

***Bacillus licheniformis* A10'DAN ALKALİN PROTEAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI ve
KARAKTERİZASYONU**

Bahar YILMAZ

**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

Bacillus licheniformis A10'DAN ALKALİN PROTEAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Bahar YILMAZ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2014

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

***Bacillus licheniformis* A10'DAN ALKALİN PROTEAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında Bahar YILMAZ tarafından hazırlanan bu çalışma 01/07/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı - Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.3/.3)** 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 ..08../07/2014 tarih ve ..27../...834..... 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

***Bacillus licheniformis* A10'DAN ALKALİN PROTEAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Bahar YILMAZ

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

Danışman: Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Bu çalışmada Ayder Kaplıcaları'ndan izole edilen *Bacillus licheniformis* A10'dan ekstraselüler alkalın proteaz enzimi saflaştırıldı ve karakterize edildi. Enzim saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesi-diyaliz ve DE52 anyon değişim kromatografisi yapıldı. Proteaz enzimi %9,44 verimle 1,38 kat saflaştırıldı. Enzimin SDS-PAGE ile molekül ağırlığı yaklaşık 40,55 kDa olarak tespit edildi. Enzim için optimum pH ve sıcaklık değerleri 9 ve 70°C olarak belirlendi. *Bacillus licheniformis*'e ait saflaştırılan proteaz enzim aktivitesi üzerine metallerin etkisi incelendiğinde; Mg⁺², Mn⁺², K⁺ varlığında enzimin aktivitesinin arttığı gözlenirken; Fe⁺², Zn⁺²'nin aktiviteyi azalttığı, Ca⁺²'nin ise aktivitede değişime neden olmadığı görüldü. Enzimin oksidantlar, yüzey aktif maddeleri ve organik çözücüler varlığında aktivite kaybettiği tespit edildi. Substrat spesifikliğı çalışmaları; kazein, azokazein, jelatin ve bovin serum albumin (BSA) arasında enzimin en yüksek aktiviteyi kazein için gösterdiği gözlemlendi. Enzimin serin proteaz inhibitörü fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) ile tamamen inhibe olduğu belirlendi. Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak tespit edilen K_M ve V_{max} değerleri 0,033 mg/ml ve 8,17 µmol.ml⁻¹.dk⁻¹ olarak elde edildi.

2014, 75 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Termofilik bakteri, Alkalın proteaz, *Bacillus licheniformis*, Karakterizasyon

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ALKALINE PROTEASE ENZYME FROM *Bacillus licheniformis* A10

Bahar YILMAZ

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 thesis, purification and characterization of a protease produced by *Bacillus licheniformis* A10 isolated from Ayder Hot Spring. Ammonium sulfate precipitation, dialysis and DE52 anion-exchange chromatography were performed to purify the enzyme. Protease enzyme was purified 1,38 fold with 9,44% yield. Molecular mass of the enzyme showed approximately 40,55 kDa with SDS-PAGE. Optimal pH and temperature were determined for the enzyme as 9.0 and 70°C, respectively. The effects of various metal ions (Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+}) on the protease enzyme activity were examined. According to our results, while the enzyme activity increased in the presence of Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , the enzyme activity decreased in the presence of Fe^{2+} , Zn^{2+} . However, no changes were seen in the presence of Ca^{2+} . It is also observed that the enzyme loses its activity in the presence of surfactants, oxidants and organic solvents, but show highest activity towards casein relative to other native proteins such as gelatin, ceratin, egg albumin and BSA. The enzyme was completely inhibited by PMSF which is a general serine protease inhibitor. The kinetic parameters, V_{max} and K_M , of the purified protease were determined by using Lineweaver-Burk plot 0,033 mg/ml and 8,17 $\mu\text{mol. ml}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ respectively.

2014, 75 Pages

Keywords: Thermophilic bacteria, alkaline protease, *Bacillus licheniformis*, Characterization

TEŞEKKÜR

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

Öncelikle tez çalışmamda katkı ve fikirleriyle bana yol gösteren danışmanım Sayın Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na, Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a, deneyimlerinden ve materyallerinden yararlandığım Sayın Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e, laboratuvardaki çalışmalarım sırasında yardımları için Sayın Arş. Gör. Hamit CEYLAN, Sayın Arş. Gör. Yağmur ÜNVER, Sayın Arş. Gör. Melike YILDIZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarım sırasında çok yardımını gördüğüm Sayın Arş. Gör. M. Özkan BALTAÇI'ya, grup arkadaşım Vildan YILDIRIM'a ve Yeliz DEMİR'e çok teşekkür ederim. Son olarak hayatımın her anında desteklerini benden esirgemeyen, ilgi ve sevgilerini her zaman hissettiğim sevgili aileme hep yanımda oldukları için sonsuz sevgilerimi sunarım.

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

Bahar YILMAZ

Haziran, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Biyoteknoloji.....	1
1.2. Termofiller.....	2
1.3. <i>Bacillus</i> Cinsi	3
1.3.1. <i>Bacillus licheniformis</i>	4
1.4. Enzimler	5
1.4.1. Proteazlar.....	9
1.4.1.a. Proteazların sınıflandırılması.....	10
1.4.1.b. Proteazların fizyolojik işlevleri	15
1.4.1.c. <i>Bacillus</i> proteazlarının özellikleri.....	16
1.4.1.d. Proteazların kullanım alanları	16
2. KAYNAK ÖZETLERİ	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	24
3.1. Materyal.....	24
3.1.1. Kullanılan organizma	24
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	24
3.1.3. Yararlanılan alet ve cihazlar	24
3.1.4. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	25
3.2. Yöntemler.....	31
3.2.1. Petride proteaz aktivitesinin belirlenmesi	31
3.2.2. Protein tayini	31
3.2.2.a Kalitatif protein tayini	31
3.2.2.b. Bradford yöntemiyle protein tayini	32

3.2.3. Alkalın proteaz aktivitesinin belirlenmesi.....	33
3.2.4. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması	34
3.2.5. Homojenat hazırlanması.....	34
3.2.6. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz.....	34
3.2.7. DE52 anyon değişim kromatografisi.....	35
3.2.8. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (sds-page) ile enzim saflığının kontrolü ve enzimin molekül kütlesinin tayini	36
3.2.9. Alkalın proteaz enziminin zimogram analizi	38
3.2.10. Proteaz enzimiyle ilgili yapılan kinetik çalışmalar	38
3.2.10.a Proteaz enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik çalışmalar	38
3.2.10.b. Proteaz enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik çalışmalar.....	39
3.2.10.c. Proteaz enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar	39
3.2.10.d. Proteaz enzimi için stabil sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar	39
3.2.10.e. K_M , V_{max} , k_{cat} ve özgülük sabitinin (V_0) değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar	40
3.2.11. Metallerin proteaz aktivitesi üzerindeki etkisine yönelik çalışmalar	40
3.2.12. Bazı organik çözücülerin proteaz aktivitesi üzerindeki etkisine yönelik çalışmalar.....	41
3.2.13. Proteaz aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerinin etkisinin belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	41
3.2.14. Alkalın proteaz aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanın etkisinin belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	41
3.2.15. Alkalın proteaz enziminin doğal substratlara karşı özgünlüğünün belirlenmesi	42
4. ARAŞTIRMA ve BULGULAR.....	43
4.1. Petride Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi	43
4.2. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	43
4.3. Proteaz Aktivitesi Hesaplamasında Kullanılan Tirozin Standart Grafiği	44
4.4. Proteaz Enziminin Saflaştırılma Sonuçları.....	45
4.4.1. Amonyum sülfat çöktürmesi ve sonuçları.....	45
4.4.2. DE52 anyon değişim kromatografisi sonuçları.....	46

4.4.3. DE52 kolonuyla enzim saflaştırılması sonuçları ve sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü ve enzimin molekül kütlelerinin tayini	47
4.4.4. Alkalın proteaz enziminin zimogramının belirlenmesine yönelik sonuçlar	48
4.4.5. Proteaz enziminin optimum şartlarının belirlenmesine yönelik sonuçlar	49
4.4.5.a. Proteaz enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar	49
4.4.5.b. Proteaz enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik sonuçlar.....	50
4.4.5.c. Proteaz enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik sonuçlar	51
4.4.5.d. Proteaz enzimi için stabil sıcaklığın belirlenmesine yönelik sonuçlar.....	52
4.4.5.e. K_M , V_{max} , k_{cat} ve özgülük sabitinin (V_0) değerlerinin bulunmasına yönelik sonuçlar.....	53
4.5. Metallerin Proteaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisine Yönelik Sonuçlar.....	54
4.6. Organik Çözücülerin Proteaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisine Yönelik Sonuçlar.....	57
4.6. Proteaz Aktivitesi Üzerine Bazı İnhibitörlerin Etkisinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar.....	59
4.8. Alkalın Proteaz Aktivitesi Üzerine Yüzey Aktif Maddelerin ve Okside Edici Ajanın Etkisinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar.....	59
4.9. Alkalın Proteaz Enziminin Doğal Substratlara Olan Özgülüğünün Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar.....	60
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	62
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	76

SİMGELER DİZİNİ

Asp	: Aspartik asit amino asiti
<i>B</i> -.	: <i>Bacillus</i>
BSA	: Bovin serum albumini
DEAE	: Dietilaminoetil
DFPs	: Diizopropilflorofosfat
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EU	: Enzim Ünitesi
k _{cat}	: Turnover sayısı
kDa	: Kilodalton
K _M	: Enzimin substrata ilgisini gösteren sabit
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	: Amonyum per sülfat
PMSF	: Fenilmetilsülfonilflorid
rpm	: Santrifij rotorunun ve kanştırıcıların dakikadaki devir hızı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
Ser	: Serin amino asiti
SMA	: Skim Milk Agar
TCA	: Trikloroasetik asit
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin
U	: Ünite

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Proteazların gerçekleştirdikleri hidroliz reaksiyonunun mekanizması.....	100
Şekil 1.2. Serin proteazın yapısı	122
Şekil 1.3. Sistein proteazın etki mekanizması	13
Şekil 1.4. Aspartik proteaz.....	14
Şekil 1.5. Metalloproteazın etki mekanizması.....	15
Şekil 3.1. Coomessie brillant blue G-250 boyasının kimyasal yapısı.....	32
Şekil 4.1. Petrideki proteaz aktivitesi	45
Şekil 4.2. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik	45
Şekil 4.3. Proteaz aktivitesi için standart tirozin grafiği.....	45
Şekil 4.4. Doygunluk aralığına göre amonyum sülfat çöktürme grafiği	46
Şekil 4.5. Proteaz enziminin DE52-Selüloz anyon değişim kromatografisi ile elüsyonunu gösteren grafik	47
Şekil 4.6. DE52 anyon değişim kromatografisi sonrası elde edilen proteaz enziminin SDS-PAGE fotoğrafı a, b, c, d SDS-PAGE sonrası, e Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası, f Homojenat.....	47
Şekil 4.7. SDS-PAGE sonucu çizilen Log MK-R _f grafiği	49
Şekil 4.8. <i>Bacillus licheniformis</i> A10'dan izole edilem alkali proteazın zimogram görüntüleri	48
Şekil 4.9. Proteaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği.....	49
Şekil 4.10. Proteaz enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.....	50
Şekil 4.11. Proteaz enzimi optimum sıcaklık ölçülmesi için çizilen sıcaklık-bağıl aktivite grafiği	51
Şekil 4.12. Proteaz enzimi için sıcaklık kararlılık grafiği.....	52
Şekil 4.13. Kazein substratı için K _M ve V _{max} bulunmasına yönelik 1/V- 1/[Kazein] Lineweaver-Burk grafiği	53
Şekil 4.14. Metal iyonlarının 1mM, 5mM ve 10mM'daki enzim aktivitesine etkisi grafikleri	56
Şekil 4.15. Organik çözücülerinin (%15, %25, %50) 1 ve 24 saatteki enzim aktivitelerine etkisi	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Mikroorganizmaların minimal, optimal ve maksimal üreme sıcaklıklarına göre sınıflandırılması.....	2
Çizelge 1.2. Enzimlerin sınıflandırılması	5
Çizelge 1.3. Enzimlerin kullanım alanlarına göre dağılımları.....	5
Çizelge 1.4. Ticari olarak üretilen bazı enzimler ve kaynakları	8
Çizelge 1.5. Termofilik mikroorganizmalara ait enzimlerin endüstriyel uygulama alanları	9
Çizelge 1.6. Proteazların sınıflandırılması.....	10
Çizelge 4.1. Proteaz enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite- çöktürme aralığı çizelgesi	45
Çizelge 4.2. Proteaz enziminin saflaştırma sonuçları	47
Çizelge 4.3. 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	49
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 stabil pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	50
Çizelge 4.5. Proteaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık- bağıl aktivite (%) ölçüm sonuçları çizelgesi	51
Çizelge 4.6. Proteaz enziminin sıcaklık kararlılığını belirlemek için zaman-sıcaklık- kalan aktivite (%) ölçüm sonuçları çizelgesi.....	52
Çizelge 4.7. Proteaz enzimi için K_M , k_{cat} , V_0 ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik Kazein derişimi aktivite çizelgesi.....	54
Çizelge 4.8. Metal iyonlarının <i>Bacillus licheniformis</i> A10 Alkalın Proteaz Aktivitesi üzerine etkisi.....	55
Çizelge 4.9. Organik çözücülerin <i>Bacillus licheniformis</i> A10 Alkalın Proteaz Aktivitesi üzerine etkisinin 1 ve 24 saat aralıktaki sonuçları.....	57
Çizelge 4.10. İnhibisyon çözeltilerinin <i>Bacillus licheniformis</i> A10 Alkalın Proteaz Aktivitesi üzerine yönelik çalışmalarının sonuçları	59

Çizelge 4.11. Yüzey aktif maddeleri ve okside edici ajan varlığında <i>Bacillus licheniformis</i> A10'dan izole edilen Alkalın Proteaz Aktivitesi üzerine etkisi sonuçları	60
Çizelge 4.12. Alkalın proteaz enziminin doğal substratlara olan aktivitesi.....	61

1. GİRİŞ

1.1. Biyoteknoloji

Biyoteknoloji, biyolojik organizmaların, sistemlerin veya proseslerin üretim ve hizmet endüstrilerine uygulanmasıdır (Çırakoğlu 2009). Biyoteknoloji'nin tarihi ekmek, yoğurt, peynir gibi ürünler ve alkollü içeceklerin üretimi ile başlamıştır. 19. yüzyılın ortalarında insanlar Louis Pasteur'un çalışmalarından, mikroorganizmaların fermantasyona neden olduğunu öğrenmiş ve böylece biyoteknolojinin bilincine varmışlardır (Çırakoğlu 2009).

Günümüzde enerjiden tarıma, sağlıktan çevre kirliliğiyle mücadeleye, kozmetik sanayiden madencilğe kadar çok çeşitli alanlarda biyoteknoloji yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Gelişmiş ülkelerin üretiminde, %40 oranında biyolojik ve biyoteknolojik kaynaklı maddeler yer almaktadır (Başaga ve Çetindamar 2000).

Endüstriyel biyoteknoloji şirketleri, kimyasal üretimlerde kullanmak amacıyla biyolojik sistemlerden yararlanarak enzim gibi biyokatalizörleri ya da kimyasal maddeleri üretirler. Çeşitli endüstrilerde, bazen çok yüksek ya da çok düşük sıcaklıklara bazen de çok yüksek ya da düşük pH derecelerine gereksinim duyulmaktadır. Endüstriyel biyoteknolojinin amacı, bu zor şartlarda yaşayabilecek mikroorganizmalar ve işlerliğini kaybetmeyen biyomoleküller belirlemektir. Kullanım alanı en yaygın olan ve biyoteknoloji yöntemleriyle üretilen enzimlerden bazılarının; proteinleri parçalayan proteaz, selülozu parçalayan selülaz, yağları etkileyen lipaz ve nişastayı basit şekerlere dönüştüren amilazlar olduğu bilinmektedir (Çırakoğlu 2009).

Endüstriyel biyoteknoloji gıda endüstrisinde; alkollü içecekler, mayalanmış ve fermente edilmiş ürünler, meyve suları, gıda koruyucu ve lezzet arttırıcı maddeler, sirke, süt ve süt ürünleri gibi gıda maddeleri üretimi süreçlerinin belirli aşamalarında gerekli enzimlerin geliştirilmesi ve kullanımı gibi çok geniş uygulama alanına sahiptir.

(Yücel 2010). Aynı zamanda tekstil dünyasında da biyoteknoloji, iplik ve kumaşlarla ilgili birçok işlemden kullanılır. Dokuma sırasında kumaşın zarar görmesini engellemek için kaplama yapıştırıcı olarak kullanılan nişastayı, zamanı geldiğinde sökmek için amilaz enzimi ve ayrıca derinin tüylerden temizlenmesinde de tripsin enzimi kullanılmaktadır (Çırakoğlu 2009).

