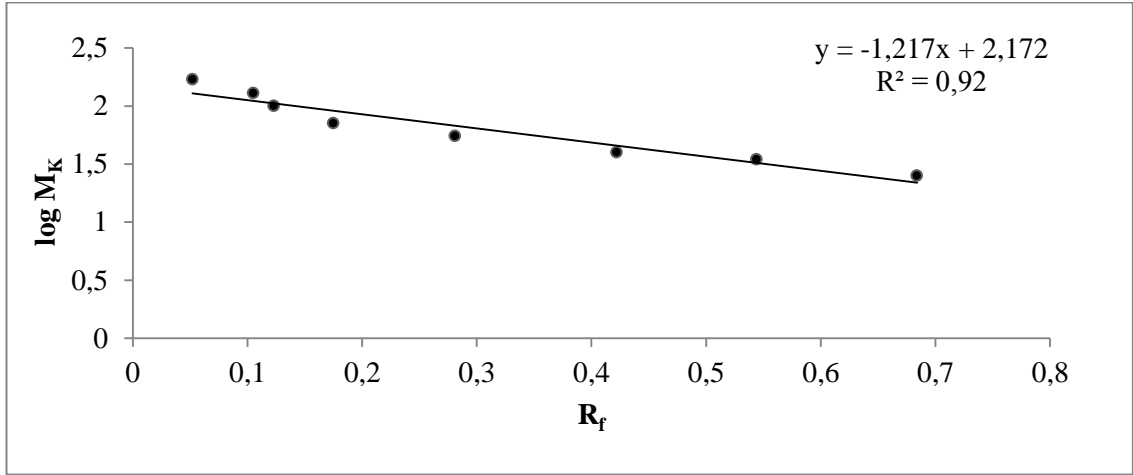
Çizelge 4.3. Proteaz enziminin Probond™ afinite kromatografisi sonucu elde edilen saflaştırma basamakları sonuçları

Numune türü	Total Hacim (ml)	Aktivite (EU/ml)	Protein (mg/ml)	Total Aktivite (EU/ml)	Total Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham ekstrakt	60	41,23	673	2473,8	40380	0,061	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi	10	41,56	511	332,5	4088	0,081	13,44	1,33
Probond™ afinite kromatografisi	1,5	43,36	41	65,04	61,05	1,057	19,56	17,32

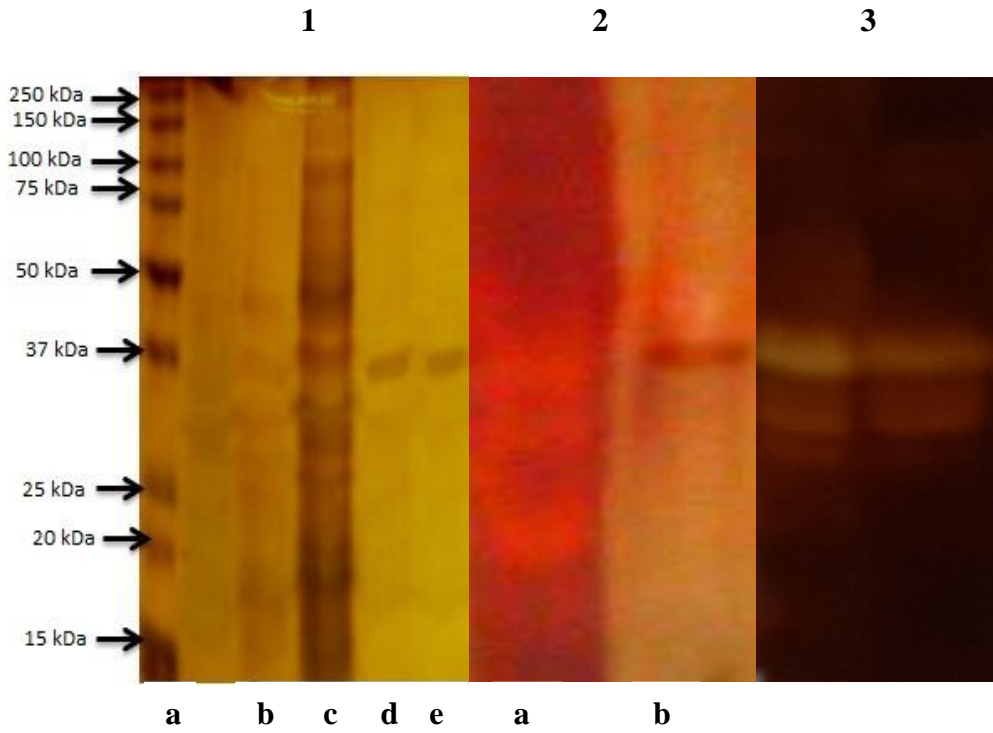
4.4.4. SDS-PAGE ile enzimin saflık kontrolü, molekül kütesinin tayini ve zimogramının belirlenmesine yönelik sonuçlar

A. pallidus C10'dan DE52 anyon değişim ve Probond™ afinite kromatografisi ile saflaştırılan proteaz enziminin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla bölüm 3.2.9.'da anlatıldığı gibi elektroforez yapıldı. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.8.1 ve Şekil 4.8.2'de gösterildi. Standart proteinlerin ve enzimin jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek R_f değerleri hesaplandı. Log MK- R_f değerleri ile çizilen grafik Şekil 4.7'de gösterildi. Enzimin molekül kütesi 38,35 olarak hesaplandı.

Proteaz enzimi SDS-PAGE sisteminde yürütülerek zimogram analizi yapıldı. Bölüm 3.2.10.'da anlatıldığı gibi yapılan analiz sonucunda Şekil 4.8.3.'de görülen proteaz enziminin bulunduğu yer daha açık renkte görünmektedir. Enzimin kazeini parçalamasından dolayı jelde diğer bölgelere göre daha açık renkteki görüntü proteaz enziminin varlığını doğrulamaktadır.



Şekil 4.7. SDS-PAGE sonucu çizilen Log MK-R_f grafiği



Şekil 4.8. *A. pallidus* C10'dan izole edilen proteaz enziminin SDS-PAGE ve zimogram görüntüsü

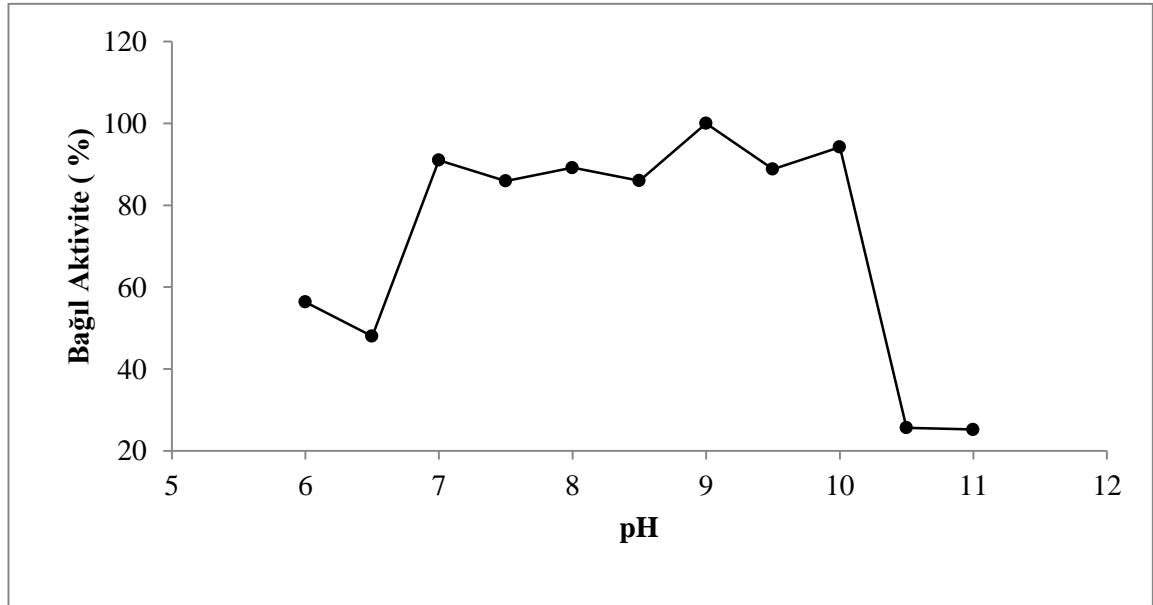
1) DE52 anyon değişim kromatografisi a) protein marker b) diyaliz c) çökelek d-e) elüsyon. 2) Probond™ afinite kromatografisi a) çökelek b) elüsyon. 3) Zimogram analiz sonucu

4.5. Proteaz Enzimi İçin Optimum pH ve Stabil pH Bulunmasına Yönelik Sonuçlar

A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteazenziminin bölüm 3.2.11.a'daki yöntemle göre optimum pH'sı belirlendi. Enzimin optimum pH'sını tespit etmek için farklı pH değerlerindeki 0,1 M sodyum fosfat (pH6,0–8,0), Tris-HCl (pH 7,0–9,0) ve glisin-NaOH (pH 9,0–11,0) tampon çözeltileri kullanıldı. Proteaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği glisin-NaOH tamponu pH 9,0 optimum pH olarak belirlendi.

Çizelge 4.4. 0,1 M sodyum fosfat (pH6,0–8,0), Tris-HCl (pH 7,0–9,0) ve glisin-NaOH (pH 9,0–11,0) tampon çözeltileri kullanılarak proteaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0
Bağlı Aktivite (%)	56,36	47,99	91,01	85,95	89,17	86,21	100	88,83	94,24	25,65	25,21

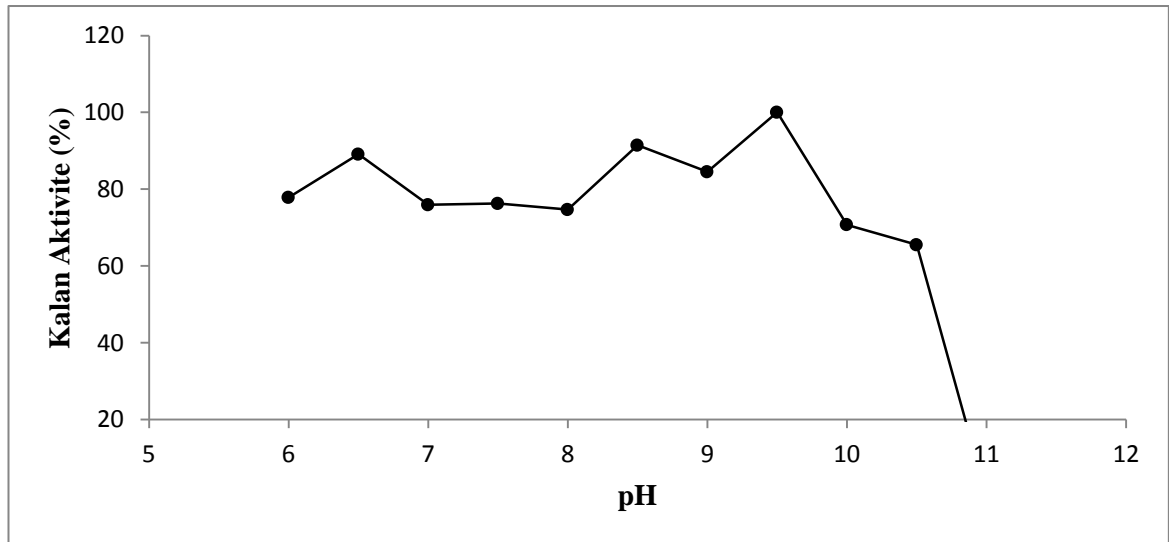


Şekil 4.9. Proteaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği

A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin bölüm 3.2.11.a'daki yöntemle göre stabil pH'sı belirlendi. Enzimin pH stabilitesi için 0,1 M sodyum fosfat (pH 6,0–8,0), Tris-HCl (pH 7,0–9,0) ve glisin-NaOH (pH 9,0–11,0) tampon çözeltileri kullanıldı. Proteaz enzimi için stabil pH glisin-NaOH tamponu pH 9,5 olarak belirlendi.

Çizelge 4.5. 0,1 M sodyum fosfat (pH6,0–8,0), Tris-HCl (pH 7,0–9,0) ve glisin-NaOH (pH 9,0–11,0) tampon çözeltileri kullanılarak proteaz enziminin stabil pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0
Kalan Aktivite (%)	77,84	89,08	75,94	76,26	74,68	91,45	84,49	100	70,72	65,50	0



Şekil 4.10. Proteaz enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

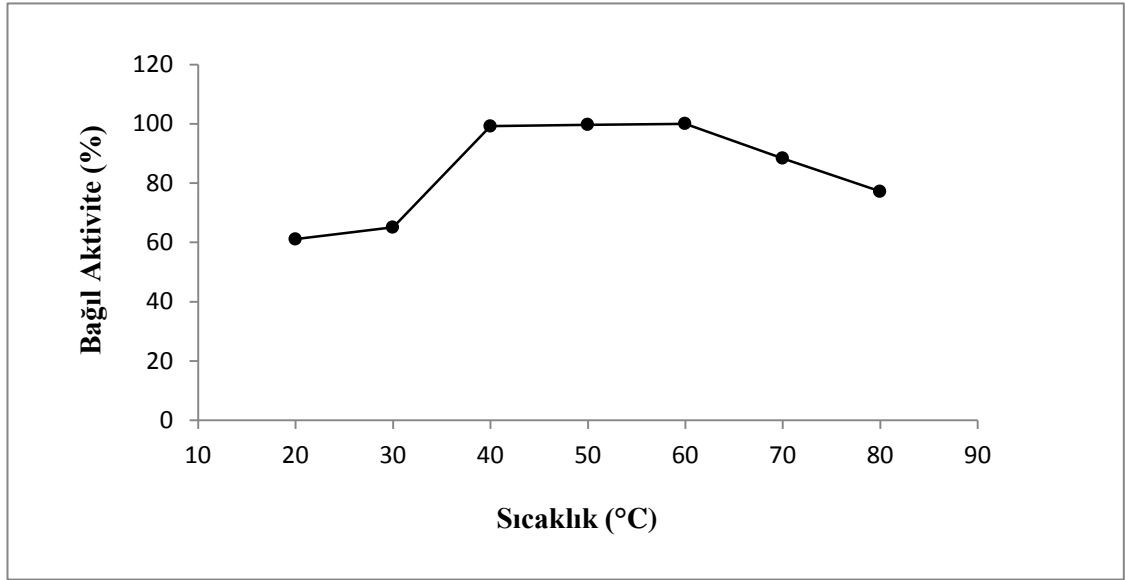
4.6. Proteaz Enzimi İçin Optimum Sıcaklığın ve Stabil Sıcaklığın Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin bölüm 3.2.11.b'deki yöntemle göre sıcaklık profili ve kararlılığı belirlendi. Enzimin optimum sıcaklığını belirlemek

amacıyla 20°C ile 80°C arasındaki sıcaklıklar denendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.11 ve Çizelge 4.6’da gösterildi. Enzimin optimum sıcaklığı 60°C olarak tespit edildi.

Çizelge 4.6. Proteaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık- bağıl aktivite (%) ölçüm sonuçları çizelgesi

Sıcaklık (°C)	20	30	40	50	60	70	80
Bağıl Aktivite (%)	61,08	65,09	99,21	99,71	100	88,34	77,18

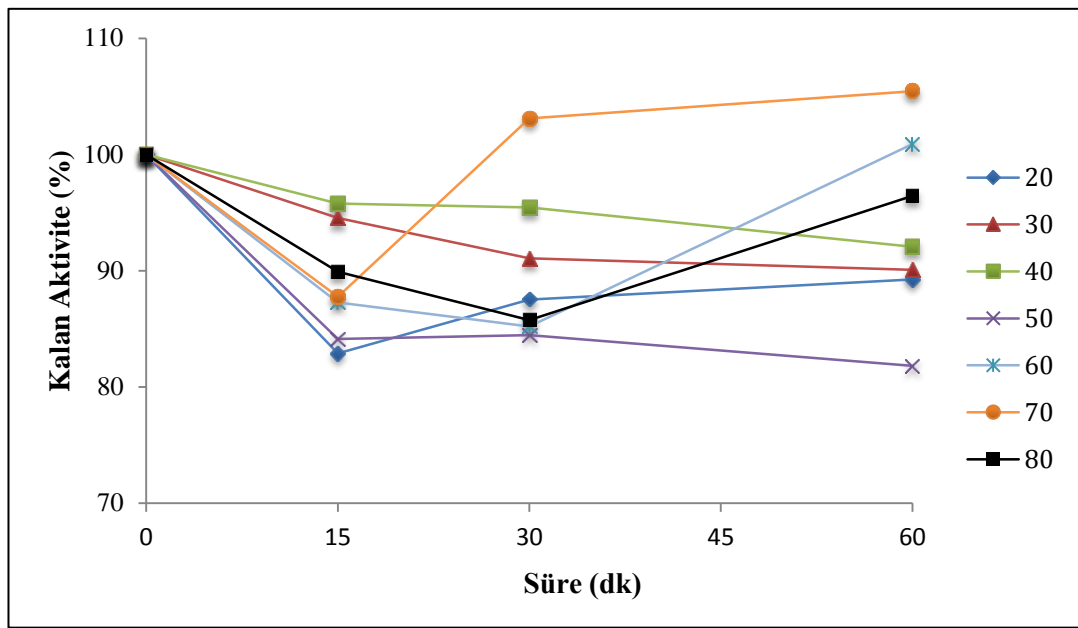


Şekil 4.11. Proteaz enzimi optimum sıcaklık ölçülmesi için çizilen sıcaklık-bağıl aktivite grafiği

A. pallidus C10’den saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık stabilitesini belirlemek amacıyla 20°C’den 80°C’ye kadar olan sıcaklık aralığında 15, 30 ve 60 dk’lık inkübasyon sürelerinde bölüm 3.2.11.b.’de anlatıldığı aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen veriler Şekil 4.12 ve Çizelge 4.7’de gösterildi. Enzimin her bir sıcaklık aralığında bir saat inkübasyon sonunda aktivitesini muhafaza ettiği ve sıcaklığa oldukça toleranslı olduğu gösterildi. Özellikle 30, 40, 70 ve 80°C sıcaklıklarda enzimin daha kararlı olduğu belirlendi.

Çizelge 4.7. Proteaz enziminin sıcaklık kararlılığını belirlemek için zaman-sıcaklık-kalan aktivite (%) ölçüm sonuçları çizelgesi

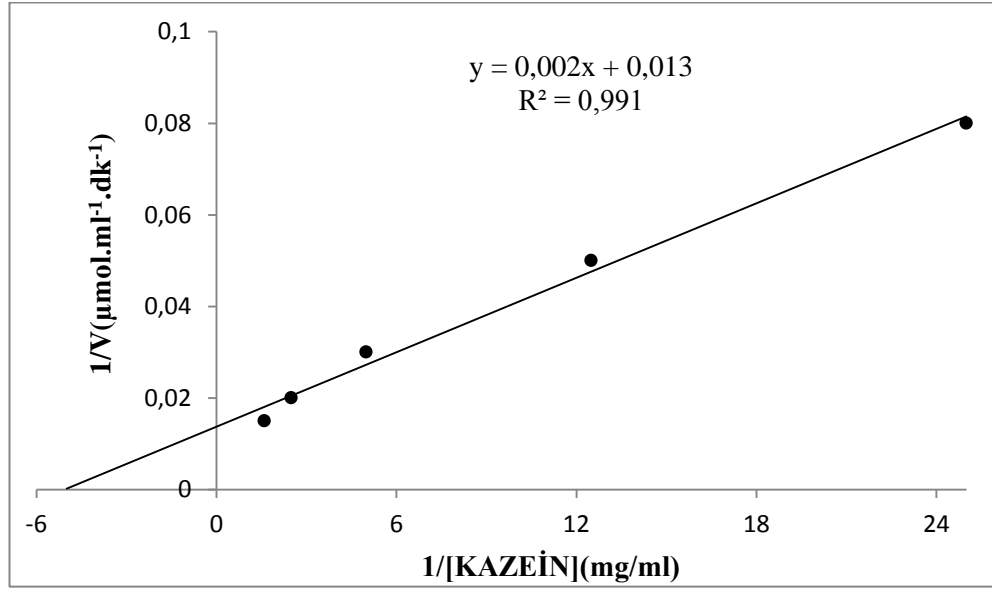
İnkübasyon Sonrasında Kalan Aktiviteler (%)							
Süre (dk)	20 °C	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
15	82,89	94,54	95,78	84,13	87,27	87,76	89,91
30	87,52	91,07	95,45	84,46	85,20	103,10	85,77
60	89,25	90,09	92,06	81,81	100,9	105,45	96,45



Şekil 4.12. Proteaz enzimi için sıcaklık kararlılık grafiği

4.7. K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Sonuçlar

A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratı varlığında K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için bölüm 3.2.11.c.'de belirtilen yöntemle göre $1/V - 1/[Kazein]$ Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanılarak K_M değeri 0,197 mg/ml ve V_{max} değeri $7,29 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{dk}^{-1}$ olarak tespit edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.13'de gösterildi.



Şekil 4.13. Kazein substratı için K_M ve V_{max} bulunmasına yönelik $1/V-1/[Kazein]$ Lineweaver-Burk grafiği

4.8. Bazı Metal İyonlarının *A. pallidus* C10'dan Saflaştırılan Proteaz Enzimine Etkisine Yönelik Sonuçları

A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteaz enzimine metal iyonlarının etkisini incelemek için Co^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} ve Ca^{+2} gibi +2 değerlikli metal iyonları ve K^+ ve Ag^+ gibi +1 değerlikli metal iyonları kullanılarak bölüm 3.2.11.d.'de belirtilen yöntemle göre proteaz aktivitesi belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8.'de verildi. Bu sonuçlara göre Mg^{+2} ve Ca^{+2} metallerinin her üç konsantrasyonda enzimi aktive ettiği görüldü. Ayrıca Zn^{+2} metalinin 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda, K^+ ve Ag^+ metallerinin ise 1 ve 5 mM'lık konsantrasyonlarda, Fe^{+2} ve Ni^{+2} metallerin ise 1 mM'lık konsantrasyonlarda enzimi aktive ettiği belirlendi. Bununla birlikte diğer metallerin enzimin aktivitesi üzerine çok fazla etki etmediği tespit edildi.

Çizelge 4.8. *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enzimine metal iyonlarının etkisi

Metal iyonları	1 mM	5 mM	10 mM
Kontrol	100±0,00	100±0,00	100±0,00
Fe⁺²	109±2,50	95,41±5,68	101,2±1,50
Mg⁺²	120,8±0,38	113,1±1,83	113,6±0,52
Ca⁺²	115,3±2,17	120,6±0,24	108,8±0,69
Zn⁺²	83,11±7,28	114,8±1,45	111,6±2,67
Co⁺²	96,61±0,97	87,45±1,67	83,08±7,77
Ni⁺²	107,1±0,77	94,30±1,79	91,54±1,64
Mn⁺²	83,08±7,77	84,92±0,69	80,58±4,39
Ag⁺	108,2±0,57	124,3±2,70	90,78±8,61
K⁺	149,3±5,23	129,9±4,61	91,60±2,29

4.9. Bazı Organik Çözücülerin *A. pallidus* C10'dan Saflaştırılan Proteaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisine Yönelik Sonuçları