1.2. Termofiller

Termofilik bakterilerin tarihi çok eskiye dayanmakta olup, ilk karakterize edilen hipertermofilik bakterileri *Thermusaquaticus*'dur. (Brock 2001). Termofilik bakteri türleri ilk kez Miquel tarafından 72°C'de çoğalabilen bakteriler olarak izole edilmiş ve bu bakteri türleri çamur, toprak, toz, nehir ve kanalizasyon numunelerinden elde edilmiştir (Josept 1999). Ekstremofilik mikroorganizmaların yüksek volkanların sıcaklıklarında, kutupların düşük sıcaklıklarında, çok düşük ve çok yüksek pH değerlerinde (pH 0-3 veya pH 10-12) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5-30) canlılığa adapte oldukları bilinmektedir (Gül-Güven 2007). Sıcaklık çevrede önemli değişkenlerden birisidir ve biyolojik sistemlerin en temel elementlerinden biri olarak kabul edilir. Mikroorganizmalar üreme sıcaklıklarına göre genel olarak psikrofil, mezofil ve termofil [ılımlı termofiller (Zorunlu ve Fakültatif), hipertermofiller (Ekstrem)] olarak sınıflandırılırlar (Kristjonsson and Stetter 1991; Adıgüzel 2006).

Çizelge 1.1. Mikroorganizmaların minimal, optimal ve maksimal üreme sıcaklıklarına göre sınıflandırılması (Arda 2000).

Mikroorganizma	Minimum °C	Optimum °C	Maksimum °C
Psikrofiller	-5-5	15-30	19-35
Mezofiller	10-15	30-45	35-47
Termofiller			
a) İlimli termofiller			
• Zorunlu Termofiller	37	45-55	70
• Fakültatif Termofiller	40-45	55-75	60-80
b) Hipertermofiller			
• Ekstrem Termofiller	60	75-80	85-110

Termofillerin hücre membranı doymuş yağ asitleri yapılarına sahip olduğundan hücreye hidrofobik bir ortam sağlar ve yüksek sıcaklıkta yaşaması için hücreyi mümkün olduğunca sıkı ve sert tutar. Termofilik organizmaların hücresel elemanları (hücre membranı) ve bileşenleri (enzimler, proteinler, nükleik asitler vb.) yüksek sıcaklığa dayanıklı yapılardır. Aynı zamanda bu organizmalar ekstrem derecede asidik ve alkali şartlar gibi denatüranlara ve proteolize dayanıklıdırlar (Kristjansson and Asgeirsson 2002; Haki and Rakshit 2003; Adıgüzel 2006).

Termofillerin DNA'sı, DNA'da pozitif süper sarmallar oluşturan geri dönüşümü (reversible) sağlayan bir DNA giraz ihtiva eder ve bu da DNA'nın erime noktasını en azından organizmanın maksimum büyüme sıcaklığına kadar yükseltebilmektedir. Termofiller ayrıca non-termotolerant organizmaların kullandığı elektrostatik disülfid köprüsü ve hidrofobik etkileşimler benzeri artan etkileşimleri kullanarak yüksek sıcaklıklara dayanıklılık göstermektedirler (Fujiwara 2002; Haki and Rakshit 2003). Yüksek sıcaklıklarda polimerik substratların çözünürlüklerinin artması ve istenmeyen komplikasyonlara neden olan kontaminasyon riskinin yüksek sıcaklıklarda azalması gibi sebepler endüstride ve biyoteknolojide termofilik organizmaların kullanımını arttırmıştır (Gül-Güven 2004).

1.3. *Bacillus* Cinsi

Bacillus cinsi içerisinde yer alan organizmalar; aerop, sporlu ve gram pozitiflerdir. Vejetatif formları düz, kenarları birbirine paralel, ucu yuvarlak veya künt biten 0,5-1,2 µm boyundadır ve tek tek veya uzun zincirler şeklinde görülmektedirler. Endosporları silindirik, oval, yuvarlak veya böbrek şekillerinde olup, türlere göre santral, terminal veya subterminal konumlarda bulunabilmektedirler. Bu cinsin üyelerinin çoğu katalaz pozitifdir. Basillerin büyük bölünmüş; basitrasın, polimiksin, tirosidin, gramisidin ve sirkulin gibi antibiyotikleri üretirp, mezofilik olanları çoğunluğu oluştururken, termofil, psikrofiik, asidofil ve halofil türleride bulunmaktadır. Bu cinsin üyeleri endüstriyel uygulamalar için büyük öneme sahiptir (Pillai *et al.* 2011; Kornilowicz-Kowalska and Bohacz 2011).

1.3.1. *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis; gram pozitif, hareketli, spor oluşturan ve fakültatif anaerobik çubuk şeklindedir. Bu bakteriler enzim üretme yetenekleri ve fizyolojik metabolizmalarından dolayı birçok kültürel, endüstriyel ve medikal proseslerde kullanılmaktadır. Bu organizma; büyük hidrolitik enzim üretiminde, farklı substratların parçalanmasında ve birçok besin kaynağının gelişiminde kullanılmıştır (Schallmeyer *et al.* 2004). Gıdalarda gelişimi 30-50°C'de gerçekleşmektedir. *B. subtilis* ve *B. pumilus* gibi *B. licheniformis* de subtilis grubunda yer almakta, bozuk gıdalarla ve gıda zehirlenmelerinde anılmaktadır. Örneğin, *B. licheniformis* kontamine olmuş pişmiş et ve sebze tüketen insanlar için toksijeniteye ve gıda zehirlenmelerine neden olur. *B. licheniformis* insanlarda sepsisemi, karın zarı iltihabı ve göz iltihabı ve gıda zehirlenmeleri, ayrıca sığırlarda kan zehirlenmesi ve düşüklerle ilişkilidir.

B. licheniformis termofilik bir bakteridir, bu nedenle termofilik özellik gösteren bu organizma için optimum gelişme sıcaklığı 55°C civarında olup daha yüksek sıcaklıklarda da canlı kalabilmektedir. Enzim salgılamasındaki optimum sıcaklık değeri 37°C olan bu organizma endüstride amilaz ve proteaz üretimlerinde kullanılmaktadır. *B. licheniformis*'ten kültür oluşturulması ile elde edilen proteaz, biyolojik yıkama tozlarında kullanılır. Bakteri alkali koşullara iyi adapte olarak gelişim gösterebilir ve proteaz, yüksek pH seviyelerinde kullanılabilir. Optimum pH'sı 9-10 değerinde olan proteaz, yıkama deterjanlarına ilave edilir ve giysilerdeki protein içeren kirlerin çıkartılmasını sağlar. *B. licheniformis* SB 3086 suşu süs bitkilerinde ve çimlerde fungal hastalıkları önlemek ve tedavi etmekte kullanılmaktadır (Zanghloul and Elmahdy 2011). Tavsiye edilen şekilde kullanımı olduğunda çevreye ve insanlara zararlı değildir.

1.4. Enzimler

Enzim canlı hücreler tarafından sentezlenen, canlı metabolizmasındaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşturmadan %100 verim esasına göre çalışan biyolojik bir katalizördür. Katalizleme güçleri ve spesifik oluşları, enzimlerin en önemli özellikleridir. Katalitik RNA moleküllerin küçük bir grubu hariç, bütün enzimler protein yapısındadırlar (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Enzimlerin yapılarının aydınlatılmasıyla, enzim katalizli reaksiyonların kinetik ve termodinamik açıdan incelenmesi çalışmaları da ilerlemiştir. Enzimler molekülleri parçalar, birleştirir veya belirli grupları bir molekülden diğerine taşırlar. Katalitik fonksiyonları bakımından enzimler Çizelge 1.2’de gösterildiği gibi altı ana grupta toplanmıştır (Telefoncu ve Pazarlıoğlu 2010).

Çizelge 1.2. Enzimlerin sınıflandırılması

Katalitik fonksiyon	Grup adı
Oksidasyon-Redüksiyon	Oksidoredüktazlar
Grup Transferi	Transferazlar
Hidroliz	Hidrolazlar
Grup ayırma	Liyazlar
İzomerleşme	İzomerazlar
Moleküllerin birleştirilmesi	Ligazlar

Enzimler canlı hücrelerde sentezlenir ve hücre canlılığını yitirdikten sonrada uzun süre etkili kalabilirler. Çünkü katalitik etkileri hücreye bağlı değildir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olduğu için çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere enzimler günlük ve ekonomik hayata girmiştir (Wiseman 1987). Enzimlerin sağlıktan endüstriyel konulara kadar geniş bir uygulama alanı bulunmaktadır ve bu uygulama alanları gün geçtikçe artmaktadır. Bu nedenle enzim üretiminde daha ekonomik ve etkili teknikler geliştirilmesi, enzim üretim tesislerinin kurulması ve optimizasyon çalışmaları yoğun

bir şekilde devam etmektedir. Enzimlerin kullanım alanlarına göre dağılımı Çizelge 1.3'deki gibidir (Telefoncu ve Pazarlıoğlu 2010).

Çizelge 1.3. Enzimlerin kullanım alanlarına göre dağılımları

Endüstri	%
Gıda	45
Deterjan	34
Tekstil	11
Deri	3
Kağıt	1
Diğerleri	6

Enzim üretiminin çıkış maddeleri bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı olabilmektedir. Özellikle bitkisel materyallerin enzim içeriği mevsime bağımlı olarak değişkenlik göstermektedir (Telefoncu ve Pazarlıoğlu 2010). Bitkisel materyal için hasattan sonra, hayvansal materyal için ise kesimhanede enzim aktivitesini koruyacak önlemler alınmalıdır. Hayvansal enzimler bakımından zengin; karaciğer, kalp, böbrek gibi organlar, kas etleri ve keseler soğukta saklanır. Ancak en iyisi kesimden hemen sonra şok dondurma işlemidir. Dondurmadan önce doku kalıntılarının uzaklaştırılması uygundur ve böyle bir materyal dondurulmuş durumda kıyılarak veya kesilerek küçük parçalara ayrılabilir. Çoğu kez uygulanan alternatif bir yol ise materyal kıyıldıktan sonra yağın aseton ile uzaklaştırılması ve dondurulmasıdır. Ancak bu işlem sırasında önemli oranda enzimin aktivite kaybı olabilir. Bitkisel enzimlerin kazanılması teknolojik bakımdan meyve suyu eldesine benzer ve ham madde öğütölür, yüksek basınç homojenizatöründen geçirilir. Hücre zarının parçalanması için genelde lizozim gibi litik enzimler ile ön işlem yapılmalıdır (Telefoncu ve Pazarlıoğlu 2010).

Endüstrinin neredeyse bütün alanlarında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan üretilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere nazaran katalitik aktivitelerinin

daha yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, enzim içeriklerinin daha doğru tahmin ve kontrol edilmesi, güvenilir, sabit kompozisyonlu ham materyaller olmalarından daha kolay işlenebilmeleri, bitkilerin fenolik bileşikleri, hayvan dokularının endojen enzim inhibitörleri ve proteazları içermeleri nedeni ile bitki ve hayvan dokularının potansiyel olarak mikroorganizmalardan daha zararlı materyaller olmaları ve oldukça fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman 1987; Telefoncu ve Pazarlıoğlu 2010).

Mikrobiyal enzimlerin özellikle teknik üretiminde bakteri ve mantarlar kullanılır. Bunun yanında uygun mikroorganizma tür ve mutantının seçimi büyük önem taşır. Her organizma türü çok sayıda enzim üretir ama bu enzimlerin miktarı türler arasında değişiklik gösterir. Enzimi bol miktarda üreten mikroorganizma seçilmeli ve şu maddelere dikkat edilmelidir (Telefoncu ve Pazarlıoğlu 2010).

- Organizma fermentasyon sonucu enzim üretmelidir
- Ekstrasellüler enzim üretimi tercih edilmelidir. Çünkü hücre membranı parçalama işlemine gerek olmadığından enzim izolasyonu kolaydır.
- Seçilecek mikroorganizmanın türü, toksik madde ve antibiyotik üretmemeli, ucuz besi ortamında çoğaltılıp faaliyet göstermeli ve gerek üretilen enzime zarar verecek gerekse izolasyon ve saflaştırma adımlarında problem yaratabilecek yan ürünleri salgılamamalıdır.
- Enzim verimliliği açısından mikroorganizma kültür ortamı koşullarında kararlı olmalıdır.
- Kültürler filtrasyon veya santrifüjleme ile berraklaştırma esnasında olabildiğince az problem çıkarmalı ve intrasellüler enzimlerin üretilmesi durumunda ise hücreler kolayca parçalanmalıdır.

Enzimlerin ticari olarak üretilen birkaçını ve kaynaklarını Çizelge 1.4'deki gibi sınıflandırabiliriz (Telefoncu ve Pazarlıoğlu 2010).

Çizelge 1.4. Ticari olarak üretilen bazı enzimler ve kaynakları

Enzim	EC kodu	Kaynak	Hücre içi/dışı	Endüstriyel kullanım
Hayvansal Enzimler				
Katalaz	1.11.1.6	Karaciğer	İ	Gıda
Kimotripsin	3.4.21.1	Pankreas	D	Deri
Lipaz	3.1.1.3	Pankreas	D	Gıda
Rennet	3.4.23.4	İşkembe	D	Peynir
Tripsin	3.4.21.4	Pankreas	D	Deri
Bitkisel enzimler				
Aktinidin	3.4.22.14	Kivi meyvesi	D	Gıda
α -Amilaz	3.2.1.1	Arpa maltı	D	Biracılık
β -Amilaz	3.2.1.2	Arpa maltı	D	Biracılık
β -Glukanaz	3.2.1.6	Arpa maltı	D	Biracılık
Fisin	3.4.22.3	İncir suyu	D	Gıda
Lipoksigenaz	1.13.11.12	Soya fasulyesi	İ	Gıda
Papain	3.4.22.2	Papaya suyu	D	Et
Bakteriyel enzimler				
α -Amilaz	3.2.1.1	<i>Bacillus</i>	D	Nişasta
β -Amilaz	3.2.1.2	<i>Bacillus</i>	D	Nişasta
Asparaginaz	3.5.1.1	<i>Escherichia coli</i>	İ	Sağlık
Glukoz izomeraz	5.3.1.5	<i>Bacillus</i>	İ	Früktöz şurubu
Penisilin amidaz	3.5.1.5	<i>Bacillus</i>	İ	İlaç
Proteaz	3.4.21.14	<i>Bacillus</i>	D	Deterjan
Pullulanaz	3.2.1.41	<i>Klebsiella</i>	D	Nişasta
Fungal enzimler				
α -Amilaz	3.2.1.1	<i>Aspergillus</i>	D	Ekmek yapımı
Aminoaçilaz	3.5.1.14	<i>Aspergillus</i>	İ	İlaç
Katalaz	1.11.1.6	<i>Aspergillus</i>	İ	Gıda
Sellulaz	3.2.1.4	<i>Trichoderma</i>	D	Atık
Lipaz	3.1.1.3	<i>Rhizopus</i>	D	Gıda
Pektinaz	3.2.1.15	<i>Aspergillus</i>	D	İçecek
Proteaz	3.4.23.6	<i>Aspergillus</i>	D	Ekmek yapımı
Maya enzimleri				
İnvertaz	3.2.1.26	<i>Saccharomyces</i>	İ/D	Pastacılık
Laktaz	3.2.1.23	<i>Kluyveromyces</i>	İ/D	Mandıra
Lipaz	3.1.1.3	<i>Candida</i>	D	Gıda
Rafinaz	3.2.1.22	<i>Saccharomyces</i>	İ	Gıda

Dayanıklılık özelliklerinden dolayı termofil kaynaklı enzimler günümüzde en fazla pratik ticari kullanım alanına sahip olan enzim grubunu oluşturmaktadırlar (Demirjian *et al.* 2001). Yüksek sıcaklıklarda biyoteknolojik işlemleri gerçekleştirmek oldukça fazla avantaj sağlamaktadır.

Termofilik enzimler termofilik kaynaklı olduklarından mikroorganizmaları ve uygulama alanlarında farklılık göstermektedir (Demirjian *et al.* 2001).

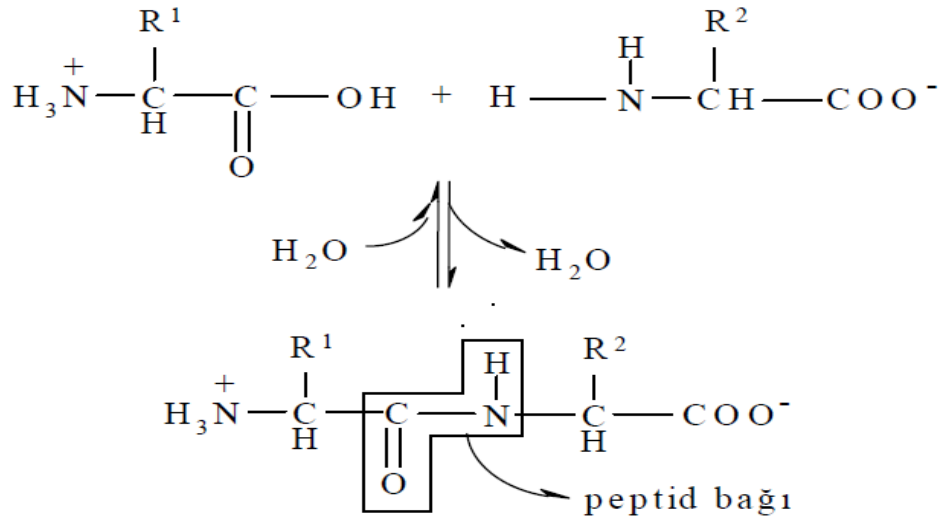
Çizelge 1.5. Termofilik mikroorganizmalara ait enzimlerin endüstriyel uygulama alanları

Mikroorganizma	Enzimler	Uygulama
Ilımlı termofiller (45-65°C)	Amilaz Ksilanaz	Tatlandırıcı için glukoz, fruktoz hidrolizi Kağıt beyazlatma
Termofiller (65-85)	Beta-galaktozidaz proteaz	Süt ve süt ürünlerinde laktoz hidrolizi Ekmekçilik, deterjan sanayi
Hipertermofiller (<85)	DNA polimerazlar	Genetik mühendisliği

1.4.1. Proteazlar

Proteolitik enzimler olarak da bilinen proteazlar (proteinaz veya peptidazlar), proteinlerdeki peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Proteazlar, büyük polipeptidleri ve proteinleri hidroliz ederek hücreler tarafından içeri alınabilecek daha küçük moleküllerin oluşumunu sağlarlar (Salleh *et al.* 2006; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği tarafından geliştirilen ve enzimlerin adlandırılması için kullanılan EC (Enzim Kod Numarası) numaralarına göre; proteazlar Sınıf 3 (hidrolazlar) ve alt sınıf 3.4 (peptidazlar ya da peptid hidrolazlar) grubuna ait enzimlerdir. Proteoliz olarak adlandırılan peptid bağlarının proteazlar tarafından hidrolizi Şekil1.1'de görülmektedir. Proteolizin ürünleri protein, peptid fragmentleri ve serbest aminoasitlerdir (Gençkal 2006).



Şekil 1.1. Proteazların gerçekleştirdikleri hidroliz reaksiyonunun mekanizması

1.4.1.a. Proteazların sınıflandırılması

Proteazlar hidrolazlar sınıfında yer alırlar ve 4 alt gruba ayrılırlar. Bunun yanında sahip oldukları geniş etki ve yapı çeşitliliklerinden dolayı, proteazlar kaynağına, aktif bölgedeki fonksiyonel gruplarına ve katalitik bölgedeki işlevlerine göre sınıflandırılırlar (Deshpande *et al.* 1998; Telefoncu ve Pazarlıoğlu 2010).

Çizelge 1.6. Proteazların sınıflandırılması

1. Kaynağına göre proteazlar;
1.1.Bitkisel proteazlar
1.2.Hayvansal proteazlar
1.3.Mikrobiyal proteazlar
2. Aktif bölgedeki fonksiyonel gruplarına göre proteazlar;
2.1.Serin proteazlar (EC 3.4.21)
2.2.Sistein proteazlar (EC 3.4.22)
2.3.Aspartil proteazlar (EC 3.4.23)
2.4.Metalloproteazlar (EC 3.4.24)
3. Katalitik bölgedeki işlevlerine göre proteazlar

Büyük bir aileyi (E.C 3.4) oluşturan proteazlar, Avrupa Biyokimya Komitesi tarafından EC sisteminde, ekzopeptidazlar (E.C 3.4.21-99) ve endopeptidazlar (E.C 3.4.11-19) olmak üzere 2 geniş aileden oluşmaktadır (Sevinç 2010). Ekzopeptidazlar, polipeptid zincirlerinin uçlarındaki serbest amino (N) ya da karboksil (C) gruplarına atak yapmaktadırlar. Ekzopeptidazlar etki ettikleri protein zincirinin sonundaki grup serbest amino grubu ise aminopeptidaz, serbest karboksil ise karboksipeptidaz, olarak adlandırılmaktadır.

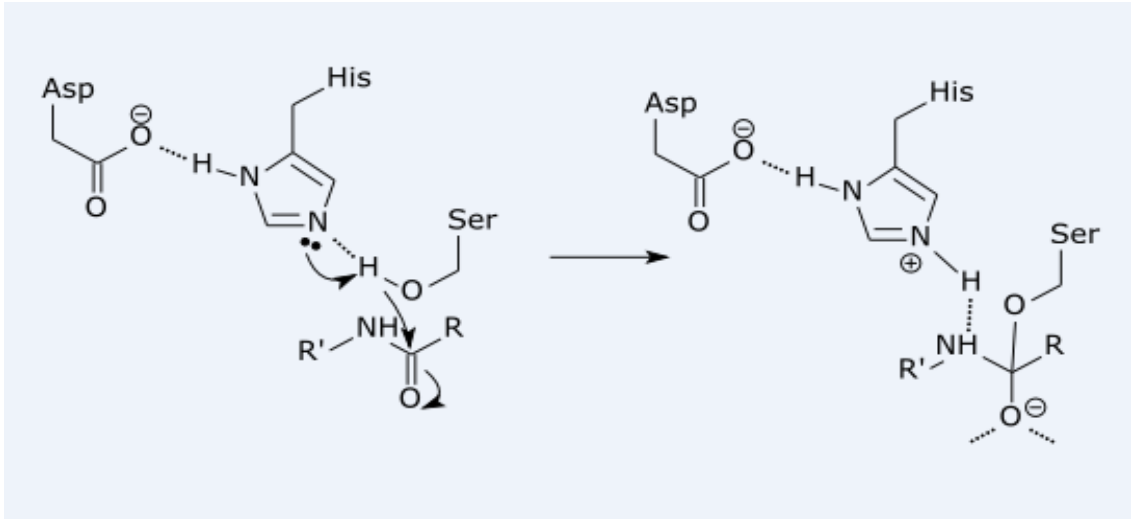
Karboksipeptidazlar, enzimlerin aktif bölgesindeki aminoasit çeşitlerinin yapısına göre üç ana gruba ayrılırlar. Bunlar; serin karboksipeptidazlar, metallo karboksipeptidazlar ve sistein karboksipeptidazlardır (Rao *et al.* 1998). Aminopeptidazlar, polipeptid zincirinin ucundaki serbest N terminalinde işlev görürler. Enzim, tek bir aminoasidi, bir dipeptidi ya da bir tripeptidi hidroliz etmesine göre isimlendirilir.

Endopeptidazlar, polipeptid zincirlerinin iç bölgelerindeki peptid bağlarına etki etmeleri ile adlandırılırlar, serbest N ya da C grubunun varlığı enzimatik aktivite üzerine negatif etki etmektedir. Endopeptidazlar, serin, sistein, aspartik ve metallo proteazlar olmak üzere dört gruba ayrılmaktadırlar. Ayrıca katalitik mekanizması bilinmeyen endopeptidazlar olarak da ayrıca bir gruba sahiptirler (Rao *et al.* 1998).

a. Serin proteazlar

Serin proteazlar; aktif bölgelerindeki zorunlu serin kalıntısı varlığı ile karakterize edilirler ve proteazların en sıklıkla rastlanan sınıfını oluştururlar. Arkealar, bakteriler, ökaryotlar ve virüslerden izole edilebilirler. Serin proteazlar; ekzopeptidaz, endopeptidaz, oligopeptidaz ve omegapeptidazlar olarak dört gruba ayrılırlar ve evrimsel olarak aynı kökenden gelmektedirler. İstisnalar dışında birçok serin proteazın molekül ağırlığı 18 ile 35 kDa arasındadır ve maksimum aktivite gösterdikleri pH aralığı 7-11'dir. Uygulama açısından bakıldığında, serin proteazın alt grubunda yer alan subtilizinler endüstriyel öneme sahiptirler. Bu grup enzimler *Bacillus* cinsi bakterilerden üretilirler ve geniş olarak deterjan endüstrisinde kullanılırlar (Walsh 2002). Serin

proteazların en tipik inhibitörü fenilmetilsülfonilflorür (PMSF)'dür. Serin proteazların aktif bölgelerinde bulunan Ser¹⁹⁵, His⁵⁷ ve Asp¹⁰² kalıntıları birbirlerine hidrojen bağı ile bağlanmışlardır. Aktif bölgedeki serin nükleofil, aspartat elektrofilye ve histidin baz görevini üstlenmiştir. Bu kalıntıların geometrik düzenlenmeleri de aynıdır.

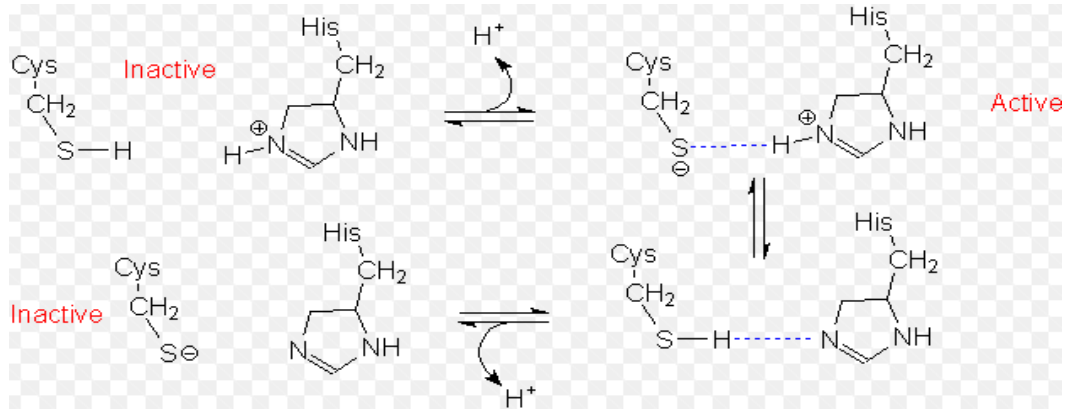


Şekil 1.2. Serin proteazın etki mekanizması

Serin proteazların gerçekleştirdikleri kataliz reaksiyonlarında birinci basamak substratın aktif bölgeye bağlanmasıdır ve bu basamaktaki substrat spesifitesi aktif bölge içinde yer alan kalıntılar tarafından belirlenmektedir. Spesifik bağlanmayı Ser195 ile kesilen peptid bağının karbonil grubu arasındaki yakınlık belirler. Peptid bağının kesilmesi ping-pong mekanizması ile gerçekleşir. Bu mekanizmada substrat bağlanır, ürün (peptidin N-terminal ucu) ayrılır diğer substrat bağlanır (su) ve diğer ürün (peptidin C-terminal ucu) ayrılır (Şekil 1.2). Bütün serin proteazlar sahip oldukları katalitik merkezlerin yapısına göre substrat spesifitelerini belirlemelerine rağmen yüksek reaktiviteye sahip serin kalıntısı tarafından belirlenen benzer katalitik mekanizmaya sahiptirler (Walsh 2002).

b. Sistein proteazlar

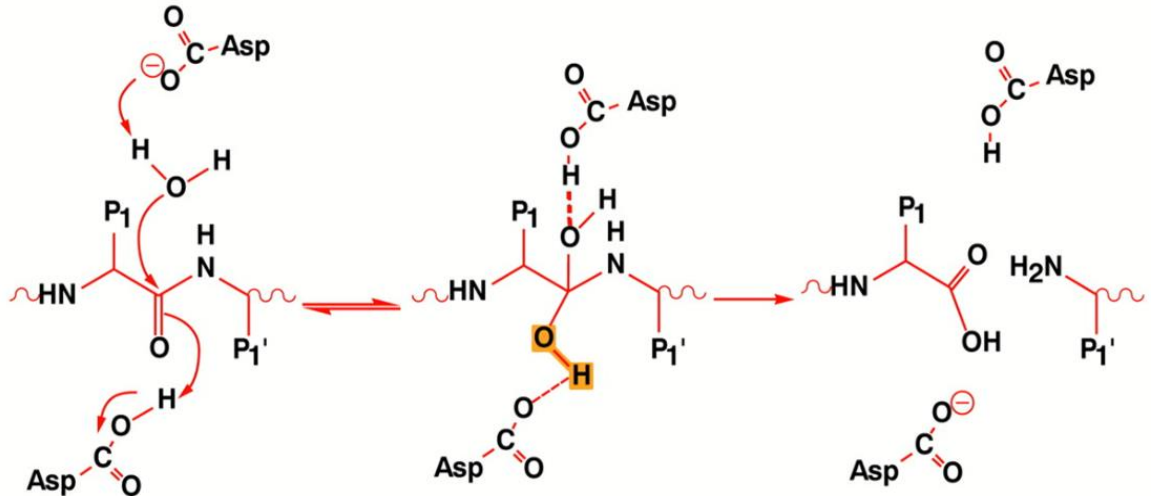
Sülfidril ya da tiyol proteazlar olarak da bilinen sistein proteazlar birçok organizmada bulunur. Bu grup enzimler virüsler (pikornain), bakteriler (streptopain), protozoolar (kruzain), mantarlar, bitkiler (papain, fisin, aktinidin) ve memelilerde (lizozomal katepsinler, sitosolik kalpainler) bulunurlar. 21 grupta toplanırlar ve birçoğu papain ailesinin içinde numaralandırılır (Voet and Voet 2004).



Şekil 1.3. Sistein proteazın etki mekanizması

c. Aspartik (asit) proteazlar

HIV-1 proteazı saflaştırılarak kristallendirilmiş ve farklı araştırma grupları tarafından X-ışınları ile yapısı aydınlatılmış bir aspartat proteazdır. Enzim 99 kDa büyüklüğünde homodimer yapıdadır. Bu grupta yer alan pepsin gibi diğer üyeler ile benzer yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Enzimin aktif bölgesi iki alt birimin de yüzeyinde olup aktif bölge amino asit kalıntılarından biri olan Asp²⁵ in bir alt biriminde eşleniği olan diğer Asp^{25'} in de diğer alt biriminde yer aldığı gözlenmiştir. Aspartik proteazlar tarafından proteinlerin hidrolizi için genel asit-baz katalitik mekanizması önerilmiştir. Aspartik proteazlar ile gerçekleştirilen ve suyun direkt olarak reaksiyona katıldığı hidroliz reaksiyonunun mekanizmasına örnek olarak Şekil 1.4 verilebilir.

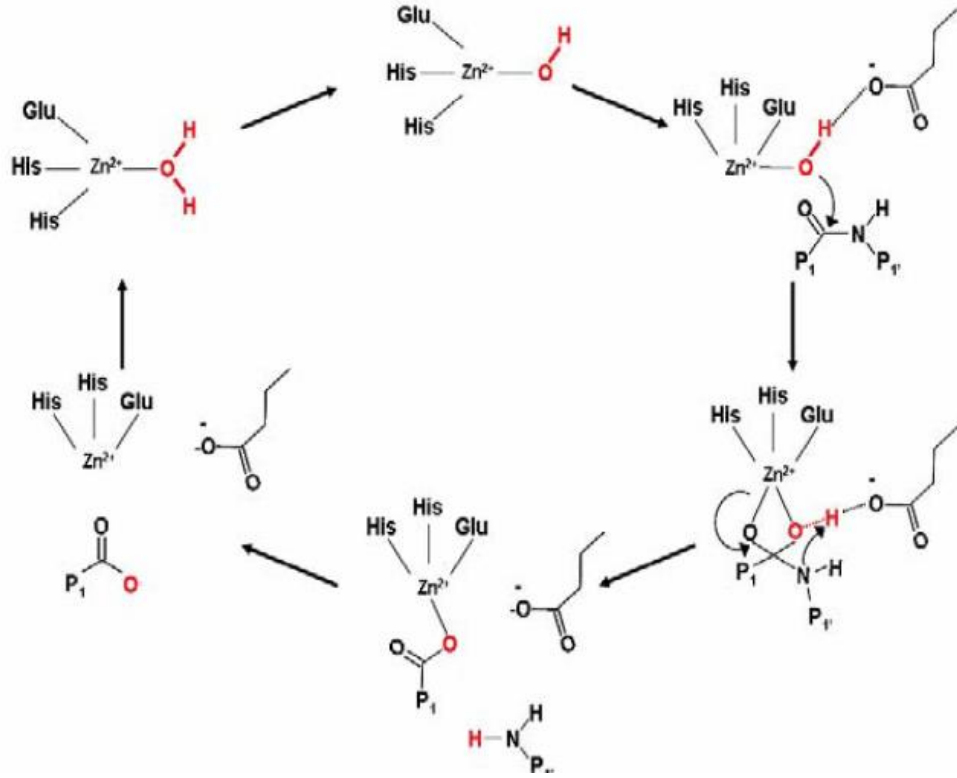


Şekil 1.4. Aspartik proteazın etki mekanizması

d. Metalloproteazlar

Proteazların en eski sınıflarından biri olan metalloproteazlar bakteri, mantar ve yüksek organizmalarda bulunurlar ve amino asit dizilimlerinde ve yapılarında büyük farklılıklar vardır. Metallopeptidazlar ya da metalloproteinazlar olarak da adlandırılan metalloproteazlar, iki değerlikli metal iyonları kompleksi tarafından aktifleştirilmiş bir su molekülünün saldırısıyla peptid bağını parçalayan hidrolaz sınıfını oluşturmaktadırlar. Bu grupta yer alan enzimlerin çoğunluğu katalitik aktivite gösterebilmek için genellikle çinko iyonuna ihtiyaç duymaktadırlar Bununla birlikte, bazı enzimlerde bu fonksiyon manganez, kobalt, nikel veya bakır iyonları tarafından gerçekleştirilir (Polaina and MacCabe 2007). Metalloproteazların yaklaşık otuz sınıfı tanımlanmıştır ve bunların onyedisi endopeptidazları onikisi yalnızca ekzopeptidazları içerirken bir sınıfı da hem endo hem de ekzopeptidaz içermektedir. İşlev spesifikliklerine göre nötral, alkalın, *Myxobacter* ve *Myxobacter* II olarak dört sınıfa ayrılır. Alkalın metalloproteazlar geniş spesifisite gösterirken nötral metalloproteazlar hidrofobik amino asit kalıntılarına spesifiktir (Rao *et al.* 1998). Bakteriyel termolizin bu grupta iyi karakterize edilen enzimlerden bir tanesidir. Yapılan çalışmalarda enzimdeki çinko iyonunun iki tane histidin bir tane de glutamik asit bağlantısı görülmüştür. Enzim termofilik bakteriler tarafından üretilir ve sıcaklığa karşı olağanüstü bir dayanıklılığı

vardır. Yapısında aktif merkezindeki çinko iyonuna ilaveten dört tane bağlı kalsiyum iyonu içerir ve adı geçen diğer metaloproteazlar ile benzer etki mekanizmasına sahiptir Şekil 1.5'deki gibi.