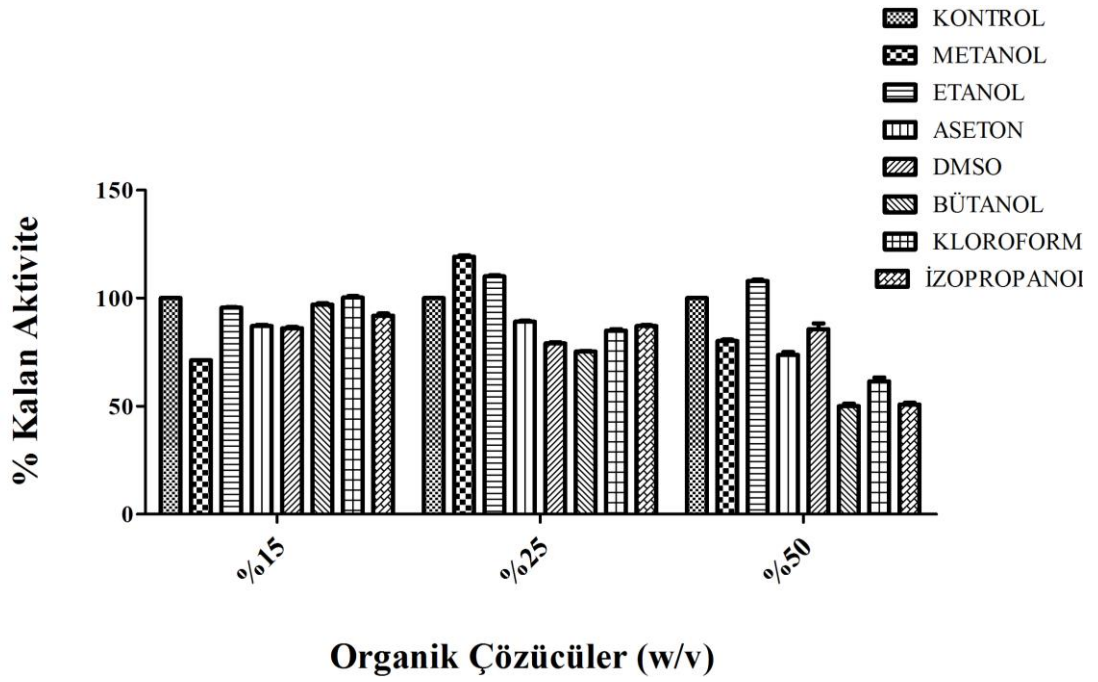
A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin organik çözücüler varlığında kararlılığını belirlemek için %15, %25, %50'lik konsantrasyonlarda DMSO, metanol, etanol, aseton, kloroform, izopropanol ve bütanol kullanıldı. Bölüm 3.2.11.e'de anlatılan yöntemle göre elde edilen sonuçlar Şekil 4.14-4.15 ve Çizelge 4.9-4.10'da verildi. Bu sonuçlara göre, %15'lik konsantrasyonda belirtilen organik çözücülerde 1 saat sonunda enzimin kararlı olduğu gösterildi. %25'lik konsantrasyonda 1 saat sonunda metanol ve etanolün enzimi aktivite ettiği ve diğerlerinde ise oldukça kararlı olduğu tespit edildi. %50'lik konsantrasyonda 1 saat sonunda enzim aktivitesinin etanol varlığında kararlılığını korurken; bütanol, kloroform ve izopropanol varlığında yarı yarıya düştüğü belirlendi. %15 ve %25'lik konsantrasyonlarda 24 saat sonra enzimin genel olarak kararlılığını koruduğu gözlemlendi. %50 konsantrasyonlarda 24 saat sonunda enzim aktivitesini kaybetti. Bu nedenle sonuçlar gösterilmedi.

Çizelge 4.9. *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin organik çözücülerdeki 1 saat inkübasyon süresi sonundaki sonuçları

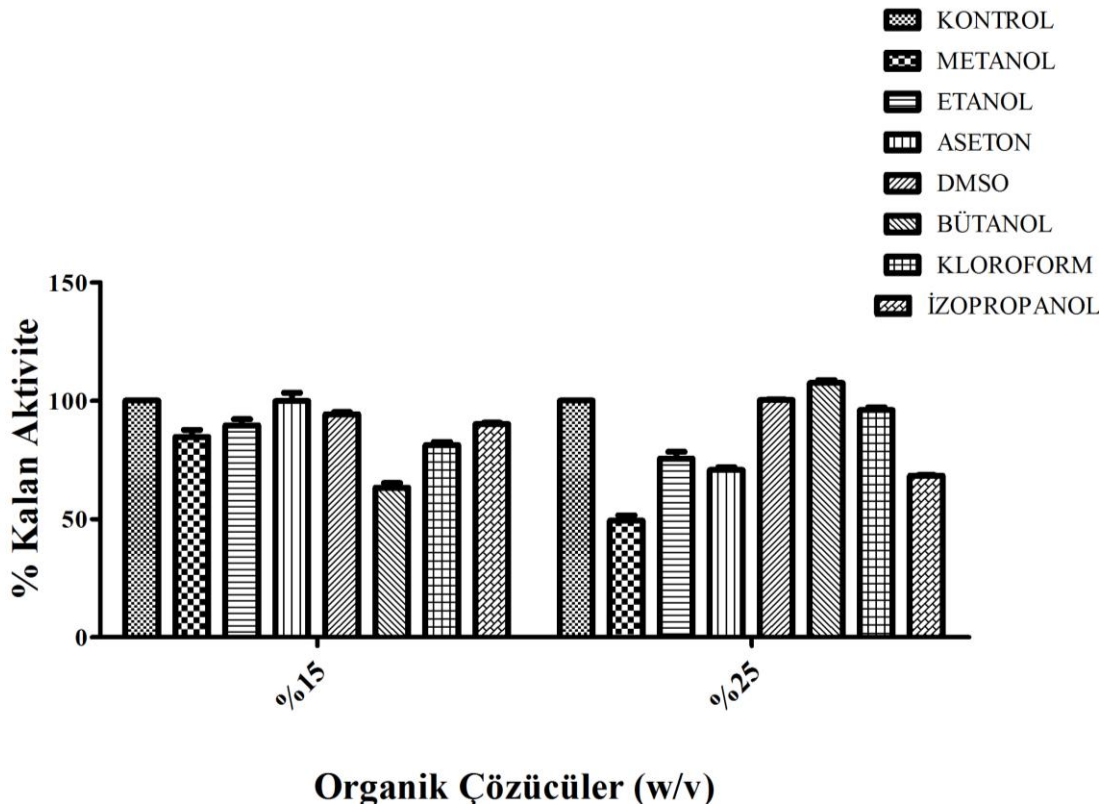
Organik çözücüler	%15	%25	%50
Kontrol	100±0.00	100±0.00	100±0.00
Metanol	68,42±1,83	114±2,79	80,24±1,74
Etanol	93,59±1,12	107,8±1,52	103,7±2,07
Aseton	86,73±1,29	88,50±2,02	72,74±1,89
DMSO	84,73±0,93	78,10±1,75	95,33±2,19
Bütanol	93,74±2,09	73,66±1,85	52,01±2,44
Kloroform	95,94±2,58	85,02±1,73	59,59±1,44
İzopropanol	90,21±1,91	84,46±1,00	50,50±1,038

Çizelge 4.10. *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin organik çözücülerdeki 24 saat inkübasyon süresi sonundaki sonuçları

Organik çözücüler	%15	%25
Kontrol	100±0.00	100±00
Metanol	83,38±1,77	50,27±1,39
Etanol	90,28±1,98	75,47±2,95
Aseton	102,9±1,92	72,67±1,45
DMSO	85,86±3,65	102,2±1,53
Bütanol	58,88±2,20	106,5±3,21
Kloroform	74,56±90,13	96,41±0,87
İzopropanol	90,13±1,73	62,91±2,42



Şekil 4.14. *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin organik çözücülerdeki 1 saat inkübasyon sonundaki sonuçları



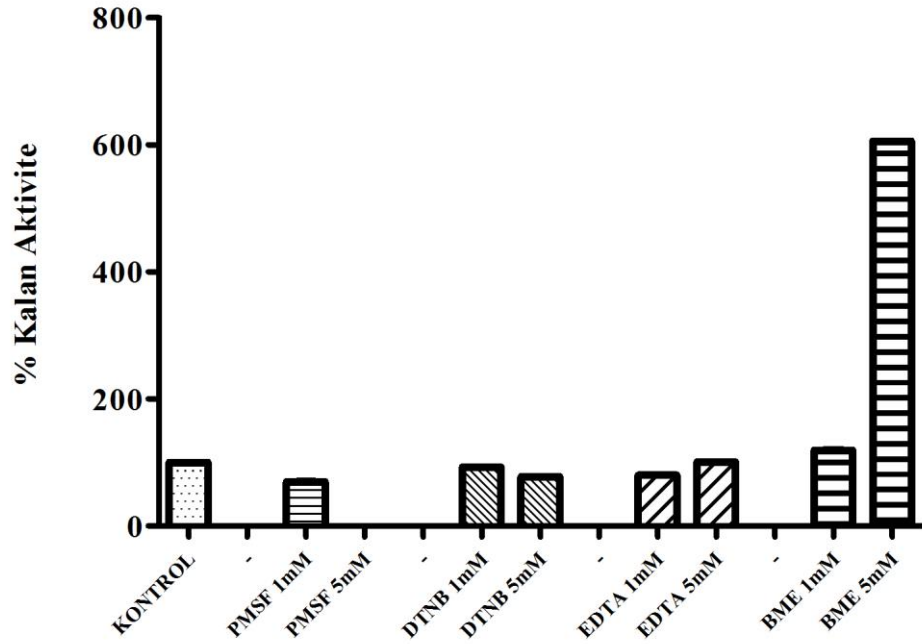
Şekil 4.15. *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin organik çözücülerdeki 24 saat inkübasyon sonundaki sonuçları

4.10. *A. pallidus* C10'dan Saflaştırılan Proteaz Enzimin Aktivitesi Üzerine Bazı İnhibitörlerinin Etkisinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin katalitik bölgedeki tayin etmek için fenilmetilsülfonilflorür (PMSF), etilendiamin tetra asetik asit (EDTA), DTNB, β -merkaptobetanol gibi çeşitli inhibitörlerin farklı konsantrasyonları kullanıldı. Bölüm 3.2.11.f.'de anlatılan yöntemle göre elde edilen sonuçlar Şekil 4.16 ve Çizelge 4.11'de verildi. Sonuçlara bakıldığında PMSF varlığında enzimin aktivitesini tamamen kaybettiği, EDTA varlığında aktivitesini koruduğunu ve β -merkaptobetanol varlığında aktivitesinde %605,7 artış olduğu gözlemlendi. Serin spesifik inhibitörü olan PMSF ile tamamen inhibe olması nedeniyle enzimin bir serin proteaz olduğunu tespit edildi.

Çizelge 4.11. *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi

İnhibitörler	1 mM	5 mM
Kontrol	100±0.00	100±0.00
EDTA	79,92±0,08	100,4±0,42
DTNB	92,43±0,26	77,21±0,05
B-merkaptobetanol	119±0,57	605,7±0,33
PMSF	69,54±0,29	0



Şekil 4.16. *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi

4.11. *A. pallidus* C10'dan Saflaştırılan Proteaz Enzimin Aktivitesi Üzerine Yüzeysel Aktif Maddelerinin ve Okside Edici Ajanının Etkisinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin üzerine yüzeysel aktif maddelerin etkisini ve okside edici ajanın etkisini incelemek için %1-5'lik konsantrasyonlarda SDS, Tween-20, Tween-80, Triton-X-100 ve H_2O_2 kullanıldı. Bölüm 3.2.11.g.'de belirtilen yöntemle yapılan deney sonuçları Çizelge 4.12'de verildi. %1'lik konsantrasyonlarda Tween-20, Tween-80, Triton-X-100 ve SDS varlığında sırasıyla %80, %69, %59 ve %30 aktivite kaybı gözlemlendi. Ancak %5'lik konsantrasyonlardaki Triton-X-100'de enzimin aktivitesini %63 koruduğu ve SDS'de ise enzim aktivitesinde kısmi bir artış belirlendi. %1-5'lik konsantrasyonlara okside edici ajan olarak kullanılan H_2O_2 varlığında enzimin inhibe olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.12. *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajanın etkisi

Yüzey aktif maddeler	%1	%5
Kontrol	100±0.00	100±0.00
Tween-20	20,0±1,15	37,67±1,45
Tween-80	31,0±2,08	29,0±2,08
Triton-X-100	41,33±1,85	63,0±1,52
SDS	79,33±2,65	116,7±1,76
Okside edici ajan		
H₂O₂	9,66±0,88	11,67±0,88

4.12. *A. pallidus* C10'dan Saflaştırılan Proteaz Enzimin Doğal Substratlara Olan Özgünlüğün Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

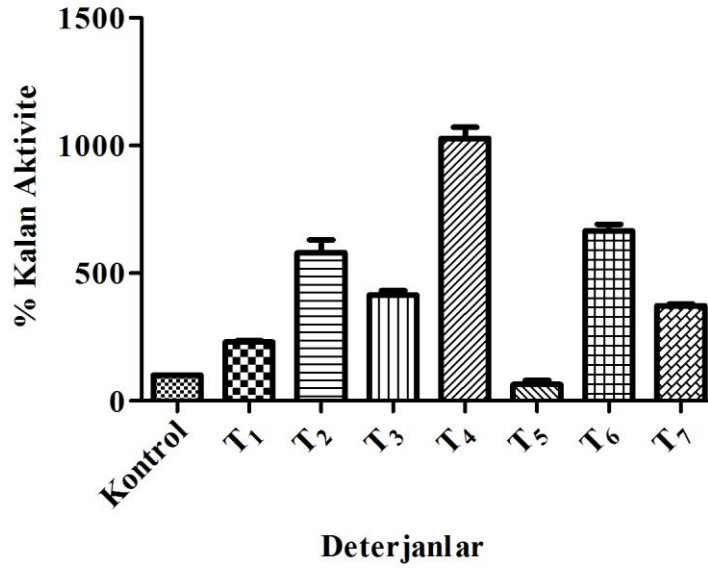
A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin kazein, azokazein, hemoglobin, jelatin ve sığır serum albümin (BSA) gibi substratlar varlığında aktivitesi bölüm 3.2.10.1'deki yöntemle göre incelendi. Enzimin en yüksek aktiviteyi kazein substratına gösterdiği belirlendi.