Şekil 1.5. Metalloproteazın etki mekanizması

1.4.1.b. Proteazların fizyolojik işlevleri

Tüm canlı hücreler proteinlerin sentezi ve yıkımı gibi belirli bir protein dönüşüm oranına sahiptir. Hücre içi proteazlar hücrede uygun protein dönüşümü yaparken *Escherichia coli*'de lon geni tarafından üretilen ATP-bağlı proteazlar anormal proteinlerin hidrolizini sağlarlar. Enzimlerin proteolitik inaktivasyonu hücre içi katalitik aktivitenin geri dönüşümsüz olarak kaybına neden olmaktadır. Bu durum fizyolojik olarak önemli bir olaydır. Proteazlar büyük polipeptidlerin daha küçük peptidlere ve amino asitlere hidrolizine yardımcı olurlar. Böylece hücre tarafından emilimi, kullanımı ve sindirimi kolaylaşır. Hücre dışı enzimler ise onların depolimerleşme aktivitesinden

dolayı beslenmede büyük bir rol oynar. Proteazlar aracılığıyla gen ifadesinin düzenlendiği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Roa *et al.* 1998).

1.4.1.c. *Bacillus* proteazlarının özellikleri

Bacillus türündeki mikroorganizmalar, çoğunlukla alkalın serin proteaz tipindeki grupları üretmektedirler. Bu nedenle *Bacillus* proteazları daha çok alkali özelliktedir. Alkalın proteazların optimum pH aralığı pH 9,0-11,0 arasında olmakla birlikte, optimum pH değerleri pH 11,5, pH 11-12, pH 12,5 ve pH 12-13 olan birkaç istisna durum da bulunmaktadır. Alkalın proteazlar yüksek izoelektrik noktalarına sahiptirler. Genellikle pH 6,0-12,0 arasında kararlılık gösterirler ve optimum sıcaklık değerleri de genellikle 50-70°C'dir. *Bacillus* türündeki mikroorganizmalardan izole edilen alkalın proteazlar yüksek sıcaklıkta bir miktar termostabilite göstermekle birlikte, ortama Ca⁺² iyonlarının ilavesi ile enzim termostabilitesinde artış görülmektedir (Kumar and Takagi 1999). Genellikle alkalın proteazların moleküler kütleleri 15-40 kDa arasında olmakla birlikte, 44 kDa, 45 kDa ve 47,17 kDa gibi daha yüksek moleküler ağırlığa sahip olan enzimlerde yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Kumar and Takagi 1999). Ca⁺², Mg⁺², Mn⁺² gibi iki değerlikli katyonlar veya bu katyonların bir kombinasyonu varlığında alkalın proteazlar maksimum aktivite gösterebilmektedir.

1.4.1.d. Proteazların kullanım alanları

Toplam enzim payının dünya çapındaki satışının yaklaşık %60'ına sahip olan proteazlar, endüstriyel enzimlerin en önemli grubunu oluşturmaktadırlar (Laxman *et al.* 2005). Proteazlar deterjanlarda, deri ve tekstil sanayisinde, gıda, kozmetik, ilaç sanayisinde, tıbbi teşhis gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (Gupta *et al.* 2002).

Mikrobiyal alkali proteazlar yıkama deterjanları uygulamaları için ticari uygulamalarda önemli bir paya sahiptir (Ward 1985). Alkali proteazlar protein kaynaklı lekelerin çıkartılması için deterjanlara eklenmektedir (Nilegaonkar *et al.* 2007).

Alkalin proteazlar gümüşün geri alınması için X-ray filmlerinin kullanımı biyoproseslerinde uygulama alanı bulmuştur. Geleneksel uygulamalarda yanan filmlerdeki gümüşü kurtarma önemli bir çevre kirliliği sorununa neden olmaktadır. Bununla birlikte; alkalin proteazlar ile kollojenazlar düşük dozlarda tedavi edici uygulamalarda artan bir biçimde uygulama alanı bulmuştur (Nelson and Cox 2005).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bakterilerden elde edilen alkalın proteazlar çeşitli endüstriyel sektörlerde kullanılmakta ve farklı şirketler tarafından ticari olarak piyasaya sunulmaktadır. Ticari olarak kullanılan alkalın proteazların genellikle termostabilitesinin yüksek olması istenmektedir ve bu durum kullanım amaçlarına göre avantaj sağlamaktadır (Demirjian *et al.* 2001).

Kumar *et al.* (1999)'ın yaptıkları çalışmada, alkalifilik *Bacillus*'a ait ekstraselüler 2 farklı proteaz enzimi saflaştırılıp, karakterize edilmiştir ve saflaştırılan enzimlerin (AP-1 ve AP-2) molekül ağırlıkları SDS-PAGE ile sırasıyla 28 ve 29 kDa olarak belirlenmiştir. AP-2 ve AP-1'in optimum pH ve sıcaklıklarının sırasıyla 11 ve 12; 50 ve 55°C olduğu bulunmuştur. PMSF'nin saflaştırılan enzimleri inhibe etmesiyle enzimlerin alkalın serin proteaz olduğu tespit edilmiştir.

Mabrouk *et al.* (1999) tarafından yapılan çalışmada, *B. licheniformis* ATCC 21415'e ait alkalın proteaz üretimi gerçekleştirilmiş ve karbon kaynağı olarak %4 laktoz ve %1,5 glukoz karışımı kullanılarak alkalın proteazın en yüksek veriminin elde edildiği tespit edilmiştir. En iyi azot kaynağı da %6 soya fasulyesi ve %1,2 amonyum fosfat karışımından elde edilmiştir. Besi yerine %0,07 CaCl₂'nin eklenmesinin enzim üretimini arttırdığı belirlenmiş ve sürfaktan olarak da besi yerine %1 mısır yağının eklenmesi ile aktivitede dikkat çekecek bir artışın olduğu gözlenmiştir. Enzimin stabil pH'sının 8,5, sıcaklığının ise 50°C olduğu; ancak 15 dk stabil kalabildiği ve 1 saat sonra aktivitesinin %48,8'ini kaybettiği belirlenmiştir. Polifosfatın enzim aktivitesini zayıf bir şekilde inhibe ettiği (%3), EDTA'nın ise aktivitede %22'lik bir kayıba neden olduğu belirtilmiştir.

Joo *et al.* (2003) yılında yaptıkları çalışmada *B. clausii* I-52' den bazı oksidantlara ve SDS'ye karşı stabil alkalın proteaz üretmişlerdir ve saf enzimin optimum pH'sını 11, optimum sıcaklığını da 60°C olarak tespit etmişlerdir. Enzimin %5'lik SDS ile 72 saat

boyunca aktivitesinin %25'ini kaybettiği, %10'luk H₂O₂ ile 72 saat sonunda aktivitesinin %110'a çıktığı belirlenmiştir. Geniş pH ve sıcaklık aralığında etkin olması, SDS gibi anyonik yüzey aktif maddelerini, peroksitler ve perboratlar gibi oksidantları tolere edebilmeleri gibi özelliklerinden dolayı saflaştırılan bu enzimin deterjan endüstrisinde kullanılabileceği önerilmiştir.

Öztürk'ün (2007) yaptığı çalışmada, Van gölünden izole edilen halotolerant *B. licheniformis* BA17'den alkalın proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ultrafiltrasyon ve iyon değişim kromatografisi ile enzim %58 verimle 5,4 kat saflaştırılmıştır ve SDS-PAGE yöntemi ile de molekül kütlesi yaklaşık 19,7 kDa olarak tespit edilmiştir. Enzimin aktif bölgesinde triptofan, histidin ve lizin amino asitlerinin bulunduğu ve serin proteaz enzimi olduğu tespit edilmiştir. Enzimin en iyi 60°C sıcaklığında ve pH 10'da aktivite gösterdiği belirlenmiştir. 40°C'de 38 saat stabil kaldığı, pH 8-10 aralığında 30°C'de sabit sıcaklıkta 2,5 saat inkübe edildiğinde aktivite kaybetmediği belirlenmiştir.

Tekin (2008)'in çalışmasında *B. licheniformis* DSM13 alkalın proteaz üretim yetenekleri yönünden incelenmiştir. Alkalifilik basil olduğu belirlenen Gram (+), hareketli, spor oluşturabilen, katalaz aktivitesine sahip APT5 izolatının (1555 U/ml/g), standart *B. licheniformis* DSM 13'den (1197 U/ml/g) 48 saat sonunda pH 10,0'luk glisin-NaOH tamponunda daha yüksek kapasitede alkalın proteaz aktivitesi görülmüş ve bundan sonraki enzim saflaştırması çalışmalarında alkalifilik *Bacillus* sp. APT5 izolatu kullanılmıştır. Alkalın proteaz enzimi, besiyeri üst sıvısından aseton presipitasyonu ve iyon değişim kromatografisi uygulanarak 500,1 U/mg spesifik aktivitede, 1,6 kat ve %29,5 verimle saflaştırılmıştır. SDS- PAGE ve Native-PAGE ile enzimin elektroforetik davranışı belirlenmiş ve molekül kütlesi 70 kDa olarak bulunmuştur. APT5 enziminin pH 11 ve 50°C'de optimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Optimum sıcaklık ve pH değerleri ile inhibitör ve metal iyonlarına karşı gösterdiği direnç nedeniyle enzimin yüksek bir yapısal stabiliteye sahip olduğu görülmüştür. Bu özellikleri ile alkalın proteazın deterjan endüstrisinde yüksek bir kullanım potansiyeline sahip olabileceği belirtilmiştir.

Kerimak (2008)'ın yaptığı çalışmada *Bacillus* türünden izole edilen alkalın proteaz enzimi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi ve DEAE-selüloz iyon-değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Saflaştırma verimi %35 ve saflaştırma katsayısının değeri 17 olarak bulunmuştur. Enzim SDS-PAGE'de tek bant protein olarak gözlenmiş ve molekül ağırlığı yaklaşık 24,26 kDa olarak tespit edilmiştir. Alkalın proteazın; K_M ve V_{\max} değerleri sırasıyla 3,12 mg. ml^{-1} ve 1,60 $\mu\text{mol. ml}^{-1}$. dak^{-1} , optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 60°C ve 11 olarak tespit edilmiştir. 2 mM fenilmetilsülfonilflorür (PMSF) tarafından tamamen inhibe edildiği için enzimin serin alkalın proteaz olduğu belirlenmiştir.

Olajuyigbe and Ajel 2008 yılında yaptıkları çalışmada, fermente keçiboynuzundan izole edilen 35 tane *Bacillus* türünden çeşitli testlerle karakterize ettikleri ve proteolitik aktivite gösteren *Bacillus licheniformis* Lbbl-11'den hücre dışı proteaz üretilmiştir ve bazı özellikleri incelenmiştir. Fermentasyon ve proteaz üretimi nutrient broth besi yeri içerisinde 150 rpm çalkalama hızında 37°C'de 18-72 saat arasında gerçekleştirilmiştir. Bu fermentasyon süresince maksimum aktivite 48. saatte gözlenmiştir. Enzimin optimum sıcaklığı 60°C ve optimum pH'sı 8,0 olarak bulunmuştur ve enzimin 60°C ile 70°C'da 1 saatlik inkübasyon sonucunda kararlılığının yarısından fazlasını koruduğu belirlenmiştir. Ayrıca proteazın pH 5,0-11,0 aralığında oldukça stabil olduğu görülmüştür.

Rao *et al.* (2009)'ın yılında yaptıkları çalışmada, *Bacillus* bakterilerinden saflaştırılan alkalın proteazın deri işleme prosesi ve deterjan endüstrisindeki uygulamaları incelenmiştir. Saf enzimin molekül ağırlığı 39,5 kDa olarak bulunmuş ve enzimin alkali koşullardaki optimum sıcaklığı 70°C olarak belirlenmiştir. Çalışmalar sonucunda enzimin herhangi bir kimyasala gereksinim olmadan kılları arındırabilmesiyle deri endüstrisinde, kan lekelerini giderebilmesiyle de deterjan endüstrisinde kullanılabilirliği değerlendirilmiştir.

Toyokawa *et al.* (2010) yılında yaptıkları çalışmada, fermente Tayland balık sosundan (yerel bir fermentör) izole ettikleri sıcaklık tolere edebilen *Bacillus licheniformis* RKK-

04'den %18 verimle 80 kat saflaştırdıkları proteolitik enzimin molekül ağırlığını yaklaşık 31 kDa ve izoelektrik noktasını 9,3'den daha büyük olarak tespit etmişlerdir. Çalışmada enzimin optimum pH'sı 10, optimum sıcaklığı da 50°C olarak tayin edilmiştir ve enzimin inhibitörle muamelesi sonucunda saflaştırılan proteazın subtilisin benzeri serin alkalın proteaz olduğu tespit edilmiştir. Proteazın yüksek tuz konsantrasyonlarında (%30 NaCl) bile aktivitesini koruduğu, ayrıca bu enzimin verdiği reaksiyonla balık proteinin miyozin ağır zincirini tamamen parçaladığı belirlenmiştir. Bundan dolayı araştırmacılar *Bacillus licheniformis* RKK-04'den saflaştırılan, tuz tolere edebilen proteazın balık sosu fermentasyonunda anahtar enzim olduğu yorumunu yapmışlardır.

Shah *et al.* (2010) yılında yaptıkları çalışmada, kontamine ham petrol örneklerinden izole ettikleri *Bacillus* cinsi bakterilerden organik çözücüleri, deterjanları ve okside edici ajanları tolere edebilen proteaz enzimi saflaştırmışlardır. Saflaştırmayı 3 adımda (amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE iyon değişim kromatografisi ve Sephadex jel filtrasyon kromatografisi) yaklaşık %11 verimle 58 kat olarak gerçekleştirmişlerdir. Enzimin optimum pH'sı 8, sıcaklığı ise 60°C olarak belirlenmiştir. Enzimin Li^{+2} , Ba^{2+} , K^{+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} metallere etkilenmediği, ama Cr^{3+} , Hg^{2+} ve Cu^{2+} gibi ağır metaller varlığında inaktif olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca saf enzimin noniyonik deterjanlar (TritonX-100 ve Tween-80), okside ve ağartıcı ajanlar (hidrojen peroksit) varlığında kararlılığını koruduğu gözlemlenmiştir. SDS-PAGE yöntemi ile enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 38 kDa olarak belirlenmiştir. Karakterizasyon çalışmalarıyla da, saflaştırdıkları proteazın deterjan formülasyonunda, biotransformasyon reaksiyonlarında, enzimatik peptit sentezinde ve çürüme önleyici ajanların formülasyonlarında kullanılabileceğini belirlemişlerdir.

Sevinç (2010)'ın yaptığı çalışmada *Bacillus* türlerinden izole edilen proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışılmıştır. Optimum enzim aktivitesi 55°C'de elde edilmiştir. Enzimin, 55°C'de 3 saat sonunda aktivitesinin %100'ünü koruduğundan dolayı termostabil olabileceği belirtilmiştir. Optimum pH ise 7 olarak elde edilmiş ve enzimin pH skalasının alkali tarafındaki aktivitesinin asidik tarafa göre daha yüksek

olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla, enzimin alkali bir enzim olduğu söylenmiştir. Enzim aktivitesi üzerine Mn^{+2} ve Ca^{+2} 'nin stimulator etkisi gözlemlenmiştir. Enzim, %75 amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile kısmi olarak %16,8 verimle 2,11 kat saflaştırılmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 52 kDa olarak tespit edilmiştir.

Bezawada *et al.* (2011) tarafından fermente atık su çamurundan ultrafiltrasyon ve santrifüj ile izole edilen *B. licheniformis* ATCC 21424 alkalin proteaz çalışılmıştır. Enzimin optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 60°C ve 10 olarak bulunmuştur. Ca^{+2} ve Mn^{+2} metal iyonları enzimin aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. PMSF ve diizopropilflorofosfat (DFPs) ise enzimin inhibitörü olarak bulunmuştur. Saflaştırılan alkalin proteaz enziminin etkin özelliğinden dolayı deterjan katkı maddeleri ile kullanılabilereği belirtilmiştir.

Bhunia and Dey (2011) yılında yaptıkları çalışmada, *B. licheniformis* NCIM 2042'den izole edilen alkalin proteaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile %73,5 oranında saflaştırılmıştır. 37°C'de 30 dk inübasyon sonucunda enzimin aktivitesinin DMSO varlığında %25; metanol, etanol, 2-propanol, benzen ve tolüen varlığında ise %92'den fazlasını koruduğu bulunmuştur. Ayrıca, 60 dk oda sıcaklığında Tween-80, TritonX-100 ve SDS ile de enzimin stabilitesini dikkate değer bir şekilde koruduğu gözlenmiştir.

Sarker *et al.* (2013)'ın yaptıkları çalışmada, *B. licheniformis* P003'den alkalin proteaz enzimi saflaştırılıp karakterize edilmiştir. Karakterize edilen enzimin optimum sıcaklığı 50°C, pH'sı ise 10 olarak bulunmuştur. Aktivitesini 50°C'de %100, 70°C'de ise %78 oranda koruduğu görülmüştür. 1 saat boyunca 60°C'de ısıtıldıktan sonra enzim aktivitesinin %75'ini; 28 günün sonunda +4°C ve 25°C'de ise yaklaşık %66 ve %46'sını muhafaza ettiği gösterilmiştir. Mn^{+2} ve Mg^{+2} metalleri aktivitesini arttırırken Fe^{+2} metalinin enzim aktivitesini düşürdüğu belirlenmiştir. Tween-20, Tween-80, SDS ve H_2O_2 'nin enzim aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Bu karakteristik

özelliklerinden dolayı bu proteaz enziminin deri endüstrisi başta olmak üzere birçok endüstriyel alanda kullanılabileceği vurgulanmıştır.

Nadeem *et al.* (2013)'ın yaptıkları çalışmada *B. licheniformis* UV-9'dan alkalın proteaz saflaştırılmış ve deterjan formülasyonlarında kullanımı için karakterize edilmiştir. Enzim amonyum sülfat çöktürmesi ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisiyle 36,83 kat, %11 verimle saflaştırılmıştır. Molekül kütlesi SDS-PAGE ile 36,12 kDa olarak bulunmuştur. Kazein substratı ile K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 5 mg/ml ve 61,58 $M \cdot ml^{-1} \cdot dak^{-1}$ olarak bulunmuştur. Enzim en yüksek aktivitesini pH 11 ve 60°C sıcaklıkta görülmüştür. pH 8-11 arası ve 30-50°C aralığındaki sıcaklıkta enzimin kalan aktivitesinin %80'ini koruduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte 10 mM Ca^{+2} varlığında pH 11 ve 60°C sıcaklıkla birlikte enzim aktivitesinin %90'dan fazlası korunmuştur. Fenil metil sülfonil florür (PMSF) ile tamamen inhibe olması ile bu enzimin serin proteaz olduğu düşünülmüştür. Mg^{+2} ve Ca^{+2} metal iyonları aktiviteyi sırasıyla %128 ve %145 olarak artırdığı belirlenmiştir. Saflaştırılan enzim, Tween-20, Tween- 45, Tween-65 ve Triton X-45 gibi yüzey aktif maddelere karşı aşırı kararlılık göstermiştir. Bu enzim ayrıca oksitleyici maddelerden H_2O_2 ve sodyumperborat varlığında %100'den fazla aktivite göstermiştir. Böylece *B. licheniformis* UV-9'dan saflaştırılan proteaz enziminin potansiyel çamaşır deterjanı enzimi olabileceği belirtilmiştir.

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 izole edilen ve tanımlanan termofilik *Bacillus licheniformis* A10 bakterisi kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar şunlardır: Tris, kazein, amonyum sülfat, folin reaktörü, akrilamid bisakrilamid, N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin (TEMED), Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), SDS, TritonX-100, Tween-80, Amonyum persülfat (PER), DTNB, PMSF, β -merkaptoetanol, hidrojenperoksit, üre, metanol, aseton, izopropanol, formaldehit, DMSO (Sigma), sodyum karbonat, Commanse Brilliant Blue G-250, sodyum fosfat, bütanol, glisin, bromtimol mavisi, BSA (Merck), TCA, Tween-20 (Riedel de Haen) sodyum asetat, kloroform (Carlo Erba)

3.1.3. Yararlanılan alet ve cihazlar

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 (Hıclave 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)

3.1.4. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

- 1.** %0,65'lik (w/v) Kazein çözeltisi: 100 mM Tris-HCl tamponunun (pH=8,5) 100 ml'si içine 0,65 g kazein konularak stok çözelti hazırlandı.
- 2.** 110 mM TCA çözeltisi: 1,79 g TCA alınıp bir miktar saf suda çözüldü ve son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- 3.** 0,5 M Folin-Ciocalteu (F-C) çözeltisi: Folin-Ciocalteu reaktifinin destile suyla 1:4 oranında seyreltilmesiyle hazırlandı ve ışık almayacak şekilde saklandı.
- 4.** 500 mM Na₂CO₃ çözeltisi: 5,29 g Na₂CO₃ alınıp bir miktar saf suda çözüldü ve son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Amonyum sülfat çökeltisinin çözünmesi ve diyaliz için kullanılan tampon:

1. 100 mM Tris-HCl (pH 8,5): 12,1g Tris 900ml saf suda çözüldü, pH'sı 8,5'e ayarlandı ve son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

DE52 anyon değişim kromatografisinde kullanılan çözeltiler:

1. Jelin hazırlanmasında kullanılan çözelti (200 mM Tris-HCl pH 7,8): 12,1g Tris 400 ml saf suda çözüldü, pH 7,8'e ayarlandı ve son hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

2. DE52 kolonunun dengelenmesinde kullanılan çözelti (50mM Tris-HCl pH 8,5): 6,05 g Tris 900 ml suda çözüldü, pH'sı 8,5'e ayarlandı ve son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

3. DE52 kolonunun elüsyonunda kullanılan çözelti: Kolonun dengelenmesinde kullanılan 50 mM Tris-HCl pH=8,5 tamponunun içine 50-500 mM NaCl ilave edilmesiyle elde edilen çözelti.

Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözeltiler:

1. Coomassie brilliant blue ile G-250 boyası: 100 mg brilliant blue G-250 alındı ve 50 ml %95'lik etanolde çözüldü, üzerine 100 ml %95'lik fosforik asit konuldu ve saf su ile son hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

2. Standart serum albumin çözeltisi (1 mg/ml; protein tayini için kullanılan çözelti): 25 mg standart bovin serum albumininin 25 ml saf suda çözülmesiyle hazırlandı.

Elektroforez için kullanılan çözeltiler:

1. 1 M Tris-HCl tamponu (pH 8,8): 12,114 g Tris, 90 ml saf suda çözüldü, pH 8,8'e ayarlandı ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl tamponu (pH 6,8): 12,114 g Tris, 90 ml saf suda çözüldü, pH 6,8'e ayarlandı ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.
3. %30'luk Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g saf su karıştırılarak çözüldü.
4. %10'luk SDS: 1 g SDS saf suda çözülerek 10 ml'ye tamamlandı.
5. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris ve 7,51 g glisin 450 ml saf suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 5 ml %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim saf suyla 500 ml'ye tamamlandı.
7. %0,1'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0,1 g indikatör 0,01 M 16 ml NaOH içerisinde çözüldü ve saf suyla son hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
8. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH 8,0)'den 0,5 ml, %10'luk SDS'den 1 ml, %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak saf suyla 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponuna 50 µl β-merkaptotanol ilave edildi.

Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler

1. Tespit çözeltisi: 60 ml saf su, 30 ml %96'lık etanol ve 10 ml asetik asit karışımıyla hazırlandı.

2. Redüksiyon çözeltisi: 4,8 g sodyum asetat, 45 ml etanol ve 80 ml saf suda karıştırıldı. pH asetik asitle 6'ya ayarlandıktan sonra 150 mg sodyum tiyosülfat, 3 ml glutaraldehit eklenip saf su ile son hacim 150 ml'ye tamamlandı.
3. Boyama çözeltisi: 100 mg gümüş nitrat, 100 ml saf suda çözünüp üzerine 30 µl formaldehit eklenmesiyle hazırlandı.
4. Yıkama çözeltisi 1: 3,75 g sodyum karbonat, 270 ml saf suda çözüldü ve üzerine 120 µl formaldehit ilave edildi.
5. Yıkama çözeltisi 2: 1 ml gliserin ve 250 ml'lik %5'lik asetik asitten karıştırılarak hazırlandı.

Kullanılan metal çözeltilerinin hazırlanması

1. $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ çözeltisi (1 mM, 5 mM ve 10 mM): Sırasıyla 0,0081 g, 0,0405 g, 0,081 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ tartılıp 30 ml %0,65'lik kazein çözeltisinde sırasıyla 1 mM, 5 mM ve 10 mM olacak şekilde çözümlenerek hazırlandı.
2. MgCl_2 çözeltisi (1 mM, 5 mM ve 10 mM): 0,00286 g, 0,0143 g, 0,0286 g MgCl_2 tartılıp 30 ml %0,65'lik kazein çözeltisinde sırasıyla 1 mM, 5 mM ve 10 mM olacak şekilde çözümlenerek hazırlandı.
3. CaCl_2 çözeltisi (1 mM, 5 mM ve 10 mM): 0,0033 g, 0,016 g, 0,033 g CaCl_2 tartılıp 30 ml %0,65'lik kazein çözeltisinde sırasıyla 1 mM, 5 mM ve 10 mM olacak şekilde çözümlenerek hazırlandı.
4. AgNO_3 çözeltisi (1 mM, 5 mM ve 10 mM): 0,0034 g, 0,017 g, 0,034 g AgNO_3 tartılıp 30 ml %0,65'lik kazein çözeltisinde sırasıyla 1 mM, 5 mM ve 10 mM olacak şekilde çözümlenerek hazırlandı.

5. $ZnCl_2$ çözeltisi (1 mM, 5 mM ve 10 mM): Sırasıyla 0,00409 g, 0,0204 g, 0,0409 g $ZnCl_2$ tartılıp 30 ml %0,65'lik kazein çözeltisinde sırasıyla 1 mM, 5 mM ve 10 mM olacak şekilde çözülerek hazırlandı.

6. KCl çözeltisi (1 mM, 5 mM ve 10 mM): 0,0022 g, 0,0112 g, 0,022 g potasyum tartılıp 30 ml %0,65'lik kazein çözeltisinde sırasıyla 1 mM, 5 mM ve 10 mM olacak şekilde çözülerek hazırlandı.

7. $CoCl_2 \cdot 6 H_2O$ çözeltisi (1 mM, 5 mM ve 10 mM): 0,0071 g, 0,0357 g, 0,071 g $CoCl_2 \cdot 6 H_2O$ tartılıp 30 ml %0,65'lik kazein çözeltisinde sırasıyla 1 mM, 5 mM ve 10 mM olacak şekilde çözülerek hazırlandı.

8. $MnCl_2$ çözeltisi (1 mM, 5 mM ve 10 mM): 0,0037 g, 0,0189 g, 0,037 g $MnCl_2$ tartılıp 30 ml %0,65'lik kazein çözeltisinde sırasıyla 1 mM, 5 mM ve 10 mM olacak şekilde çözülerek hazırlandı.

9. $NiCl_2 \cdot 6 H_2O$ çözeltisi (1 mM, 5 mM ve 10 mM): 0,0071 g, 0,035 g, 0,071 g $NiCl_2 \cdot 6 H_2O$ tartılıp 30 ml %0,65'lik kazein çözeltisinde sırasıyla 1 mM, 5 mM ve 10 mM olacak şekilde çözülerek hazırlandı.

Kullanılan inhibitör çözeltilerinin hazırlanışı

1. PMSF çözeltisi (1 mM ve 5 mM): Sırasıyla 0,017 g ve 0,087 g PMSF tartıldı, 5 ml etanolde çözülerek 1 ve 5 mM olacak şekilde çözeltiler hazırlandı.

2. β -merkaptoetanol çözeltisi (1 mM ve 5 mM): 35 μ l β -merkaptoetanol alınıp 5 ml tampon içinde çözülerek stok çözelti hazırlandı. Stok çözeltilerden 1 ve 5 mM olacak şekilde hazırlandı.

3. EDTA çözeltisi (1 mM ve 5 mM): Sırasıyla 0,039 g ve 0,196 g EDTA tartıldı ve bir miktar Tris-HCl (pH 8,5) tamponuyla çözüldü ve son hacim 5 ml'ye tamamlandı.
4. DTNB çözeltisi (1 mM ve 5 mM): Sırasıyla 0,078 g ve 0,39 g DTNB tartılarak 10 ml tamponda çözüldü, 1 ve 5 mM olacak şekilde çözeltiler hazırlandı.
5. Üre çözeltisi (1 mM ve 8 mM): 0,604 mg ve 3,02 mg üre tartıldı ve 50 ml suda 1 ve 8 mM'lık olacak şekilde hazırlandı.

Yüzey aktif madde çözeltilerinin hazırlanması

1. TritonX-100 (%1 ve %5): Sırasıyla 0,3 ve 0,5 ml TritonX-100'den alınarak saf su ile 30 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.
2. Tween-20 (%1 ve %5): Sırasıyla 0,3 ve 0,5 ml Tween-20'den alınarak saf su ile 30 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.
3. Tween-80 (%1 ve %5): Sırasıyla 0,3 ve 0,5 ml Tween-80'den alınarak saf su ile 30 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.
4. SDS (%1 ve %5): Sırasıyla 0,3 g ve 0,5 g SDS alınarak 30 ml saf suda çözülerek hazırlandı.

Doğal substratlar ile hazırlanan çözeltiler

1. %0,65'lik kazein çözeltisi: 0,195 g kazein tartılarak son hacim 30 ml olacak şekilde 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) tamponunda çözüldü.
2. %0,65'lik azokazein çözeltisi: 0,195 g azokazein tartılıp son hacim 30 ml olacak şekilde 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) tamponunda çözüldü.

3. %0,65'lik BSA çözeltisi: 0,195 g BSA tartılarak son hacim 30 ml olacak şekilde 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) tamponunda çözüldü.

4. %0,65'lik hemoglobin çözeltisi: 0,195 g hemoglobin tartılarak son hacim 30 ml olacak şekilde 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) tamponunda çözüldü.

%0,65'lik jelatin çözeltisi: 0,195 g jelatin tartılıp son hacim 30 ml olacak şekilde 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) tamponunda çözüldü.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Petride proteaz aktivitesinin belirlenmesi

Bacillus licheniformis A10 suşundan bir lup bakteri alınarak nutrient brot besi ortamına inoküle edildi ve 55°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Daha sonra SMA agar besiyerine bu sıvı kültüründen agar wel metodu kullanılarak ekim yapıldı ve petri 55°C'ye ayarlı inkübatörde 24-48 saat süreyle bekletildi (Panda *et al.* 2013).

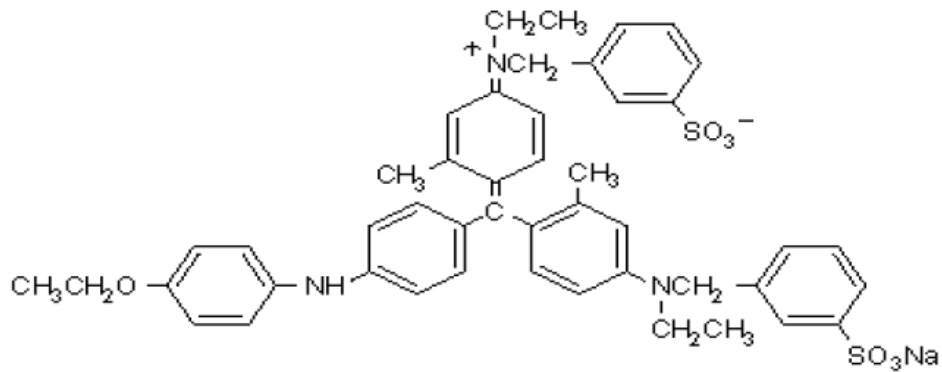
3.2.2. Protein tayini

3.2.2.a Kalitatif protein tayini

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

3.2.2.b. Bradford yöntemiyle protein tayini

Bu yöntem, proteine coomassie brillant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbands gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).



Şekil 3.1. Coomessie brillant blue G-250 boyasının kimyasal yapısı

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart bovin serum albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 5 ml renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbands değerleri okundu. Kör olarak 0,1 ml aynı tampon ve 5 ml renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanıldı ve absorbands 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 çökeltisi numunesi, iyon değişim kromatografisinden elde edilen saflaştırılmış enzim çözeltilerinden 3 ayrı tüpe sırasıyla 0,1 ml konularak üzerlerine 5'er ml renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakılıp, sonra 595 nm'de absorbands

değerleri okundu. Bu işlem 3 defa tekrarlanarak 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten protein miktarları belirlendi.