Çizelge 4.13. *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara varlığında aktivitesi

Doğal substratlar (%0,65 w/v)	Bağl aktivite %100
Kazein	100
Azokazein	15
BSA	5
Jelatin	25
Hemoglobin	0

4.13. *A. pallidus* C10'dan Sıflaştırılan Proteaz Enzimin Aktivitesi Üzerine Bazı Endüstriyel Deterjanların Etkisinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

A. pallidus C10'dan sıflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine bazı ticari olarak satılan deterjanların etkisi bölüm 3.2.11.1.'da anlatılan yöntemle göre incelendi. İnceleme yapılan tüm deterjanların T₅ deterjanı haricinde enzim aktivitesi üzerine artırıcı etki yaptığı tespit edildi.



Şekil 4.17. *A. pallidus* C10'dan sıflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine bazı ticari olarak satılan deterjanların etkisi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde çeşitli uygulamalar için daha çevreci ve verimli bir seçenek olarak enzimlerin kullanımı, araştırmacıları ekstrem koşullara dayanıklı enzim ve enzim grupları bulmaya itmiştir. Bunlardan birisi olan proteazlar, dünya enzim pazarının en geniş grubunu oluşturur ve çeşitli endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalardaki rolü ile dikkat çeken oldukça önemli bir enzim grubudur. Gıdadan deterjan endüstrisine, ilaç endüstrisinden atık su arıtımına, peptid sentezine kadar hemen hemen her alanda proteazları görmek mümkündür. Ayrıca canlı organizmalardaki hayati olan fizyolojik süreçlerde önemli roller üstlenmektedirler. Bundan yola çıkılarak ticari öneme sahip, ekonomik değeri olan proteazları; yeni ve doğal kaynaklardan izole etmek, saflaştırmak ve karakterize etmek araştırmacılar için itici bir güç olmuştur.

Mikroorganizmalar, enzim kaynağı olarak kullanılabilen en iyi kaynaklardır. Çünkü enzim teknolojisinde, en düşük maliyetle en yüksek verimi almak temel esastır. Mikroorganizmaların gerek kültüre edilme koşullarının kolay olması gerekse de kısa sürede yüksek verim sağlamaları, onları enzim çalışmaları için önemli bir kaynak haline getirmiştir. Endüstrideki zor ve ağır şartlara dayanıklı enzimlerin eldesinde özellikle ekstrem şartlarda yaşayabilen mikroorganizmalar tercih edilir. Bunun için de bilim insanları biyoteknolojik açıdan değerli olan yeni türleri tanımlamak için sürekli bir araştırma içerisinde bulunmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında *Aeribacillus pallidus* C10 yeni bir suş olup ve bu organizmadan ilk kez proteaz enzimi saflaştırıldı ve karakterize edildi. Yapılan literatür taraması sonucunda bu yeni cinsin tip türü olan *A. pallidus*'un (Yasawong *et al.* 2011; Radchenkova *et al.* 2013; Cihan *et al.* 2011; Mnif *et al.* 2013; Yanmış and Adıgüzel 2014) konvensiyonel ve moleküler karakterizasyonun gerçekleştirildiği çok sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Cihan *et al.* (2011) suşu tanımlarken proteaz aktivitesinin olmadığını belirtirken biz ise yaptığımız çalışmada kullandığımız suşun yüksek proteaz aktivitesine sahip olduğu tespit ettik. Mnif *et al.* (2013)'de yaptıkları çalışma ile Tunus'un jeotermal bölgesinde petrol/yağ üzerinden izole ettikleri *A. pallidus* VP3'ü

karakterize edip, birkaç dirençli aromatik birleşikleri ve hidrokarbonların biyodegradasyondaki kapasitelerini ortaya koymuşlardır. Literatürde bu yeni cinsle ilgili yapılan başka bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Bu tez, *A. pallidus* C10 üzerinde enzimle alakalı yapılan literatürdeki ilk çalışmadır. Bu yeni suş, termofilik bir suş olup ekstrem koşullara dayanıklı olan proteaz enzim üretimi için oldukça iyi bir kaynaktır.

A. pallidus C10 tarafından üretilen alkalın proteaz enzimi, kültür üst sıvısından önce yüksek tuz konsantrasyonlarında proteinlerin çözünürlüklerinin azalıp çökmesi esasına dayanan amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile kısmi olarak saflaştırıldı. Literatürde Joo *et al.* (2000) %35-70 amonyum sülfat ile %83 verimle 3,5 kat, Basu *et al.* (2007) %60 amonyum sülfat ile %65.96 verimle 4,31 kat, Charles *et al.* (2008) %75 amonyum sülfat ile %58 verimle 4,7 kat, Rao *et al.* (2008) %60 amonyum sülfat ile %62,2 verimle 2,2 kat, Divakar *et al.* (2010) %30-60 amonyum sülfat ile %67,2 verimle 6 kat, Ravindran *et al.* (2011) %70 amonyum sülfat ile %65 verimle 5 kat, Raut *et al.* (2012) %30-80 amonyum sülfat ile %76,2 verimle 1,18 kat, Jayakumar *et al.* (2012) %80 amonyum sülfat ile %71,4 verimle 1,4 kat saflaştırmışlardır. Ayrıca enzimi Sonuç (2011)'deki çalışmasında %30-80 amonyum sülfat ile %53 verimle 2,51 kat, Dadı (2012)'deki çalışmasında %85 amonyum sülfat ile %9,6 verimle 1,4 kat ve Özden (2014)'de yaptığı çalışmada ham ekstrakta %85 amonyum sülfat ile %23,36 verimle 3,14 kat saflaştırmışlardır. Biz yaptığımız çalışmada ham ekstrakta uygulanan %90 amonyum sülfat ile enzim %13,2 verimle 3,14 kat saflaştırıldı. Literatür ile karşılaştırıldığında Rao *et al.* (2008), Raut *et al.* (2012), Jayakumar *et al.* (2012), Sonuç (2011) ve Dadı (2012) tarafından yapılan çalışmalara göre saflaştırma katsayısının daha yüksek, verimin ise düşük olduğu görülmektedir. Verimin düşük olması proteinlerin tam presipite olmaması, amonyum sülfatın enzim yapısını bozması, pH değişikliği ya da ortamdaki bozucu faktörlerin varlığına bağlanabilir. Elde edilen sonuç Dadı (2012) tarafından yapılan çalışma ile karşılaştırıldığında saflaştırma kat sayısının daha yüksek, % verim değerlerinin ise örtüştüğü görülmektedir.

Saflaştırma işlemine DE52 kromatografisi ile devam edildi. Literatürde Arulami *et al.* (2006), Basu *et al.* (2007), Charles *et al.* (2008), Haddar *et al.* (2008), Deepti *et al.*

(2011) gibi araştırmacılar daha çok CM-Selüloz ve jel filtrasyon kromatografisi kullanmışlardır. Yapılan çalışmalarda enzim DEAE kolonu ile %78,9 verimle 9,6 kat (Joo and Chang 2004), %84,6 verimle 3,2 kat (Miyaji *et al.* 2005), %27 verimle 4,6 kat (Rai and Mukherjee 2008), %52,8 verimle 4,4 kat (Fakhfakh *et al.* 2009), %57 verimle 1,9 kat (Rai *et al.* 2009), %34 verimle 41 kat (Divakar *et al.* 2011), %47 verimle 18,45 kat (Sabaet *al.* 2011), %17,3 verimle 5,57 kat (Annamalai *et al.* 2012), %18 verimle 5,05 kat (Özçelik *et al.* 2013), %7,5 verimle 5,5 kat, (Nam *et al.* 2013), %19 verimle 2,0 kat (Want *et al.* 2013) saflaştırılmıştır. Bu çalışmada DE52 kolonu ile saflaştırma işleminin sonucu %26,9 verimle 4,85 kat saflaştıma gerçekleştirildi. Literatür ile karşılaştırıldığında Miyaji *et al.* (2005) ve Rai and Mukherjee (2009)'da yapılan çalışmalara göre saflaştırma katsayısı daha yüksek olarak tespit edildi. Want *et al.* (2013)'de yaptığı çalışmaya göre hem saflaştırma hem de verim olarak daha iyi bir sonuç alındığı görülmektedir. Rai and Mukherjee (2008), Fakhfakh *et al.* (2009) yaptıkları çalışmalar ile hemen hemen uyduğu hatta daha iyi saflaştırma katsayısına sahip olduğu tespit edildi. Annamalai *et al.* (2012), Özçelik *et al.* (2013), Nam *et al.* (2013) tarafından yapılan çalışmalar ile yüzde verim sonuçlarımızın daha iyi olduğunu, saflaştırma kat sayısının da çok yakın olduğu görülmektedir. Literatür ile karşılaştırıldığında sonuçların uyumlu hatta daha iyi bir sonuç elde edildiği söylenebilir.

Fermantasyon sıvısının amonyum sülfat çöktürmesi ve diyalizden sonra Probond™ afinite kromatografisi ile ikinci bir saflaştıma işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem sonrası proteaz enzimi %19,56 verimle 17,33 kat saflaştırıldı. Bu kolon kullanılarak enzimin saflaştırma kat sayısının arttığı gösterildi. Bu kolon ile birlikte aktivite kaybı en aza indirildi. Literatürde Probond™ afinite kolonunun daha çok rekombinant protein saflaştırmak için kullanıldığı tespit edildi.

A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteaz enzimin saflığı SDS-PAGE analizinde tek bant ile teyit edildi. Saflaştırılan proteazın moleköl kütlesi hem DE52 iyon değişim kolonu hem de Probond™ afinite kolonu için 38,35 kDa olarak belirlendi. Serin proteazların moleköl kütleleri 18-35 kDa, subtilisinlerin moleköl kütleleri ise 20 ile 45 kDa arasında değişmektedir (Rao *et al.* 1998). Literatürdeki çalışmalara bakıldığında bu sonuçların

altında ve üstünde değerleri görmek mümkündür. SDS-PAGE yöntemini kullanarak molekül kütlelerini belirleyen benzer çalışmalarda Kim *et al.* (2001) 38 ve 36 kDa'luk proteaz, Jaouadi *et al.* (2008) 34 kDa, Heidari *et al.* (2008) 36 kDa, Kandasamy *et al.* (2011) 36 kDa, Jayakumar *et al.* (2012)'de 36 kDa ve Joshi and Satyanarayana (2012) 39 kDa'luk proteazlar elde etmişlerdir. Ayrıca Charles *et al.* (2008)'de *Aspergillus nidulans* HA-10'den 42 kDa'luk proteaz, Ravindran *et al.* (2011)'de *B. cereus* 1173900'dan 66 kDa'luk proteaz, Saba *et al.* (2011)'de *Stenotrophomonas* sp.'den 55 kDa'luk yüksek molekül kütlelerine sahip proteaz elde ederken Haddar *et al.* (2008)'de *B. mojavensis* A21'den 20 kDa'luk proteaz, Rai and Mukherjee (2009)'da *B. subtilis* DM-04'dan 16,9 kDa'luk proteaz gibi daha küçük molekül ağırlığına sahip proteazlar elde etmişlerdir.