3.2.3. Alkalın proteaz aktivitesinin belirlenmesi

Proteaz aktivitesi Takami *et al.* (1989), tarafından tanımlanan kazeinin substrat olarak kullanıldığı yöntemin modifiye edilmesi ile belirlendi. 0,5 ml enzim çözeltisi 2,5 ml, 100 mM pH 8,5 Tris-HCl tampon çözeltisinde hazırlanan %0,65'lik kazein çözeltisi ile karıştırıldı ve reaksiyon çözeltisi 10 dakika süre ile 37°C'da inkübe edildi. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 100 mM pH 8,5 Tris-HCl tampon çözeltisi ilave edilen reaksiyon karışımı kullanıldı. İnkübasyon sonunda reaksiyon karışımlarına 2,5 ml, 110 mM trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi ilave edilip 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek reaksiyonun sonlanması sağlandı. Süre bitiminde reaksiyon karışımı 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatantın 1 ml'sine 2,5 ml 0,5 M Na₂CO₃ çözeltisi ilave edildi. Reaksiyon karışımının üzerine 0,5 ml 0,5 M Folin-Ciocalteu reaktifi eklenerek karışım 30 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletildikten sonra 660 nm'de spektrofotometrik olarak absorbans ölçüldü. Enzim aktivitesi önceden oluşturulmuş tirozin standart grafiğinin eğimi kullanılarak aşağıda verilen formül ile hesaplandı:

$$\text{Proteaz Aktivitesi} \quad (\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{dk}^{-1}) = \frac{(\text{A660/Eğim}) \times \text{Toplam Hacim}}{\text{Enzim Hacmi} \times \text{İnkübasyon Süresi}} \times \text{Seyreltme Faktörü}$$

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).

3.2.4. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması

Tirozin standart grafiğı proteaz aktivitesi hesaplamasında kullanılmak üzere 100 mM pH 8,5 Tris-HCl tamponu ile 1 mg/ml tirozin çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden tüplere 10, 20, 30, 40, 50 µl hacimlerde alınıp son hacim 100 mM pH 8,5 Tris-HCl tamponu ile 0,5 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 2,5 ml 0,5 M Na₂CO₃ ve 0,5 ml folin reaktifi ilave edildi ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilip spektrofotometrede 660 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Kör olarak 0 µg/ml tirozin içeren 100 mM pH 8,5 Tris-HCl tamponu kullanıldı ve elde edilen sonuçlara göre 660 nm'deki absorbans değerinde meydana gelen değişimi gösteren tirozin standart grafiğı çizildi. Çizilen tirozin standart grafiğindeki doğrunun eğimi belirlenerek alkalın proteaz aktivitesinin hesaplanmasında kullanıldı (Takami *et al.* 1989).

3.2.5. Homojenat hazırlanması

B. licheniformis A10'un hücre izolatları 10000xg de 10 dakika santrifüjlenerek ortamdan uzaklaştırıldı. Ardından süpernatant Whatman I filtre kağıdından süzülerek homojenat elde edildi (Divakar *et al.* 2010).

3.2.6. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Proteinler çok değerli elektrolitler oldukları için iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında, protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su molekülleri, amonyum sülfat tuzundaki iyonlar tarafından çekilir ve proteinler çöker (salting-out). 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

Hazırladığımız homojenat için %10-20, %20-30, %30-40, %40-50, %50-60, %60-70, %70-80, %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 ve sonraki çalışmalarda çöktürme, belirlenen aralıkta yapıldı. Bütün bu işlemler +4°C'de buzun üzerinde gerçekleştirildi. Her defasında homojenatlar 5000xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlar ayrı behere alındı, çökelekler ise yeteri kadar 100 mM Tris-HCl (pH=8,5) ile çözüldü. Daha sonra hem süpernatantta hem de çökelekte ayrı ayrı enzim aktivitesine bakıldı (Ravindan *et al.* 2011).

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

3.2.7. DE52 anyon değişim kromatografisi

Bu çalışmada DE52 anyon değişim kromatografisinde kullanılan kolon dolgu materyali hazır olarak satın alındı ve ıslak iyon değişim jeli 15-30 ml/g oranında ve 200 mM Tris-HCl tamponu ile karıştırılarak 2-3 dk bekletildi. Daha sonra karışımın pH'sı 7,8 ayarlandı. Jelin bir süre dibe çökmesi beklenerek süpernatant dekante edildi ve dibe çöken jel tekrar tampon ile 15-30 ml/g oranında süspanse edildi. Uygun hacmi ölçülebilen bir cam silindire uygulanan karışımın dibe çökmesi beklendi ve süpernatant atıldı. Karıştırılmış jel çözeltisi kolona dökülerek yerçekimine karşı jelin yatak hacmi

sabit kalana kadar bu şekilde dengeleme tamponu ile paketlenildi. Daha sonra saatte 45 ml akacak şekilde peristaltik pompa ile kolon akış hızı sabitlenerek kolonun 50 mM Tris-HCl (pH=8,5) tamponu ile dengelenmesi sağlandı. Jel üzerindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirilerek diyalizden elde edilen homojenat pipet vasıtasıyla dikkatli bir şekilde kolona tatbik edildi ve bir gece +4°C'de homojenat ile kolonun bağlanması sağlandı. Daha sonra dengeleme tamponu ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemine, üstten ilave edilen yıkama tamponunun pH ve 280 nm'deki absorbans değerlerinin kolonun altından alınan elüatların pH ve 280 nm'deki absorbans değerleri eşit oluncaya kadar devam edildi. Yıkama tamamlandıktan sonra 50-500 mM NaCl içeren 50 mM Tris-HCl (pH=8,5) 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 3.2.4'deki gibi aktivite tayini yapıldı. Aktivite tayini yapılan elüat çözeltileri için kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı ve saflaştırma oranları belirlendi (Romero *et al.* 2001; Thangam and Rajkumar 2002).

3.2.8. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (sds-page) ile enzim saflığının kontrolü ve enzimin molekül kütlesinin tayini

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi ve molekül kütlesi kontrol edildi. Bunun için, elektroforez plakaları su ve alkol ile iyice yıkandı. Her iki plaka üst üste getirilerek kışkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabine konuldu. Daha sonra ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar dolduruldu ve jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığılma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığılma 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. Sonrada üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Daha sonrada önce markır 1µl ilk kuyucuğa yerleştirildi. 18 µl örneklerde diğer kuyucukalara yerleştirildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anota, üst taraftan ise (-) katota yerleştirildi. Önce 80 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra akım 100 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Daha sonra gümüş ve Coomassie Brilliant Blue boyası ile boyandı. Jeller boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine konuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcı üzerinde yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi (Laemmli 1970).

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 5 ml 1 M Tris-HCl pH=8,8, 4,4 ml %30'luk akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,2 ml %0,1'lik SDS, 0,13 ml %5'lik TEMED (N,N, N',N'-Tetrametil etilen diamin) ve 3,13 ml saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,27 ml %5'lik PER [amonyum persülfat, (NH₄)₂S₂O₈] eklendi.

Yığılma jeli şöyle hazırlandı: 0,41 ml 1 M Tris-HCl pH=6,8, 0,44 ml %30'luk Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,03 ml %0,1'lik SDS, 0,03 ml %5'lik TEMED ve 2, 45 ml saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,07 ml %5'lik PER eklendi. Elektroforez tankına jeller döküldü ve kuyucuklara örnekler yüklendi. Daha sonra örnekler 80 voltta 30 dk, 100 voltta örnekler yürütüldü. Yürütüldükten sonra jel çıkarıldı ve bantların görülmesi için boyamaya alındı. Bunun için gümüş boyama yapıldı. Jeller tespit çözeltisi ile 30 dk çalkalayıcıda çalkandı. Daha sonra redüksiyon çözeltisinde 30 dk çalkalayıcıda bekletildi. Ardından saf su ile 5 dk muamele edildi (3 kez tekrarlandı). Gümüş nitrat çözeltisiyle 20 dk çalkalayıcıda boyandı. Boyama çözeltisinden alınan jel saf su ile yıkandı ve yıkama çözeltisi 1'de bantlar belirinceye kadar yavaş yavaş çalkalandı. Daha sonra jel yıkama çözeltisi 2'ye bantların belirginleşmesi için alındı (Kazan vd 2005).

3.2.9. Alkalın proteaz enziminin zimogram analizi

B. licheniformis A10'dan üretilen alkalın proteaz enziminin zimogramı için, SDS-PAGE jel elektroforezi kullanıldı. Öncelikle yığma ve ayırma jeli hazırlandı ve elektroforez tankına döküldü. Daha sonra kuyucuklara %0,65'lik kazein katılan yükleme tamponuyla 1:1 oranında karıştırılan enzim çözeltisi yüklendi. Elektroforez sisteminde önce 80 voltta 30 dakika ardından voltu 100'e çıkararak numunelerin jelin alt sınırına kadar yürütülmesi sağlandı. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Çıkarılan jel 100 mM pH 8,5 Tris-HCl ile hazırlanan %2,5'luk TritonX-100 çözeltisinde SDS'nin uzaklaştırılması için bekletildi ve ardından Tris-HCl tamponu ile üç kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında jel %0,65'lik kazein çözeltisinde 37°C'de 30 dakika beklendi ve sonra da sabitleme çözeltisine alındı. Daha sonra jel sırasıyla Coomassie Brilliant Blue boyama çözeltisine ve yıkama çözeltisine konuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcı üzerinde yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi (Kazan vd 2005).

3.2.10. Proteaz enzimiyle ilgili yapılan kinetik çalışmalar

3.2.10.a Proteaz enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik çalışmalar

Optimum pH'yı belirlemek amacıyla %0,65 kazein içeren 0,1 M farklı pH değerlerindeki sodyum fosfat (pH6,0–8,0), Tris-HCl (pH 7,0–9,0) ve glisin-NaOH (pH 9,0-11,0) tampon çözeltileri hazırlandı ve her bir tampon-kazein çözeltisine 0,5 ml enzim eklenerek 37°C'de 10 dakika bekletildikten sonra bölüm 3.2.3'deki gibi aktivite tayini yapıldı (Haddar *et al.* 2009; Ravindan *et al.* 2011). Enzimin pH profili grafiğinin çiziminde en yüksek aktivitenin gözlemlendiği pH değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar ona göre bağıl aktivite (%) cinsinden birbiriyle kıyaslandı.

3.2.10.b. Proteaz enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik çalışmalar

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 1 ml tampon çözeltilere 1 ml enzim çözeltisi karıştırılarak 37°C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon öncesinde ve sonrasında bölüm 3.2.3'deki gibi aktivite tayini yapıldı (Rahman *et al.* 2006; Venugapol and Saramma 2007). Enzim 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.

3.2.10.c. Proteaz enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar

Proteaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 0,5 ml enzim çözeltisi; pH 8,5, 100 mM Tris-HCl tamponunda hazırlanan %0,65'lik kazein çözeltisinin 2,5 ml'siyle karıştırılarak, 20°C'den 80°C'ye kadar olan sıcaklık aralığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonrası bölüm 3.2.3'deki gibi aktivite tayini yapıldı (Rahman *et al.* 2006). Enzimin sıcaklık profili grafiğinin çiziminde en yüksek aktivitenin gözlemlendiği sıcaklık değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar ona göre bağıl aktivite (%) cinsinden birbiriyle kıyaslandı.

3.2.10.d. Proteaz enzimi için stabil sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar

Enzimin sıcaklık stabilitesini belirlemek için; 0,5 ml enzim çözeltisi, pH 8,5 100 mM Tris-HCl tamponuyla karıştırıldı ve 20°C'den 80°C'ye kadar olan sıcaklık aralığında 15, 30 ve 60 dk'luk sürelerde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon öncesinde ve sonrasında bölüm 3.2.3'deki gibi aktivite tayini yapıldı (Venugopal and Saramma 2007; Rao *et al.* 2009). Enzim sıcaklık kararlılığı grafiğinin çiziminde, farklı sıcaklık değerlerinde, inkübasyondan önceki aktivite miktarı 100 olarak kabul edilerek inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi (%) olarak ifade edildi.

3.2.10.e K_M , V_{max} , k_{cat} ve özgülük sabitinin (V_0) değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

Proteaz enziminin kazein substratı için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek amacıyla kazeinin %0,02-0,6 aralığında 6 farklı konsantrasyonda bölüm 3.2.3'deki gibi aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanılarak K_M ve V_{max} değerleri belirlendi ve aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi (Laemmli 1970; Rao *et al.* 2009). Daha sonra K_M ve V_{max} değerleri hesaplanması için gerçekleştirilen enzim çözeltisinde kantitatif protein tayini yapılarak toplam enzim miktarı bulundu. Enzim turnover sayısını gösteren k_{cat} değeri

$$k_{cat} = V_{max} / E_T$$

formülünden yararlanılarak hesaplandı.

Çeşitli enzimlerin enzimlerin katalitik etkilerinin veya farklı substratların aynı enzimle ürüne dönüşümünün karşılaştırılmasının başka bir açıklaması da tepkimeler için özgülük sabitinin (V_0) bulunmasıdır. Özgülük sabiti $V_0 = k_{cat} / K_M$ formülü kullanılarak hesaplandı (Nelson and Cox 2005).

3.2.11. Metallerin proteaz aktivitesi üzerindeki etkisine yönelik çalışmalar

Co^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} gibi +2 değerlikli metal iyonlarının ve K^+ , Ag^+ gibi +1 değerlikli metal iyonların *Bacillus licheniformis* A10'den izole edilen alkalın proteaz enziminin aktivitesine etkisini incelemek için 0,5 ml enzim çözeltisi, içerisinde 1, 5 ve 10 mM metal iyonu içeren 100 mM pH 8,5 Tris-HCl tamponunda hazırlanan %0,65'lik kazeinin 2,5 ml'si karıştırıldı ve bölüm 3.2.3'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). Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için GraphPad Software programı kullanıldı. $P < 0,005$ olanlar istatistiksel olarak önemli sayıldı.

3.2.12. Bazı organik çözücülerin proteaz aktivitesi üzerindeki etkisine yönelik çalışmalar

Bacillus licheniformis A10'dan saflaştırılan proteaz enziminin metanol, etanol, kloroform, izopropanol, bütanol, aseton, DMSO ve formamit 100 mM pH 8,5 Tris-HCl tamponu ile %15, %25, %50 oranlarında hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler 50 µl enzim 450 µl tampon ile karıştırılıp 1 saat ve 24 saatteki aktivitelerine bölüm 3.2.3'deki gibi bakıldı. 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). Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için GraphPad Software programı kullanıldı. $P < 0,005$ olanlar istatistiksel olarak önemli sayıldı.

3.2.13. Proteaz aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerinin etkisinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

Bacillus licheniformis A10'dan izole edilen alkalın proteaz enziminin aktif bölgesinde katalizden sorumlu amino asitlerin varlığını belirlemek amacı ile inhibitörlerden; Üre, beta-merkaptotanol, EDTA ve serin amino asitinin spesifik inhibitörü PMFS çözeltileri %1 ve %5'lik, üre ise %1 ve %8'lik hazırlandı ve 50 µl enzim 450 µl tampon ile karıştırılıp yarım saat bekletildikten sonra bölüm 3.2.3'deki gibi aktivitesi ölçüldü. İnhibisyon çözeltisi içermeyen enzim çözeltisinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi ve inhibitör içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplandı (Ferrero *et al.* 1996).

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

Yüzey aktif maddelerinden SDS, Triton X-100, Tween-20, Tween-80 ve H₂O₂ (yükseltgen)'nin *Bacillus licheniformis* A10'dan izole edilen alkalın proteaz enziminin aktivitesi üzerine etkisi incelendi. 0,5ml enzim çözeltisi, %1 ve %5 SDS, %1 ve %5 Tween-20, %1, %5 Triton X-100, %1, %5 Tween-80 ve %1, %5 H₂O₂ içeren tampon ile

karıştırıldı ve 37°C'de, 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon öncesinde ve sonrasında bölüm 3.2.3'deki gibi aktivite tayini yapıldı. İnkübasyondan önceki aktivite miktarı 100 olarak kabul edilerek inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi olarak ifade edildi (Johnvesly and Naik 2001; Kazan vd 2005; Shah *et al.* 2010).

3.2.15. Alkalın proteaz enziminin doğal substratlara karşı özgünlüğünün belirlenmesi

Bacillus licheniformis A10'dan izole edilen alkalın proteaz enziminin doğal substratlardaki aktivite miktarının belirlenmesi için 0,5 ml enzim çözeltisi ile 2,5ml substrat çözeltisi deney tüpünde karıştırıldı ve bölüm 3.2.3'deki gibi aktivite tayini yapıldı. Substrat çözeltisi olarak 50 mM pH 8,5 Tris-HCl tamponunda hazırlanan %0,65'lik kazein, hemoglobin, jelatin, BSA ve azokazein kullanıldı. En yüksek aktivite gösterdiği substrata olan aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğerleride ona göre hesaplandı (Johnvesly *et al.* 2001).