A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteaz enzimin karakteristik özelliklerini belirlemek amacıyla pH ve sıcaklık profili incelendi. Bir enzimin en önemli özelliklerinden biri de maksimum aktivite gösterdiği ve dayanıklı kaldığı pH ve sıcaklık noktalarıdır. *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enzimi için optimum pH 9,0 ve stabil kaldığı pH 9,5 olarak belirlendi. Bu sonuç bize enzimin alkalın proteaz olduğunu göstermektedir. Enzimin pH 7,0-10,0 arası oldukça iyi aktivite gösterdiği ancak pH 4,0-7,5 arası düşük aktivite gösterdiği tespit edildi. Arulami *et al.* (2006)'da *B. laterosporus*-AK1'den elde ettikleri proteaz enziminin, Heidari *et al.* (2008)'de *Halobacillus karajensis*'den elde ettikleri proteaz enziminin, Jakyakumar *et al.* (2012)'de *B. pumilus* MCAS8'den elde ettikleri proteaz enziminin optimum pH'sının 9,0 olduğunu bildirmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalarda Jaouadi *et al.* (2008)'de *B. pumilus* CBS'den elde ettikleri proteazın optimum pH'sını 10,6 olarak, Shivanand and Jayaraman (2009) *B. aquimaris* strain VITP4'dan elde edilen proteazın optimum pH'sını 7,5 olarak, Joshi and Satyanarayana (2012) *B. lehensis*'den elde edilen proteazın optimum pH'sını 12,8 olarak rapor etmişlerdir. *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enzimin optimum pH'sı literatürdeki veriler ile uyumludur. Enzimin alkali pH'larda yüksek aktivite göstermesi onları deterjan endüstrisinde tercih sebebi yapar. Bu yüzden saflaştırılan proteaz enziminin alkali pH'larda aktif ve stabil olması önemlidir.

A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteaz enzimi için stabil pH 9,5'dur. Enzim oda sıcaklığında 2 saat boyunca pH 6,5'da %89,08; pH 8,5'de %91,45; pH 9,0 %84,49; pH 10,0'da %70,72 oranında aktivitesini korumaktadır. Saflaştırılan enzim aktivitesini pH 6,0-10,5 aralığında %70'den fazla korurken, pH 11,0 ve üzerindeki değerlerde koruyamadığı tespit edildi. Jaouadi *et al.* (2008)'de *B. pumilus* CBS'den elde ettikleri proteaz enzimi için stabil pH 7,0-10,6 aralığı olduğunu, 1 ve 72 saat sonra aktivitelelerinin ise %60'ından fazlasını koruduğunu rapor etmişlerdir. Haddar *et al.* (2008)'de *B. mojavenensis* A21'den elde ettikleri proteaz enzimi için 1 saat inkübasyon sonucunda stabil olduğu aralığın pH 7,0-12,0 olduğunu bildirmişler ve pH 9,0'da %90, pH 10,0'da %83, pH 11,0'de %80 ve pH 12,0'de ise %71,7 stabil kaldığını belirlemişlerdir. Bu sonuçlar ile bu çalışmada elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında 2 saat sonra daha fazla stabilite göstermesi bakımından saflaştırılan enzimin oldukça önemli bir kararlılığa sahip olduğu yorumu yapılabilir. Deepti *et al.* (2011)'de *Bacillus* sp.'den izole ettikleri proteaz enziminin 30 dakika farklı tamponlarda bekletildikten sonra stabil pH'sını 8,0-12,0 olarak, Raut *et al.* (2012)'de *Saccharopolyspora* sp. A9'dan izole edilen enzim için stabil pH'yı 7,0-12,0 olarak tespit etmişler ve bir saat inkübasyon sonrasında bu aralıktaki aktivitelelerini yaklaşık %100 muhafaza ettiklerini bildirmişlerdir. Saba *et al.* (2011)'de *Stenotrophomonas* sp.'den elde ettikleri proteaz enziminin 1 saat inkübasyon sonunda pH 6,8-12,0 arasında orjinal aktivitesinin %90'ını koruduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmadan yola çıkarak *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin daha geniş bir pH aralığında stabil kaldığı görülmektedir. Raut *et al.* (2012)'de yaptıkları çalışmada stabil pH 7,0-12,0, Jayakumar *et al.* (2012)'de yaptıkları çalışmada stabil pH'yı 6,0-11,0 aralığı olarak belirlemişlerdir. Literatürdeki önceki çalışmalar ile karşılaştırıldığında sonuçların uyumlu olduğunu ve oldukça iyi bir stabiliteye sahip olduğu görülmektedir.

A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteaz enzimi için sıcaklık profili incelendi ve optimum sıcaklık 60°C olarak belirlendi. Jaouadi *et al.* (2008)'de *B. pumilus* CBS tarafından üretilen proteaz enzimi için optimum sıcaklığı 65°C, Haddar *et al.* (2008)'de *B. mojavenensis* A21'dan saflaştırtıkları proteaz enzimi için optimum sıcaklığı 60°C, Deepti *et al.* (2011)'de *Bacillus* sp.'den elde ettikleri proteaz enzimi için optimum

sıcaklığı 60°C, Divakar *et al.* (2010)'da *Aeromonas veronii* PG01'den izole ettikleri enzim için optimum sıcaklığı 60°C olarak rapor etmişlerdir. Literatürdeki bu çalışmalarda belirlenen optimum sıcaklık değerleri, saflaştırdığımız enzimin optimum sıcaklık değeri ile örtüşmektedir. Ayrıca literatürde belirlenen diğer optimum sıcaklık değerleri şöyledir; Charles *et al.* (2008)'de *Aspergillus nidulans* HA-10 'dan saflaştırdıkları proteaz enzimi için optimum sıcaklığı 50°C, Gupta and Khare (2007)'de *Pseudomonas aeruginosa* PseA 'dan elde ettikleri proteaz enzimi için 55°C, Rai and Mukherjee (2009)'da *B. subtilis* DM-04'den elde ettikleri proteaz enzim için 45°C, Pandey *et al.* (2012)'de yaptıkları çalışma ile 50°C olarak belirlemişlerdir.

A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık kararlılığını belirlemek için 20-80°C sıcaklık aralığında 15, 30, 60. dakikalarda aktivite ölçümü yapılarak belirlendi. Enzimin sıcaklık kararlılığına bakıldığında tüm sıcaklıklarda %80'den daha fazla aktivitesini koruduğu tespit edildi. Arulami *et al.* (2006)'da *B. laterosporus*-AK1'dan elde ettikleri proteaz enzimi için en yüksek sıcaklığı 75°C'de gösterdiği ve 30 dakika sonra hızlıca aktivitesini kaybettiğini bildirmişlerdir. Gupta and Khare (2007)'de *Pseudomonas aeruginosa* PseA ile yaptıkları çalışmada 45, 50, 55°C'lerde 30 dakika sonunda başlangıçtaki aktiviteden geriye kalan aktivitenin sırasıyla %100, %91, %80 olduğunu belirtmişlerdir. Oysaki *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin 40°C bir saat sonunda başlangıçtaki aktivitesinin %92,06'sını ve 50°C'de 1 saat sonunda başlangıçtaki aktivitesinin %81,81'ini muhafaza ettiği tespit edildi. Charles *et al.* (2008)'de *Aspergillus nidulans* HA-10'dan elde ettikleri proteaz enzimi 1 saat inkübasyon sonucunda 70°C'de en düşük aktiviteyi gösterdiğini ve 80°C'de inaktif olduğunu belirlemişlerdir. Heidari *et al.* (2008)'de yaptıkları çalışma ile saflaştırdıkları enzimin 60°C üstünde aktivitesini kaybettiğini bildirmişlerdir. Divakar *et al.* (2010)'da *Aeromonas veronii* PG01'den izole ettikleri enzimin 70°C'de 1 saat sonunda aktivitesinin %53'ünü koruduğunu, 40°C'de 5 saat sonra %85 ve 50°C'de 5 saat sonra %65 aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir. Jayakumar *et al.* (2012)'deki çalışmalarında 30-70°C sıcaklık aralığında 30 dakika sonunda aktivitelerini %50 koruduklarını rapor etmişlerdir. Annamalai *et al.* (2012)'de *B. halodurans* CAS6'dan elde ettikleri proteaz enzimin 1 saatlik inkübasyon sonucunda 70°C'de %100, 80°C'de

%83 ve 95°C'de %40 aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin 70°C'de 1 saat sonunda %105,45; 80°C'de %96,45 aktivite gösterdiği belirlendi. Ayrıca sıcaklık arttığında aktivitede kısmi bir artış gözlemlendi ve literatür ile karşılaştırıldığında benzer bir sonuç olmadığı tespit edildi. Tüm bu sonuçlar, *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklığa karşı uzun süre oldukça yüksek seviyede bir kararlılık sergilediğini göstermektedir ve literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında sıcaklığa toleransının oldukça fazla olduğu açıktır. *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin bu yönüyle yüksek sıcaklıklarda uzun süre kararlılık gerektiren ticari uygulamalar için tercih sebebi olmaya aday bir enzim olduğu görülmektedir.

A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteaz enzimine metal iyonlarının etkisi incelendiğinde; 1, 5, 10 mM'lık konsantrasyonlarında Ca^{+2} ve Mg^{+2} metallerinin enzimin aktivitesini artırdığı tespit edildi. 1 ve 5 mM'lık konsantrasyonlarda Ag^{+} ve K^{+} metallerinin enzimi aktive ettiği 10 mM'lık konsantrasyonlarda %90 aktivitesini koruduğu belirlendi. Enzimin 1 mM'lık konsantrasyonlardaki Fe^{+2} ve Ni^{+2} metalleri tarafından aktive edildiği belirlendi. Bununla birlikte Zn^{+2} metalinin 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarında enzimi aktive ettiği tespit edildi. Co^{+2} ve Mn^{+2} gibi ağır metallerin her üç konsantrasyonunda, enzim aktivitesinin, yaklaşık %80'in den fazlasını koruduğu gösterildi. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde; Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} metallerinin varlığında enzimin aktive olduğunu, Rao *et al.* (2008)'de, Divakar *et al.* (2010)'da, Annamalai *et al.* (2012)'de yaptıkları çalışmalarda göstermişlerdir. Özellikle Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonları tarafından enzimin aktive olması literatürdeki diğer tüm çalışmalarda gösterilmiştir. Ca^{+2} metali diğer birçok enzimde de uyarıcı ve koruyucu göreve sahiptir özellikle enzimin termostabilitesini artırmak için yapılan çalışmalarda tercih edilmiştir. *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enzimi literatürdeki bu çalışmalar ile benzerlik gösterdiği belirlendi. Haddar *et al.* (2008)'de *B. mojavensis* A21'den izole ettikleri enzimin aktivitesinin, 5 mM'lık K^{+} metali varlığında etkilenmediğini ve Zn^{+2} metalinin ise aktivitesini %70 inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Rao *et al.* (2008)'de *B. circulans*'dan izole ettikleri enzimin, 10 mM'lık Zn^{+2} metali varlığında aktivitesini %96 koruduğunu belirtmişlerdir. Rai and Mukherjee (2008)'de *B. subtilis* strain DM-04'den

izole ettikleri enzimin aktivitesinin Ni^{+2} , Mg^{+2} ve Cu^{+2} metalleri varlığında inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Jayakumar *et al.* (2012)'de *B. pumilus* MCAS8'den izole ettikleri enzim aktivitesi üzerine Fe^{+2} ve Zn^{+2} metallerinin güçlü inhibisyon etki gösterdiklerini bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada saflaştırılan proteaz enziminin literatürde ki bu çalışmalar ile karşılaştırdığımızda Fe^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} ve K^{+} metalleri varlığında daha iyi değerlere sahip olduğu görülmektedir.

Organik çözücüler varlığında kararlılığını koruyan enzimlerin sulu ya da susuz ortamlarda biyokatalizör olarak kullanılmaları oldukça önemlidir. Bu yüzden organik çözücülerde uzun süre kararlı kalabilen enzimler sentetik biyoteknolojik uygulamalarda potansiyel olarak kullanılmaktadır. Yaptığımız çalışmada *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi incelendiğinde enzimin önemli derecede kararlılık gösterdiği tespit edildi. Enzimin %15'lik konsantrasyona sahip etanol çözeltisinde %93, aseton çözeltisinde %86, DMSO çözeltisinde %84, bütanol çözeltisinde %93, kloroform çözeltisinde %95 ve izopropanol çözeltisinde %90 oranında aktivitesini 1 saat boyunca koruduğu görüldü. %25'lik konsantrasyona sahip etanol ve metanol çözeltilerinin, 1 saat sonunda enzimin aktivitesini artırdığı diğer organik çözücülerde ise yaklaşık %70-80 oranında aktivitesini koruduğu tespit edildi. Belirtilen organik çözücülerin %50'lik konsantrasyonlarında enzimin aktivitesini, 1 saat sonunda etanolde %103, DMSO %95, metanolde %80 oranında, bütanol, kloroform ve izopropanol çözeltilerinde ise yaklaşık %50 oranında koruduğu belirlendi. %15'lik konsantrasyonlarda 24 saat sonunda metanol, etanol, aseton, DMSO, bütanol, kloroform varlığında sırasıyla %83, %90, %102, %85, %58, %74, %90 oranında enzim aktivitesini koruduğu tespit edildi. %25'lik konsantrasyonlarda 24 saat sonunda metanol, etanol, aseton, DMSO, bütanol, kloroform varlığında sırasıyla %50, %75, %72, %102, %64, %96, %62 oranında enzimin aktivitesini koruduğu görüldü. %50'lik konsantrasyonlarda belirtilen organik çözücülerde 24 saat sonunda enzim kararlılığını koruyamadığı için sonuçlar belirtilmedi. Literatürde Rai and Mukherjee (2008)'de yaptığı çalışmada *B. subtilis* strain DM-04'dan izole ettikleri proteaz enziminin aktivitesi üzerine %20'lik organik çözücülerin etkisini incelemiş ve izopropanol, etanol ve metanolde sırasıyla %102, %97

ve %105 aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir. Divakar *et al.* (2010)'da *Aeromonas veronii* PG01'dan saflaştırdıkları proteaz enziminin aktivitesini %25'lik konsantrasyonlardaki organik çözücüler varlığında 2 ve 5 saat sonra ölçmüşlerdir. 2 saat sonunda DMSO ve metanolde enzim aktivitesinde sırasıyla %650 ve %280 artış gözlemlenmiştir. Ancak etanol, izopropanol ve bütanol varlığında 2 saat sonunda sırasıyla %34, %13, %10 oranında aktivitelerini koruyabildiğini tespit etmişlerdir. 5 saat sonunda DMSO, metanol, etanol, izopropanol ve bütanol varlığında enzimin sırasıyla %41, %19, %25, %6, %5 oranında kararlılığını koruyabildiğini göstermişlerdir. Bu çalışma ile yaptığımız çalışmada saflaştırdığımız proteaz karşılaştırıldığında organik çözücüler varlığında *A. pallidus* C10'dan elde ettiğimiz proteazın çok daha uzun sürede daha fazla kararlı olduğu sonucuna ulaşıldı. Raut *et al.* (2012)'de *Saccharopolyspora* sp. A9'dan elde ettikleri proteazı 1:3 oranında bazı organik çözücüler varlığında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyona bırakarak enzimin aktivitesi üzerine etkisini incelemişlerdir. Enzimin n-decan, n-hekzan ve ksilen de enzimin oldukça kararlı olduğunu tespit etmişlerdir. Enzim 24 saat sonunda bütanol varlığında %36, etanol varlığında %28 ve metanol varlığında %24 oranında kararlı kalabilmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında *A. pallidus* C10'dan elde ettiğimiz proteazın Raut *et al.* (2012)'de *Saccharopolyspora* sp. A9'dan elde edilen proteazdan organik çözücülere karşı daha iyi kararlılık gösterdiği görüldü. Literatürdeki bir başka çalışmada Jayaykumar *et al.* (2012)'de *B. pumilus* MCAS8'den elde ettikleri proteazın ise %5'lik etanolde 1 saat sonunda %27, metanolde %6, asetonda %52 ve DMSO'da %63 oranında kararlılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu verilerden; *A. pallidus* C10'dan elde ettiğimiz proteazın DMSO, metanol, aseton ve etanol varlığında daha kararlı olduğu görüldü. Joshi and Satyanarayana (2012)'de *B. lehensis*'den elde ettikleri rekombinant alkalın proteazın %5'lik metanolde 1 saat sonunda %115 ve %10'luk etanolde 1 saat sonunda %187, izopropanolde %193, metanolde %144 oranında aktive ettiğini rapor etmişlerdir. Fakat %5'lik bütanolde %21, kloroformda %77 oranında kararlı kaldığını %10'luk konsantrasyonlar da ise bütanolde %30 ve kloroformda %47 oranında kararlı olduğunu bildirmişlerdir. Bu veriler, *A. pallidus* C10'dan elde ettiğimiz proteazın daha iyi kararlılık sergilendiğini göstermektedir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde *A. pallidus* C10'dan elde edilen proteaz enziminin organik çözücüler varlığında daha iyi kararlılık sergilemesinden dolayı endüstride sentetik uygulamalarda kullanılabilir olduğu sonucuna ulaşıldı. Bu

çalışmada elde ettiğimiz proteaz enziminin bu yönüyle büyük avantaja sahip olduğu söylenebilir.

A. pallidus C10'dan elde edilen proteaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi incelendi. Saflaştırılan proteaz enziminin katalitik etkisini gösterdiği aktif bölgesinin tanımlanması için 1 ve 5 mM'lık PMSF, EDTA, DTNB, β -merkaptoetanol kullanıldı. Enzimin 5 mM'lık PMSF varlığında tamamen inhibe olması, saflaştırılan enzimin serin proteaz ailesine ait olduğunu göstermektedir. Enzimin 5 mM EDTA varlığında aktivitesini muhafaza etmesi, enzimin kataliz için metal kofaktöre ihtiyacı olmadığını göstermektedir. Enzimin EDTA varlığında aktivitesini muhafaza etmesi deterjan endüstrisinde kullanılması açısından oldukça önemlidir. Çünkü EDTA gibi şelatlayıcı ajanlar, deterjan formülasyonlarında en çok bulunan bileşenlerdir. EDTA birçok deterjan ürününde suyun yumuşatılmasında ve lekelerin çıkarılmasında yardımcı olur. Özellikle deterjan çözeltilerinde kullanılmayacak halde olan metal iyonlarını şelatlayıcı ajan olarak kullanılmaktadır (Haddar *et al.* 2008). Saflaştırılan bu proteazın EDTA varlığında yüksek kararlılık göstermesi deterjan katkı maddesi olarak kullanılabilir olması avantajına sahip olduğunu gösterir. β -merkaptoetanol varlığında enzimin aktivitesindeki şiddetli artış enzimin tiyol bağımlı olduğunu göstermektedir. Literatürde Raut *et al.* (2012)'de *Saccharopolyspora* sp. A9'dan elde ettikleri proteaz 5 mM PMSF varlığında tamamen inhibe olmuşken, EDTA varlığında aktivitesini %95 koruduğunu göstermişlerdir. Jayakumar *et al.* (2012)'de *B. pumilus* MCAS8'den elde ettikleri proteaz enziminin 1 mM PMSF varlığında aktivitesi güçlü şekilde inhibe olurken, EDTA varlığında aktivitesinin %74'ünü koruduğunu bildirmişlerdir. Paggianni and Sergelidis (2014) *Penicillium nalgiovense*'den elde ettikleri proteaz PMSF varlığında tamamen inhibe olurken EDTA varlığında %87 aktivitesini muhafaza ettiğini bildirmişlerdir. Bu literatür verileri ile karşılaştırıldığında, çalışmada saflaştırılan enzimin tiyol bağımlı serin proteaz olduğu tespit edildi. EDTA varlığında yüksek kararlılığa sahip olması ile de bir avantaja sahip olduğu belirlendi.

A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin üzerine yüzey aktif maddelerin etkisini ve okside edici ajanın etkisini incelemek için %1-5'lik konsantrasyonlarda SDS,

Tween-20, Tween-80, Triton-X-100, ve H₂O₂ kullanıldı. Yapılan çalışma sonucunda %1'lik Tween-20, Tween-80, Triton-X-100 ve SDS varlığında enzim aktivitesini sırasıyla %20, %31, %41 ve %79 muhafaza ettiği tespit edildi. %5'lik Tween-20, Tween-80, Triton-X-100 ve SDS varlığında ise enzim aktivitesini sırasıyla %37, %29, %63 ve %116 muhafaza ettiği belirlendi. Enzimin okside edici ajan H₂O₂ varlığında ise kararlılığını koruyamadığı tespit edildi. Joo *et al.* (2000)'de *Periserrula leucophryna*'dan elde ettikleri proteaz enzimin aktivitesini %1 Triton-X-100 varlığında %93, %1 Tween-20 varlığında %92 ve %1 SDS varlığında ise %97 oranında koruduğunu belirlemişlerdir. Triton-X-100 ve Tween-20'nin %5'lik konsantrasyonlarında bir değişiklik gözlenmezken SDS varlığında %55 aktivitesini koruyabildiğini rapor etmişlerdir. Bu çalışma ile *A. pallidus* C10'dan elde edilen proteaz karşılaştırıldığında, Triton-X-100 ve Tween-20 varlığında aktivitesini koruyamadığı %5 SDS varlığında ise Joo *et al.* (2000)'de *Periserrula leucophryna*'dan elde ettikleri proteaza göre daha kararlı olduğu gösterildi. Jaouadi *et al.* (2008)'de *B. pumilus* CBS'den elde ettikleri proteaz enziminin %1-5 Triton-X-100, Tween-80 ve %1 SDS varlığında oldukça kararlı olduğunu rapor etmişlerdir. Haddar *et al.* (2008)'de *B. mojavensis* A21'den saflaştırdıkları proteaz aktivitesini %1'lik Triton-X-100, Tween-80, SDS, H₂O₂ varlığında sırasıyla %85, %100, %50 ve %79,4 muhafaza ettiğini bildirmişlerdir. %5'lik Triton-X-100, Tween-80, H₂O₂ varlığında ise enzim aktivitesini sırasıyla %72,7, %96,4, %41,4 muhafaza ettiğini rapor etmişlerdir. Rao *et al.* (2008)'de *B. circulans*'dan elde ettikleri proteaz enzimi, %1 Triton-X-100 ve Tween-20 varlığında sırasıyla %15, %20 oranında aktivite artışı gösterirken, %1 SDS varlığında ise enzimin aktivitesinin %75'ini koruduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmalar incelendiğinde enzimin %1-5 SDS varlığında gösterdiği kararlılığa bakarak SDS varlığında enzimin daha iyi bir kararlılık sergilediği belirlendi. Literatürde SDS varlığında kararlı enzimlerin olduğu çalışmaların sayısı az olup, yapılan bu çalışmadan saflaştırılan proteaz enziminin SDS varlığında yüksek kararlılığa sahip olması önemlidir. Divakar *et al.* (2010)'da *Aeromonas veronii* PG01'ile yaptıkları çalışma ile Triton-X-100, Tween-20, Tween-80 yüzey aktif maddelerin %0,25, %0,5'lik konsantrasyonlarında proteaz enziminin aktivitesini artırıcı yönde etki yaptığını bildirmişlerdir. SDS'nin %0,25, %0,5'lik konsantrasyonlarında proteaz enzim aktivitesini sırasıyla %88, %80 koruduğunu rapor etmişlerdir. Literatürde Nam *et al.* (2013)'de yaptığı çalışmada %1

SDS varlığında enzimin inhibe olduğunu göstermişlerdir. Jayakumar *et al.* (2012)'de *B. pumilus* MCAS8'den elde ettikleri proteazın aktivitesi üzerine %5 SDS varlığında %20 artış gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Joshi and Satyanarayana (2012)'de yaptıkları çalışmada *B. lehensis*'den elde ettikleri proteaz enzimin aktivitesi üzerine %2'lik SDS'nin, %59 oranında artırdığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar ile *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin, SDS varlığında aktivitesini koruması ve %5'lik konsantrasyonda ise aktiviteyi artırması ile örtüşmektedir. Yapılan çalışma sonucunda saflaştırılan enzimin Tween-20, Tween-80, Triton-X-100 ve H₂O₂ varlığında kararlılığını koruyamadığı belirlendi.

A. pallidus C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara olan spesifitesini belirlemek amacıyla %0,65'lik (w/v) BSA, kazein, azokazein, jelatin ve hemoglobin kullanılması ile yapılan aktivite ölçümleri sonucunda enziminin en iyi kazein varlığında aktivite gösterdiği tespit edildi. Enzimin diğer substratların karşısında spesifitesi sırasıyla jelatin (%25), azokazein (%15), BSA (%5) ve hemoglobin (%0) olarak belirlendi. Joo *et al.* (2000)'de benzer çalışmada, aktiviteyi kazein (%100), BSA (%37), albumin (%10), jelatin (%7) şeklinde elde etmişlerdir. Arulami *et al.* (2006)'da *B. laterosporus*-AK1'dan elde ettikleri enzimin substrat spesifitesinin sırasıyla kazein (%100), azokazein (%85), albümin (%58), BSA (%52), jelatin (%22) olduğunu rapor etmişlerdir. Jaouadi *et al.* (2008)'de *B. pumilus* CBS'den elde ettikleri proteazın doğal substratlara ilgisini sırasıyla kazein (%100), BSA (%52), jelatin (%95), azokazein (%80) olarak bildirmişlerdir. Divakar *et al.* (2010)'da *Aeromonas veronii* PG01'den elde ettikleri proteaz enzimi için benzer çalışmada substrat spesifitesini kazein (%100), jelatin (%83) ve BSA (%45) olarak tespit etmişlerdir. Jayakumar *et al.* (2012)'de *B. pumilus* MCAS8'den elde ettikleri proteaz enziminin kazeine (%100), jelatine (%84), hemoglobine (%71), BSA (%55) ve azokazeine (%40) şeklinde spesifite gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu çalışmaların sonuçları proteazın en iyi aktiviteyi kazeine karşı gösterdiğini ve diğer substratlara azalan oranlarda ilgisinin olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlarda bizim çalışmamızla hemen hemen örtüşmektedir.