4. ARAŞTIRMA ve BULGULAR

4.1. Petride Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

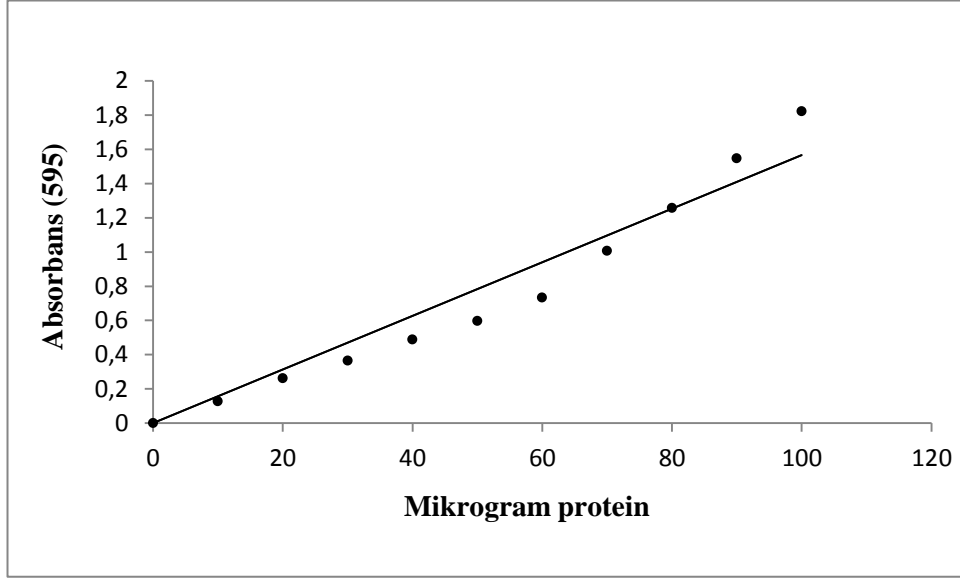
İnkübasyon sonrası inokülasyon bölgesi etrafında 38 mm çapında açık bir zon gözlemlendi ve bu durum proteaz aktivitesi açısından pozitif olarak değerlendirildi.



Şekil 4.1. Petrideki proteaz aktivitesi

4.2. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

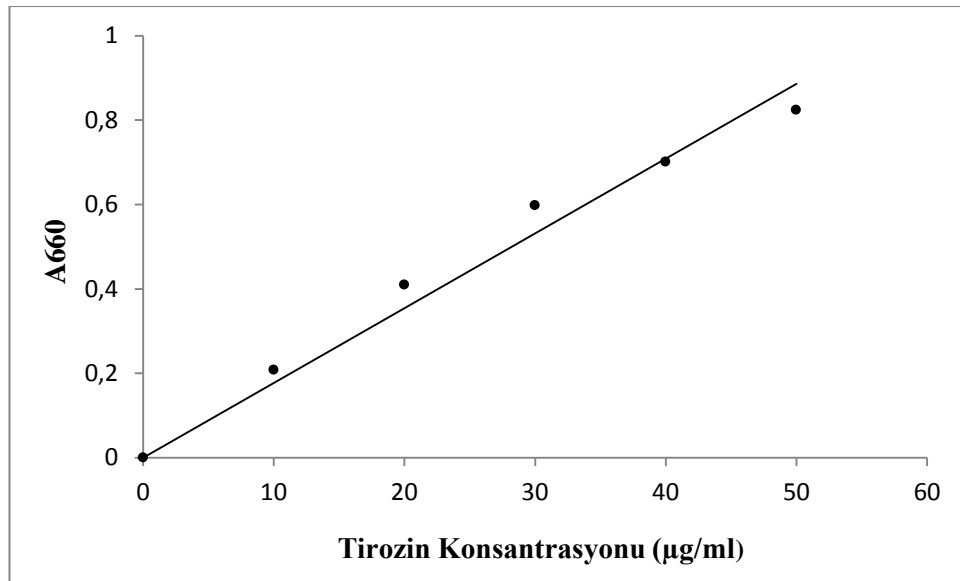
Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Standart grafik bölüm 3.2.3.b’de anlatıldığı gibi hazırlandı. Ham homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.2’de gösterildi.



Şekil 4.2. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik

4.3. Proteaz Aktivitesi Hesaplamasında Kullanılan Tirozin Standart Grafiği

Proteaz aktivitesi hesaplamasında kullanılan tirozin standart grafiği bölüm 3.2.2’de anlatıldığı gibi hazırlandı. Standart çözeltilerin $\mu\text{g/ml}$ proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.3’de gösterildi.



Şekil 4.3. Proteaz aktivitesi için standart tirozin grafiği

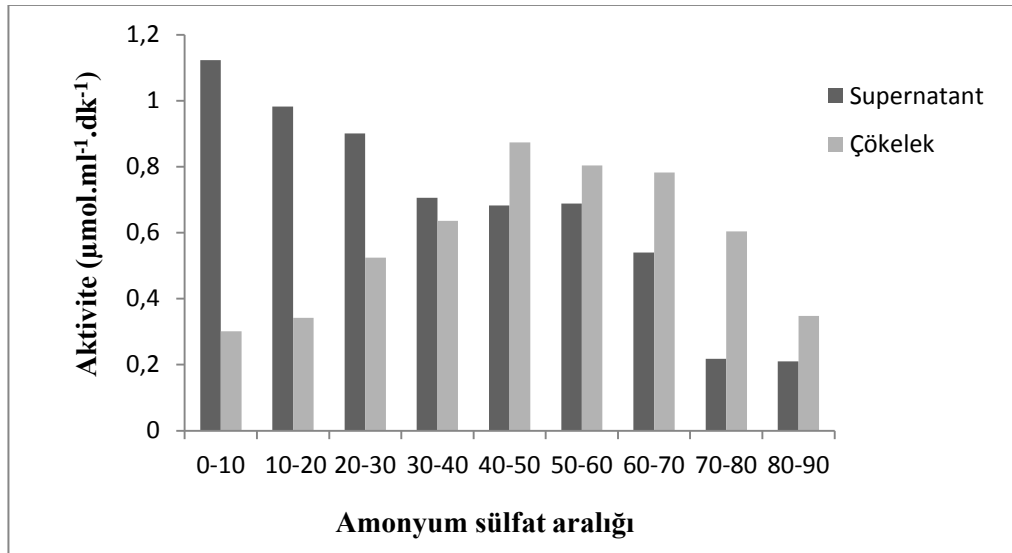
4.4. Proteaz Enziminin Saflaştırılma Sonuçları

4.4.1. Amonyum sülfat çöktürmesi ve sonuçları

Proteaz enzimini saflaştırmak için hazırlanan homojenata bölüm 3.2.6'da anlatıldığı gibi %0-90 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Elde edilen çökelek 100 mM Tris-HCl (pH=8,5) tampon çözeltisinde çözülerek bir sonraki işleme hazır hale getirildi.

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

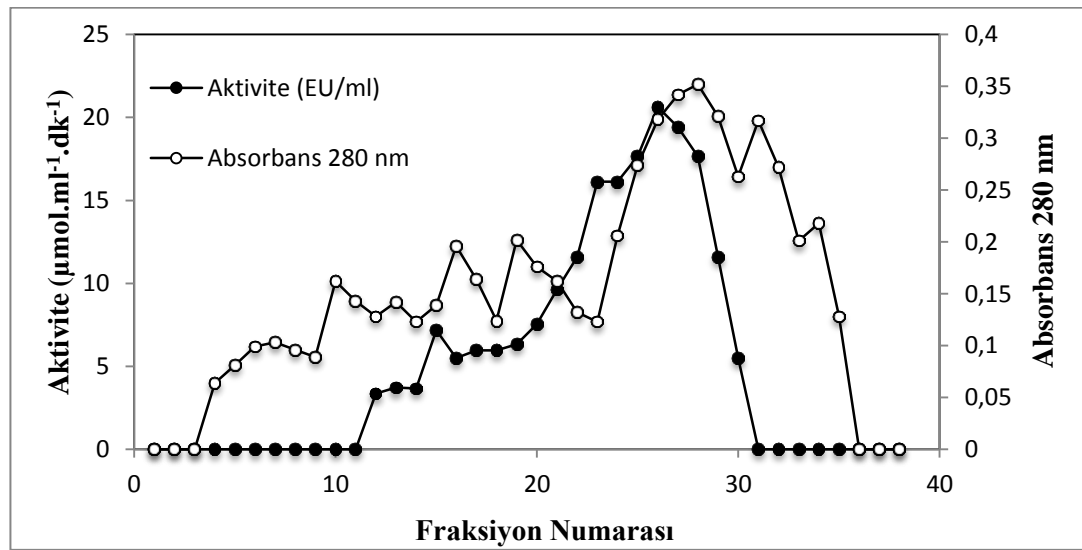
Amonyum sülfat aralığı (%)	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90
Süpernatant	0,901	0,840	0,768	0,706	0,683	0,688	0,540	0,218	0,210
Çökelek	0,301	0,342	0,524	0,636	0,874	0,804	0,782	0,604	0,348



Şekil 4.4. Doygunluk aralığına göre amonyum sülfat çöktürme grafiği

4.4.2. DE52 anyon değişim kromatografisi sonuçları

Hazırlanan homojenata %90 doğunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldıktan sonra diyaliz işlemleri yapıldı. Diyaliz edilen numune DE52 anyon değişim kolonuna tatbik edildi. 50-500 mM arasında NaCl içeren 100 mM Tris-HCl pH 8,5 tamponuyla hazırlanan çözeltiler ile elüsyon yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.5’de gösterildi.



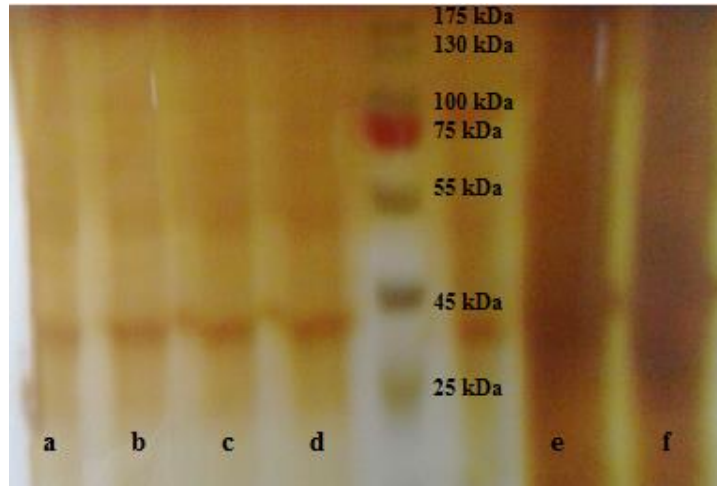
Şekil 4.5. Proteaz enziminin DE52-Selüloz anyon değişim kromatografisi ile elüsyonunu gösteren grafik

Çizelge 4.2. Proteaz enziminin saflaştırma 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	90	38,60	643,50	3474	57915	0,059	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi	15	33,75	431,07	506,52	6466,05	0,078	14,57	1,32
DE-52 Anyon değişim kromatografisi	18	18,23	219,77	328,14	3955,86	0,082	9,44	1,38

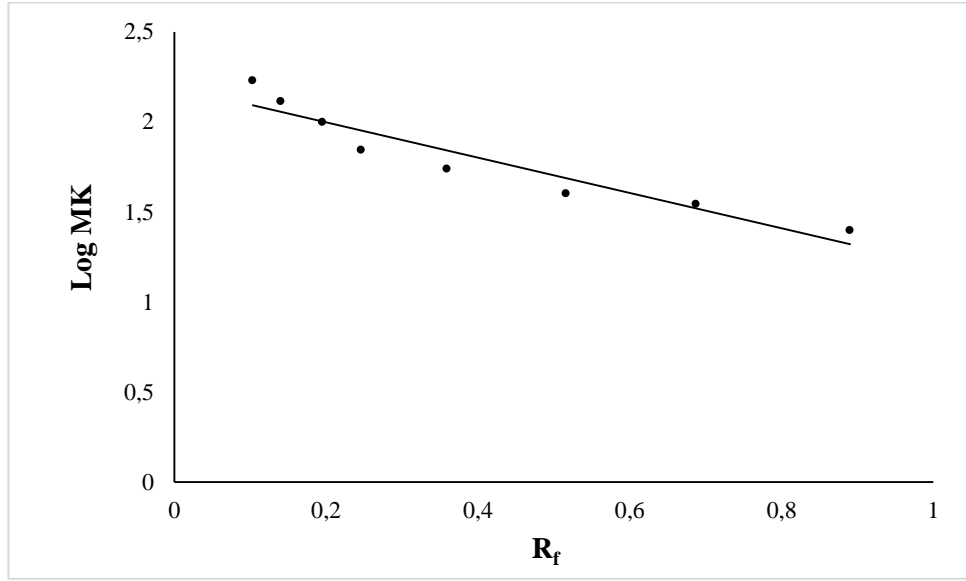
4.4.3. DE52 kolonuyla enzim saflaştırılması sonuçları ve sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü ve enzimin molekül kütesinin tayini

Proteaz enziminin DE52 anyon değişim kromatografisi sonucu elde edilen elüatlardaki enzimlerin saflığını kontrol ve molekül kütesinin tespiti etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla bölüm 3.2.7'deki gibi izah edilen elektroforez sistemi kurularak enzim numunesi kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.6'da gösterildi. Standart proteinlerin ve enzimin jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek R_f değerleri hesaplandı. Log MK- R_f değerleri ile grafik çizildi (şekil 4.7). Grafikten yararlanılarak proteaz enziminin molekül kütesi yaklaşık 40,55 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 4.6. DE52 anyon değişim kromatografisi sonrası elde edilen proteaz enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

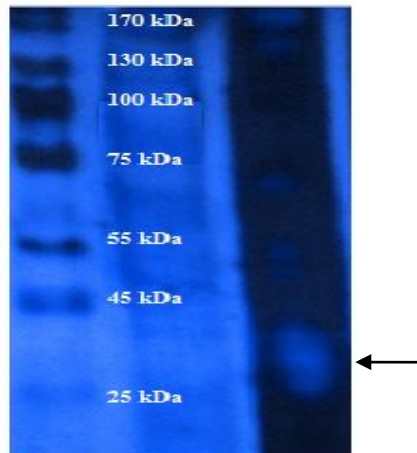
*a, b, c, d: SDS-PAGE sonrası, e: Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası, f: Homojenat



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

4.4.4. Alkalin proteaz enziminin zimogramının belirlenmesine yönelik sonuçlar

Proteaz enzimi %3-10'luk kesikli SDS-PAGE jelinde yürütülerek zimogram analizi ile enzimin aktivite bandı gözlendi. Şekil 4.8'de görülen proteaz enziminin bulunduğu yer, enzimin kazeini parçalamasından dolayı diğer bölgelere oranla daha açık renkte görünmektedir. Bu durum proteaz enziminin varlığını teyit etmektedir.



Şekil 4.8. *B. licheniformis* A10'dan izole edilem alkali proteazın zimogram görüntüsü

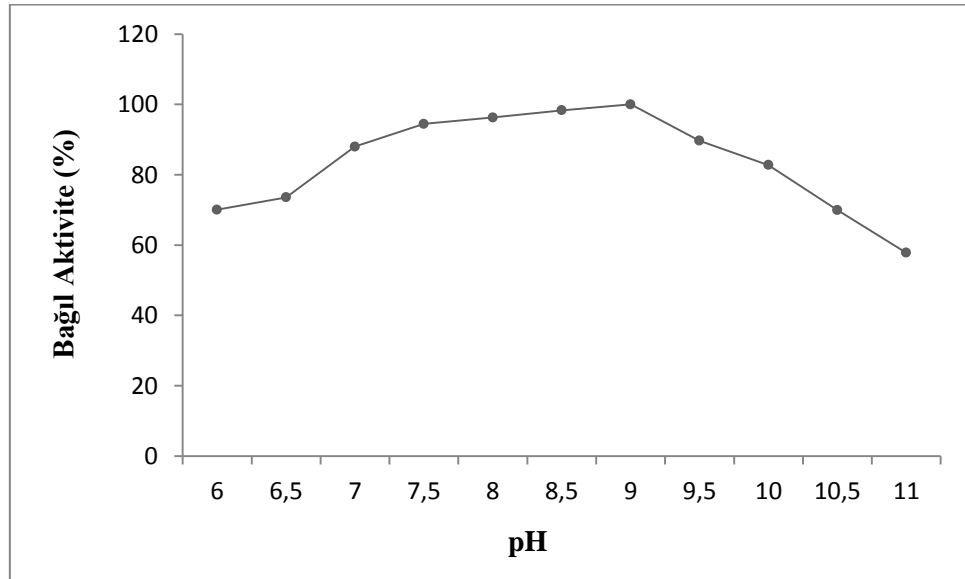
4.4.5. Proteaz enziminin optimum şartlarının belirlenmesine yönelik sonuçlar

4.4.5.a. Proteaz enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar

Proteaz enziminin optimum pH'sı bölüm 3.2.9.a'da anlatıldığı şekilde; %0,65 kazein içeren farklı pH değerlerindeki 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 enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. Proteaz enzimi için optimum pH, 100 mM Tris-HCl pH=9,0 tamponu olarak belirlendi.