Bu çalışmada *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enzimi için kazein varlığında kinetik parametreleri K_M ve V_{max} değerleri Lineweaver-burk grafiği kullanılarak sırasıyla 0,197 mg/ml ve 7,29 $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{dak}^{-1}$ olarak bulundu. K_M (Michaelis-Menten sabiti), enzimin substrata ilgisini gösteren bir ölçüttür. Rao *et al.* (2008)'de *B. circulans*'dan elde ettikleri proteazın K_M değerini 0,597 mg/ml, V_{max} değerini 13825 $\mu\text{mol.min}^{-1}$, Deepti *et al.* (2011)'de *Bacillus* sp. ile yaptıkları çalışma ile K_M değerini 0,57 mg/ml, V_{max} değeri 445.2 U/ml, Pandey *et al.* (2012)'de yaptıkları çalışmada K_M değerini 0,001 g/ml, V_{max} değerini 1660 U/ml, Joshi and Satyanarayana (2012)'de yaptıkları çalışmada K_M değerini 0,35 mg.ml^{-1} , V_{max} değerini 7 $\text{nmol.mg}^{-1}\text{sec}^{-1}$ olarak hesaplamışlardır. Literatür verileri ile karşılaştırıldığında, *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin substrata ilgisinin daha fazla olduğu görüldü.

Bu çalışmada *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enzimi üzerine ticari olarak satılan deterjanların etkisi incelendi. Bunun için T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆, T₇ markalı deterjanlar kullanıldı. Enzim aktivitesinin'de T₁, T₂, T₃, T₄, T₆ sırasıyla %242,46, %643,90, %417,07, %92,68, %373,17 oranlarında arttığı tespit edildi. Enzimin aktivitesindeki şiddetli artıştan dolayı bahsi geçen deterjanlar ile enzimin son derece iyi uyumluluk göstermesinden kaynaklanabilir. Liteartürde yapılan Arulami *et al.* (2006) yılında yaptıkları çalışmada 60°C'de 1 saat inkübasyon sonunda Ariel varlığında %75 aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir. Haddar *et al.* (2008)'de yaptıkları çalışmada 30°C'de 1 saat inkübasyon sonucunda Ariel'de %90 aktivitesini koruduğunu 50°C'de 1 saat inkübasyon sonucunda Ariel'de %80 aktivitesini koruduğunu tespit etmişlerdir. Rai and Mukherjee (2008)'de yaptıkları çalışma ile elde ettikleri enzimin 37°C'de 1 saat inkübasyonda Ariel'de %60 aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Joshi and Satyanarayana (2012)'de yaptıkları çalışma ile enzimin %0,5'lik Ariel çözeltisinde stabil, %1'lik Ariel çözeltisinde ise %80 aktivitesini koruduğunu tespit etmişlerdir. Raut *et al.* (2012)' de yaptıkları çalışmada ise 48 saat sonra Ariel'in %50 aktivitesini koruduğunu tespit etmişlerdir. Literatür ile karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar saflaştırılan enzimin ticari olarak satılan deterjanlar için oldukça iyi bir katkı maddesi olabileceğini göstermektedir.

Özetle; bu çalışmada kullanılan *A. pallidus* C10 yeni bir suş olup yüksek proteaz aktivitesine sahiptir. Yapılan literatür taraması sonucunda yapılan çalışmaların daha çok suşu tanımlama, morfolojik ve biyokimyasal özelliklerini belirlemeye yönelik olduğu tespit edilmiştir. Bu tez çalışması, bu suş üzerinde yapılan enzimler ile alakalı ilk çalışmadır. *A. pallidus* C10 'dan alkalın proteaz enzimi ilk aşama olarak amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi olarak saflaştırıldı. Daha sonraki aşamada DE52 anyon değişim kromatografisi ve Probond™ afinite kromatografisi ile iki farklı teknik kullanılarak sonuçlar karşılaştırıldı. DE52 anyon değişim kromatografisi ile %26,9 verimle 4,85 kat, Probond™ afinite kromatografisi ile de %19,56 verimle 17,33 kat saflaştırma gerçekleştirildi. Bu saflaştırma sonuçları literatür ile karşılaştırıldığında örtüşmektedir ve hatta bazı çalışmalara göre daha yüksek verim elde edildi. Enzimin optimum sıcaklık ve optimum pH'sı sırasıyla 60°C ve 9,0 olduğu tespit edildi. Enzimin pH stabilitesine bakıldığında 7,0 ile 10,0 aralığında kararlılığını muhafaza ettiği görüldü. *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan enziminin 20-80°C sıcaklık aralığında 1 saat inkübasyon sonucunda enzim aktivitesinin %80'inden fazlasını koruması ile literatürdeki benzer çalışmalardan daha iyi bir sonuç verdiği görülmektedir. Özellikle 60, 70 ve 80°C sıcaklıklarında önceden yapılan benzer çalışmalara göre daha kararlı olduğu tespit edildi. Enzim metal iyonları ile farklı konsantrasyonlar da muamele edildiğinde Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Ni^{+2} , Ag^{+} ve K^{+} tarafından aktiveyi artırıcı ve Mn^{+2} ve Co^{+2} varlığında da yüksek stabilite gösterdiği tespit edildi. Yaptığımız çalışmada saflaştırılan alkalın proteaz enziminin organik çözücüler varlığında etkisi incelendiğinde %70'den fazla kararlılık göstermesi ile literatürdeki benzer çalışmalara göre enzimin daha dayanıklı olduğu belirlendi. Okside edici ajan ve yüzey aktif maddeler varlığında enzimin aktivitesinde kayıplar gözlemlendiği belirlendi. Serin spesifik inhibitörü olan PMSF ile enzimin tamamen inhibe olması enzimin, serin proteaz olduğunu göstermektedir. *A. pallidus* C10'dan saflaştırılan proteaz enziminin en iyi substrat spesifitesini kazeine karşı gösterdiği ve K_M değerinin literatürdeki diğer çalışmalara göre daha düşük olduğu ve dolayısıyla substrata olan ilgisinin daha fazla olduğu tespit edildi. Ayrıca enzimin EDTA, SDS ve ticari olarak satılan deterjanlar varlığında stabilitesini koruması onun iyi bir deterjan katkı maddesi olarak endüstriyel alanda kullanım potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Anbu, P., 2013. Characterization of solvent stable extracellular protease from *B. koreensis* (BK-P21A). *International Journal of Biological Macromolecules*, 56 (2013), 162–168.
- Annamalai, N., Rajeswari, M.V., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T., 2012. Optimization, purification and characterization of novel thermostable, haloalkaline, solvent stable protease from *B. halodurans* CAS6 using marine shellfish wastes: a potential additive for detergent and antioxidant synthesis. *Bioprocess Biosyst Eng*, (2013) 36, 873–883.
- Arostoo, B.D., and Zahrami, K., 2012. Screening and isolation of an organic solvent tolerant-protease from *Bacillus sp.* JER02: Activity optimization by response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 89,15–23.
- Arulmani, M., Aparanjini, K., Vasanthi, K., Arumugam, P., Arivuchelvi, M., Kalaichelvan, P.T., 2006. Purification and partial characterization of serine protease from thermostable alkalophilic *Bacillus laterosporus*-AK1. *World J Microbiol Biotechnol*, 23, 475–481.
- Asokon, S., and Jayanthi, C., 2010. Alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans*. *Journal of Cell and Tissue Research Vol.*, 10 (1), 2119-2123.
- Bachmann, R., 2003. *Industrial Biotechnology – New Value-Creation Opportunities*. McKinsey & Co., Presentation at the Bio-Conference, New York.
- Basu, B.R., Banik, A.K., Das, M., 2007. Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillus niger* AB100 grown on fish scale. *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 449–455.
- Başağa, H., Çetindamar D., 2000. Uluslararası Rekabet Stratejileri: Biyoteknoloji. TÜSİAD Rekabet Stratejileri Dizisi-7, Yayın No: TÜSİAD-T/2000-12/289. 31-56.
- Beg, K.Q., Gupta, R., 2003. Purification and Characterization of an Oxidation- Stable, Thiol-Dependent Serine Alkaline Protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 294-304.
- Boyce, A., and Walsh, G., 2007. Production, purification and application-relevant characterization of an endo-1,2 (4)- β -glucanase from *Rhizomucor miegei*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76, 835-841.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–251.
- Brock, T.D., 2001. Chapter I: The Origins of Research Thermophiles. (Ed: Reysenbach A-L, Voytek M. Mancinelli, R. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. (218).
- Bugg, T., 1996. *An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*. Blackwell Science, 657-689.
- Cera, D.E., 2009. Serine proteases. *IUBMB Life*, 61 (5), 510-515.
- Charles, P., Devanathan, V., Periasamy, A., Ponnuswamy, M.N., Kalaichelvan, P.T., Hur, B., 2008. Purification, characterization and crystallization of an

- extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. *Journal of Basic Microbiology*, 48, 347–352
- Cihan, A.C., Ozcan, B., Tekin, N., Cokmus, C., 2011. Phylogenetic diversity of isolates belonging to genera *Geobacillus* and *Aeribacillus* isolated from different geothermal regions of Turkey. *World J Microbiol Biotechnol*, 27, 2683–2696.
- Çanakçı, S., 2003. Gönen, Kestanbol ve Diyardin kaplıcalarından termofilik bakteriler izolasyonu, moleküler yöntemlerle karakterizasyonu ve tanımlanması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karadeniz Teknik Üniversitesi.
- Çırakoğlu, B., 2009. Biyoteknolojideki Gelişmelerin Temel Prensipleri ve Sanayiye Uygulamaları, 176-324, İzmir.
- Dadı, Ş., 2012. *Clostridium botulinum* TİP A'dan Proteaz Enziminin Kısmi Olarak Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Dash, C., Kulkarni, A., Dunn B., Rao, M., 2003. Aspartic Peptidase Inhibitors: Implications in Drug Development. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 38 (2), 89–119.
- Deepti, J., Imran, P., Sanjiv, K.M., Anupama, S., Sandhya, M., 2011. Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from *Bacillus* sp.: A potential additive for laundry detergents. *Bioresource Technology*, 115, 228–236.
- Deshpande, V.V., Rao, M., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 62, No.3, p. 597-635.
- Divakar, K., Priya, J.D.A., Gautam, P., 2010. Purification and characterization of thermostable organic solvent-stable protease from *Aeromonas veronii* PG01. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66, 311–318.
- Dubey, V.K., Pande, M., Singh, M.P., Jagannadham, M.V., 2007. Papain like proteases: application of their inhibitors. *African Journal of Biotechnology*, 6 (9), 1077-1086.
- EFB, 1999. Environmental Biotechnology, European Federation of Biotechnology Task Group on Public Perceptions of Biotechnology, Briefing Paper No: 4. Ferrero, M.A., Castro, G.R., Abate, C.M., Baigori, M.D. and Sineriz, F. 1996. Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 45, 327-332.
- Fakhfakh, N., Kanoun, S., Manni, L., Nasri, M., 2009. Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather-degrading *Bacillus licheniformis* RPK. *Can. J. Microbiol*, 55, 427–436.
- Ferrero, M.A., Castro, G.R., Abate, C.M., Baigori, M.D. and Sineriz, F. 1996. Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 45, 327-332.
- Genckal, H., Tari, C., 2006. Alkaline protease production from alkaliphilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 703-710.
- Gessese, A., 1999. Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable α -amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. *Enzyme Microbial Technology*, 25, 433-438.
- Gisha, G.P., 2014. Serine protease. S3 MSc Biotechnology, www.slideshare.net/puliyoor/serine-protease (12.10.2014).

- Grudkowska, M., and Zagdańska, B., 2004. Multifunctional role of plant cysteineproteinases. *Acta Biochimica Polonica*, 51(3), 609-624.
- Gupta, A., and Khare, S.K., 2005. A protease stable in organic solvents from solvent tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresource Technology*, 97, 1788–1793.
- Gupta, A., and Khare, S.K., 2007. Enhanced production and characterization of a solvent stable protease from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Enzyme and Microbial Technology*, 42 (2007), 11–16.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P., 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59,15–32.
- Güven, R.G., 2011. Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açından Önemli Bazı Enzimleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 09, 1-10.
- Haddar, A., Bougatef, A., Agrebi, R., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M., 2008. A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization. *Process Biochemistry*, 44, 29–35.
- Heidari, H.R.K., Amoozegar, M.A., Hajighasemi, M., Ziaee, A.A., Ventosa, A., 2008. Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium *Halobacillus karajensis*. *J. Ind. Microbiol Biotechnol*, 36, 21–27.
- Higgen, M., Sharma T., Wharburg T., 1985. *Biotechnology*. Thomson Pres, Newyork.
- Horikoshi, K., 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 735-750.
- Jaouadi, B., Ellouz-Chaabouni, S., Rhimi, M., Bejar, S., 2008. Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. *Science Direct Biochimie*, 90, 1291-1305.
- Jayakumar, R., Shanmugam, J., Balumuri, A., Sundaram, S., 2012. Characterization of thermostable serine alkaline protease from an alkaliphilic strain *Bacillus pumilus* MCAS8 and Its Applications. *Appl Biochem Biotechnol*, 168, 1849–1866.
- Johnvesly, B.I., Naik, G.R., 2001. Studies on Production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a Chemically Defined Medium. *Process Biochemistry*, 37, 139-144.
- Joo, H.G., Park, G.C., Kim, K.M., Paik, S.R., Chang, C.S., 2000. Novel alkaline protease from the polychaeta, *Periserrula leucophryna*: Purification and characterization. *Process Biochemistry*, 36 (2001), 893–900.,
- Joo, H.S., and Chang C.S., 2004. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from a halo-tolerant *Bacillus clausii* I-52: enhanced production and simple purification. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 491–497.
- Joshi, S. and Satyanarayana, T., 2012. Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium *Bacillus lehensis*. *Bioresource Technology*, 131 (2013), 76–85.
- Kandasamy, N., Punitha, V., Amsamani, S., Rao, J.R., Chandrasekaran, B., Thanikaivelan, P., 2011. Eco-benign enzymatic dehairing of goatskins utilizing a protease from a *Pseudomonas fluorescens* species isolated from fish visceral waste. *Journal of Cleaner Production*, 25, 27-33.

- Kazan, D., Denizci, A.A., Öner, M.N.K., Erarslan, A., 2005. Purification and characterisation of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42. J.Ind. Microbiol. Biotechnol, 32, 335-344.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009. Biyokimya. Aktif yayınevi, 89-137, Erzurum Yayını-Ankara.
- Kikani, B.A., Shukla, R.J., Singh S.P., 2010. Biocatalytic potential of thermophilic bacteria and actinomycetes. Department of Biosciences, Saurashtra University, Rajkot- 360 005, India.
- Kim, S., Lee, D., Cheigh, C., Choe,E., Lee, S., Hong, Y., Choi,H., Pyun, Y., 2006. Purification and characterization of a fibrinolytic subtilisin-like protease of *Bacillus subtilis* TP-6 from an Indonesian fermented soybean, Tempeh. J Ind Microbiol Biotechnol, 33, 436–444.
- Koçak, M., 2005. Mast hücre proteazları ve biyolojik önemi. Journal of Health Sciences, 14(1), 61-67.
- Kolankaya, N., 2000. Biyoteknolojiye Bir Bakış:Dünya ve Türkiye.“Küreselleşme Sürecinde Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik” Sempozyum Bildirileri Kitabı, 1–6 s, T.C. Çevre Bakanlığı, T.C. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı ve Biyoteknoloji Derneği Ortak.
- Kumar, C.G., H., Takagi, 1999. Microbial Alkaline Proteases: From a Bioindustrial Viewpoint , Biotechnology Advances, vol. 17, P: 561-594.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. Nature, London, 227,680.
- Langmaier, F., Mladek, M., Kolomaznik, K., Sukop, S., 2002. Isolation of elastin and collagen polypeptides from long cattletendons as raw material for hecosmetic industry. Czech Republic. P:1-9.
- Lazim, H., Houda, M., Nedra, S., Insaf, B., Ferid, L., 2009. Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902. J Ind Microbiol Biotechnol, 36, 531–537.
- Mahajan, R.T., Badgular, S.M., 2010. Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review, Journal of Pharmacy Research, 3(9), 2048-2068.
- Maury J., Asadollahi, M.A., Moller K., Clark, A., Nielsen, J., 2005. Adv Biochem Eng Biotechnol, 100, 19-51.
- Minana-Galbis, D., Pinzon, D.L., Loren, J.G., Manresa, A., Oliart-Ros, R.M., 2010. Reclassification of *Geobacillus pallidus* (Scholz *et al.* 1988) Banat *et al.* 2004 as *Aeribacillus pallidus* gen. nov., comb. nov., Int J Syst Evol Microbiol, 60, 1600-1604.
- Miyaji, T., Otta, Y., Nakagawa, T., Watanabe, T., Niimura, Y., Tomizuka, N., 2005. Purification and molecular characterization of subtilisin-like alkaline protease BPP-A from *Bacillus pumilus* strain MS-1. Letters in Applied Microbiology ISSN, 0266-8254.
- Mnif, S., Sayadi, S., Chamkha, M., 2013. Biodegradative potential and characterization of a novel aromatic-degrading bacterium isolated from a geothermal oil field under saline and thermophilic conditions. International Biodeterioration & Biodegradation, 86, 258-264.
- Nam, M.S., Whang, K.S., Choi, S.H., Bae, H.C., Kim, Y.K., Park, Y.W., 2013. Purification, characterization, and properties of an alkaline protease produced by

- Serratia marcescens* S3-R1 inhabiting Korean ginseng rhizosphere. J Sci Food Agric, 93, 3876–3882.
- Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., Saxena, R.K., Gupta, R. 2001. Characterization and wash performance analysis of an SDS-resistant alkaline protease from a *Bacillus* sp. World J Microbiol Biotechnol, 17, 493-497.
- Önal, S., 2010. Enzimler, Bölüm 8. Moleküler Biyoloji, Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B. Ankara, 249-296.
- Özçelik, B., Aytar, P., Gedikli, S., Yardımcı, E., Çalışkan, F., Çabuk, A., 2013. Production of an alkaline protease using *Bacillus pumilus* D3 without inactivation by SDS, its characterization and purification. Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry, 29(3), 388–396.
- Özden, S., 2014. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den proteaz enziminin saflaştırılması, aktivitesinin tayini ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Panda, M. K., Sahu, M.K., Tayung, K., 2013. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. with protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India, Iranian. Journal of Microbiology, 159-165, (2013).
- Pandey, S., Rakholiya, K.D., Raval, V.H., Singh, S.P., 2012. Catalysis and stability of an alkaline protease from a haloalkaliphilic bacterium under non-aqueous conditions as a function of pH, salt and temperature. Journal of Bioscience and Bioengineering, 114, 3, 251-256.
- Papagianni, M., Sergelidis, D., 2014. Purification and Biochemical Characterization of a Novel Alkaline Protease Produced by *Penicillium nalgiovense*. Appl Biochem Biotechnol, 172, 3926–3938.
- Polaina, J., and MacCabe, A.P., 2007. Industrial Enzymes Structure, Function and Applications. Springer, 161-243, Spain.
- Polgar, L., 2005. The catalytic triad of serine peptidases. Cell. Mol. Life Sci., 62, 2161–2172 .
- Radchenkova, N., Spasen, V., Ivan, P., Gianluca, A., Iva, T., Barbara, N., Margarita, K., Kaloyan, P., Margarita, K., 2013. Production and properties of two novel exopolysaccharides synthesized by a thermophilic bacterium *Aeribacillus pallidus* 418. Appl Biochem Biotechnol, 171, 31–43.
- Rahman, R.N.Z., Geok, L.P., Basri, M., Salleh, A.B., 2006. An organic solvent-stable alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: enzyme purification and characterization. Enzyme and Microbial Technology, 39, 1484-1491.
- Rai, S.K., and Mukherjee, A.K., 2009. Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. Biochemical Engineering Journal, 48, 173–180.
- Rai, S.K., and Mukherjee, A.K., 2008. Ecological significance and some biotechnological application of an organic solvent stable alkaline serine protease from *Bacillus subtilis* strain DM-04. Bioresource Technology, 100 (2009), 2642–2645.
- Rao, C.S., Sathish, T., Ravichandra, P., Prakasham, R.S., 2008. Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. Process Biochemistry, 44, 262–268.

- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 597-635.
- Raut G., Sachin, V., Ren, B., Xiang-Yang, L., Lixin, Z., Chandrakant, K., 2012. Purification and characterization of organic solvent and detergent stable protease isolated from marine *Saccharopolyspora sp.* A9: Application of protease for wound healing. *Biochemical Engineering Journal*, 69, 196– 203.
- Ravindran, B., Ganesh, K.A., Aruna, B.P.S., Sekaran, G., 2011. Solid-state fermentation for the production of alkaline protease by *Bacillus cereus* 1173900 using proteinaceous tannery solid waste. *Current Science*, 5, 100.
- Romero, F.L., Garcia, L.A., Salas, J.A., Diaz, M., and Quiros, L.M., 2001. Production, purification and partial characterization of two extra cellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. *Process Biochem*, 36, 507-515.
- Saba, I., Qazi, P.H., Rather, S.A., Dar, R.A., Qadri, Q.A., Ahmad, N., Johri, S., Taneja, S.C., Shaw, S., 2011. Purification and characterization of a cold active alkaline protease from *Stenotrophomonas sp.*, isolated from Kashmir, India. *World J Microbiol Biotechnol* 28, 1071–1079.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical calculations*. Inc., New York, 403.
- Sevinç, N., 2010. Türkiye topraklarından izole edilen *Bacillus sp.* suşlarından proteaz üretimi, kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Shah, K., Mody, K., Keshri, J., Jha, B., 2010. Purification and characterization of a solvent, detergent and oxidizing agent tolerant protease from *Bacillus cereus* isolated from the Gulf of Khambhat. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67, 85–91.
- Shivanad, P., and Jayaraman, G., 2009. Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochemistry*, 44, 1088–1094.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., 1997. *Enstrümental Analiz İlkeleri*, 1. baskı., Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., Bilim Yayıncılık, Ankara, 756-757, 800.
- Smith, E. J., 2004. *Biotechnology*. Cambridge University Pres. New York, USA.
- Sonuç, M., 2011. *Bacillus subtilis* M33'den hücre dışı alkali proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Sookkheo, B., Sinchaikul, S., Phutrakul, S., Chen, S.T., 2000. Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein Expression and Purification*, 20, 142–151.
- Takami, H., Akiba, T., Horikoshi, K., 1989. Production of extremely thermo stable alkaline protease from *Bacillus sp.* AH-101. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30, 120-124.
- Thangam, E.B., and Rajkumar, G.S., 2002. Purification and characterization of alkaline protease from *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnol. Appl. Biochem*, 35, 149–154.
- Venugopal, M., and Saramma, A., 2007. An alkaline protease from *Bacillus circulans* BM15, newly isolated from a mangrove station: characterization and application in laundry detergent formulations. *Indian Journal of Microbiology*, 47, 298-303.

- Yanmış, D., and Adıgüzel, A., 2014. Molecular typing of thermophilic Bacili isolated from different hot springs of Turkey. *Research Journal of Biotechnonology*, 9 (10).
- Wang , J., Xu, A., Wan, Y., Li, Q., 2013. Purification and characterization of a new metallo-neutral protease for Beer Brewing from *B. amyloliquefaciens* SYB-001. *Appl Biochem Biotechnol*, 170, 2021–2033.
- Whitford, D., 2005. *Proteins Structure and Function*. John Wiley & Sons, 9-37, England.
- Wiseman, A., 1987. *Hanbook of Enzyme Biotechnology*. Second Edition. Chapter The application of Enzymes in Industry, 274 – 373.
- Yasawong, M., Areekit, S., Pakpitchareon, A., Santiwatanakul, S., Chansiri, K., 2011. Characterization of thermophilic halotolerant *Aeribacillus pallidus* TD1 from Tao Dam Hot Spring, Thailand. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 5294-5303.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında İzmit'de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İzmit'de tamamladı. 2008 yılında kazandığı Erzurum Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden bölüm ikincisi olarak 2012 yılında mezun oldu. 2012-2013 Eğitim Öğretim yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.