Çizelge 4.3. 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	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10	10,5	11
Bağlı Aktivite(%)	70,06	73,57	87,97	94,46	96,27	98,33	100	89,67	82,73	69,95	57,82



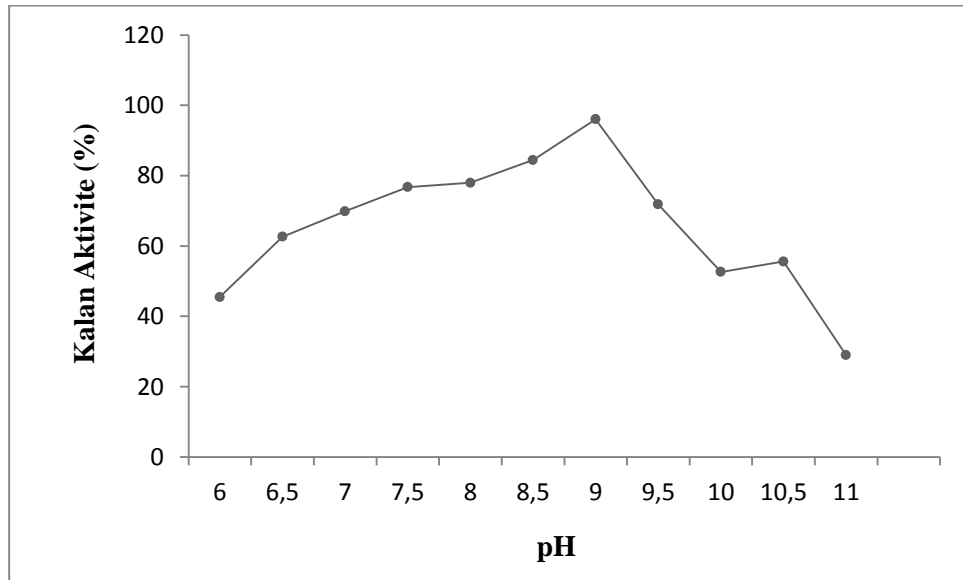
Şekil 4.9. Proteaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği

4.4.5.b. Proteaz enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik sonuçlar

Proteaz enziminin stabil pH'sı bölüm 3.2.9.b'de anlatıldığı şekilde; 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 enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. Proteaz enzimi için stabil pH, 100 mM Tris-HCl pH=9,0 tamponu 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 stabil pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10	10,5	11
Kalan Aktivite (%)	45,46	62,64	69,89	76,76	77,86	84,42	96,02	71,84	52,65	55,59	28,97



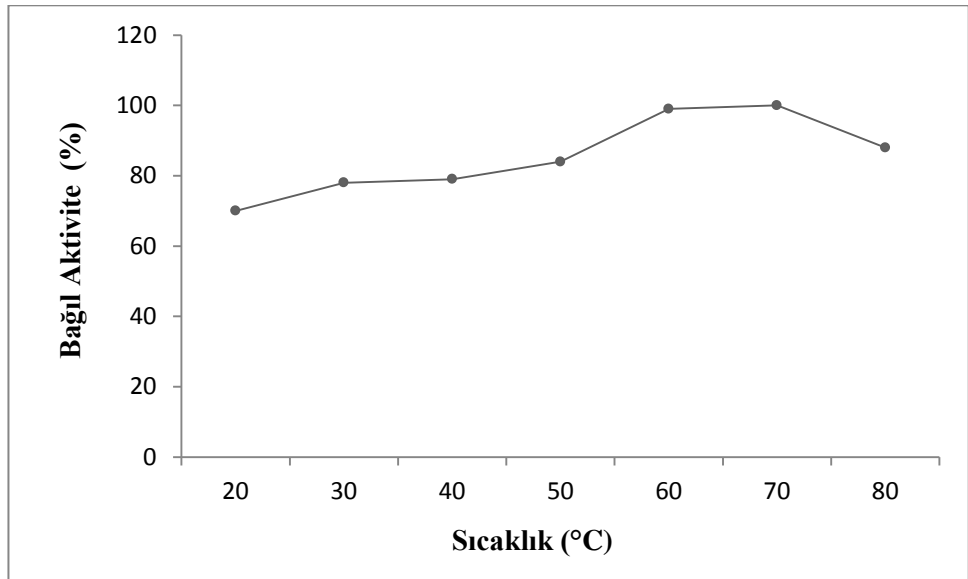
Şekil 4.10. Proteaz enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

4.4.5.c. Proteaz enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik sonuçlar

Proteaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 20°C ile 80°C arasında her 10°C’de bir olmak üzere bölüm 3.2.9.c’de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen eğriler şekil ve çizelgelerde gösterildi. Bu çalışmalar sonucu optimum sıcaklık 70°C olarak tespit edildi.

Çizelge 4.5. Proteaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık- bağıl aktivite (%) ölçüm sonuçları çizelgesi

Sıcaklık (°C)	20	30	40	50	60	70	80
Bağıl Aktivite (%)	70,44	77,86	78,58	84,11	98,76	100	87,82



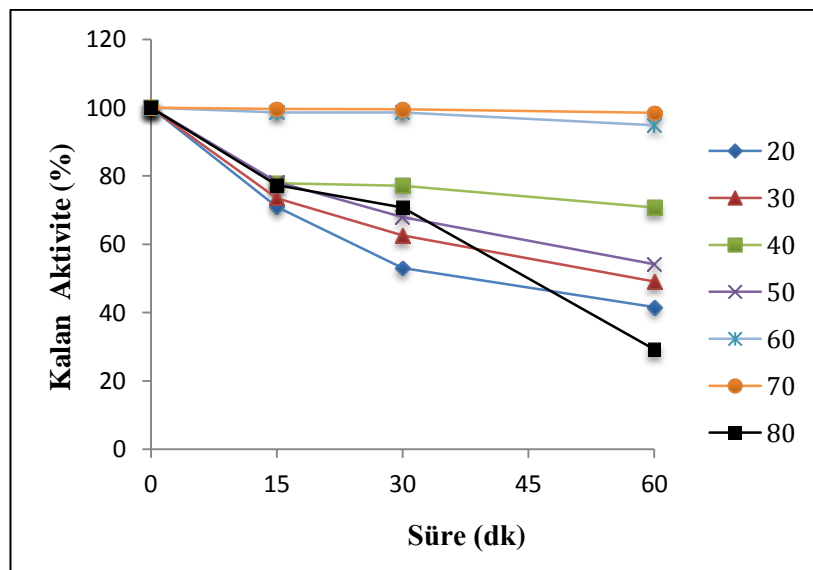
Şekil 4.11. Proteaz enzimi optimum sıcaklık ölçülmesi için çizilen sıcaklık-bağıl aktivite grafiği

4.4.5.d. Proteaz enzimi için stabil sıcaklığın belirlenmesine yönelik sonuçlar

Proteaz enziminin sıcaklık stabilitesini belirlemek amacıyla 20°C'den 80°C'ye kadar olan sıcaklık aralığında 15, 30 ve 60 dk'luk inkübasyon sürelerinde, bölüm 3.2.9.d'de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen veriler çizelge 5.6 ve şekil 4.12'de gösterildi. Proteazın 30°C'de 60 dk'luk inkübasyon süresinin sonunda aktivitesinin %85'ini koruduğu ve diğer sıcaklık değerleriyle karşılaştırıldığında uzun süre stabil kaldığı görüldü. 40°C, 50°C, 60°C ve 70°C'de 60 dakikalık inkübasyon sonunda aktivitesinin sırasıyla %70,74, %54,22, %94,82 ve %98,47'ini koruduğu belirlendi. Ancak enzimin 20°C, 30°C ve 80°C'de aktivitesinin azaldığı görüldü.

Çizelge 4.6. 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	71,00	73,50	77,93	78,30	98,62	99,59	77,29
30	53,07	62,52	77,18	67,95	98,62	99,51	70,74
60	41,60	49,16	70,74	54,22	94,82	98,47	10,08

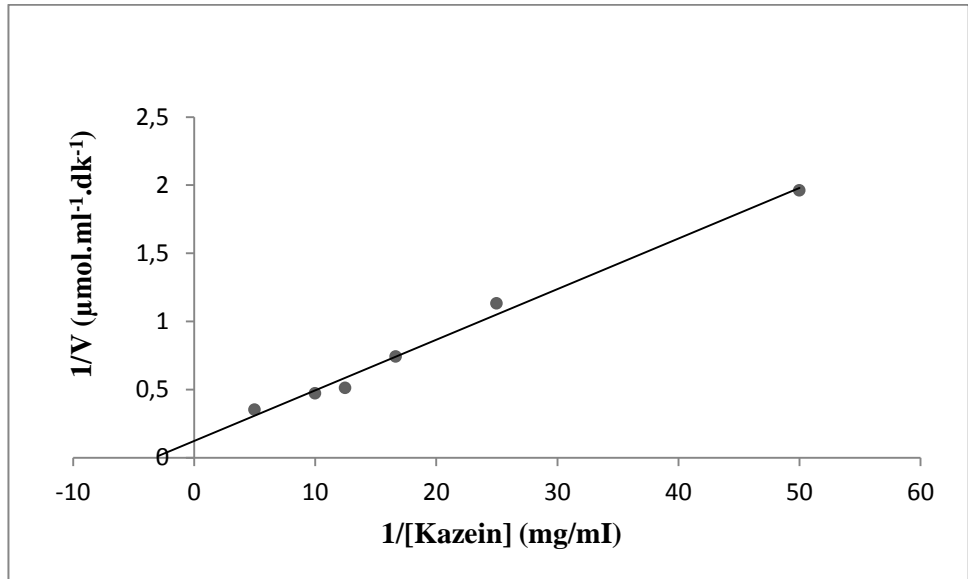


Şekil 4.12. Proteaz enzimi için sıcaklık kararlılık grafiği

4.4.5.e. K_M , V_{max} , k_{cat} ve özgülük sabitinin (V_0) değerlerinin bulunmasına yönelik sonuçlar

Proteaz enziminin kazein substratı için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek amacıyla bölüm 3.2.9.e'de anlatıldığı gibi kazeinin %0,02-0,6 aralığında altı farklı konsantrasyonda aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle $1/V-1/[Kazein]$ Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanılarak kazein için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Bu çalışmalar sonucunda K_M değeri 0,033 mg/ml ve V_{max} değeri $8,17 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{dk}^{-1}$ olarak tespit edildi. Ayrıca yapılan k_{cat} ve V_0 değerleri sırasıyla

$1,392 \text{ s}^{-1}$ ve $42,18 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ olarak belirlendi. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7 ve 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

Çizelge 4.7. Proteaz enzimi için K_M , k_{cat} , V_0 ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik Kazein derişimi aktivite çizelgesi

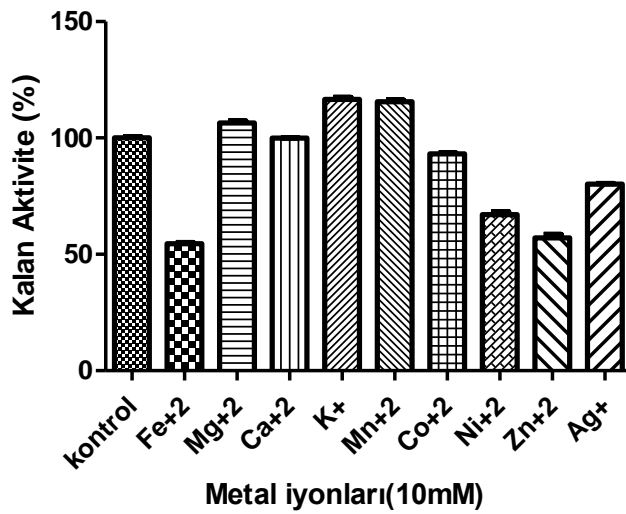
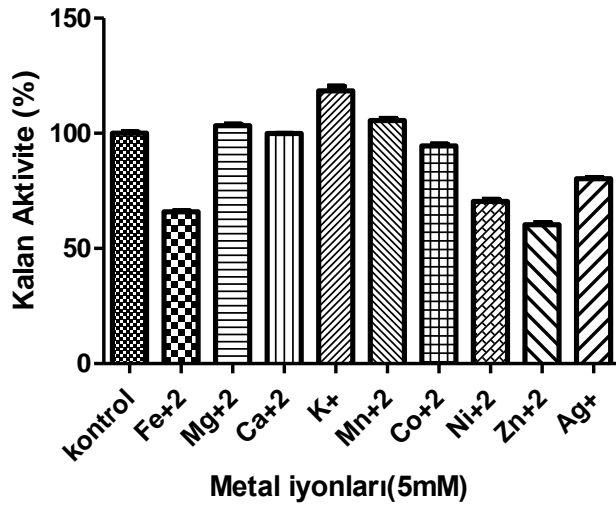
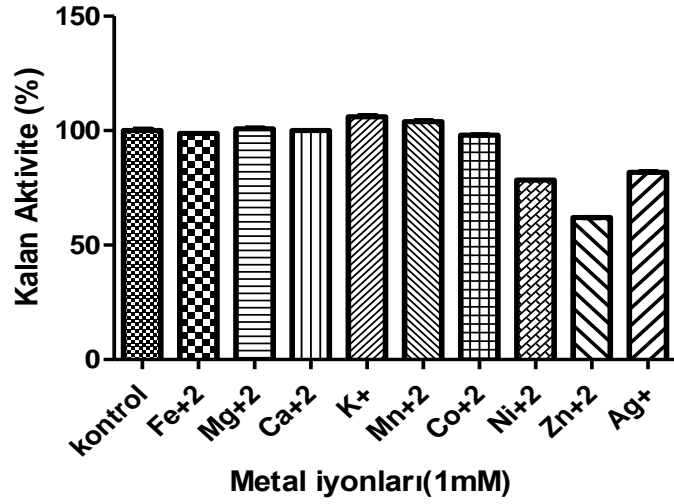
Substrat	V_{max} ($\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{dk}^{-1}$)	K_M (mg/ml)	k_{cat} (s^{-1})	V_0 ($\mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
Kazein	8,17	0,033	1,392	42,18

4.5. Metallerin Proteaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisine Yönelik Sonuçlar

Metal iyonlarının alkalın proteaz aktivitesine 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 iyonlar kullanarak bölüm 3.2.3'de anlatıldığı gibi proteaz aktivitesi belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8 ve Şekil 4.13'de verildi. Bu sonuçlara göre Mg^{+2} yaklaşık %5'lik bir artışa, Mn^{+2} ve K^+ iyonları enzimin aktivitesinde yaklaşık %14,8'lik bir artışa sebep olurken, Ca^{+2} iyonununda enzim aktivitesini etkilemediği belirlendi. Zn^{+2} ve Fe^{+2} iyonları varlığında ise alkalın proteaz enzimi aktivitesinde yaklaşık %50 oranında bir kayıp gözlemlendi.

Çizelge 4.8. Metal iyonlarının *Bacillus licheniformis* A10 Alkalın Proteaz Aktivitesi üzerine etkisi

Metal iyonları	Konsantrasyon (mM)	Kalan Aktivite (%)
Kontro	0	100
Fe ⁺²	1	98,84
	5	66,48
	10	55,44
Mg ⁺²	1	100,44
	5	103,32
	10	105,05
Ca ⁺²	1	100,1
	5	99,86
	10	100,1
Mn ⁺²	1	103,42
	5	103,9
	10	114,83
Co ⁺²	1	98,13
	5	95,72
	10	92,39
Ni ⁺²	1	78,47
	5	71,68
	10	67,64
Zn ⁺²	1	62,13
	5	62,00
	10	59,83
Ag ⁺	1	81,90
	5	81,22
	10	80,78
K ⁺	1	105,63
	5	114,67
	10	114,83



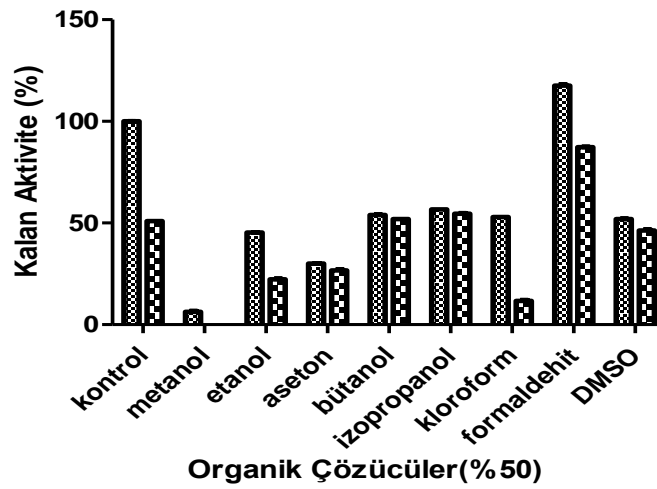
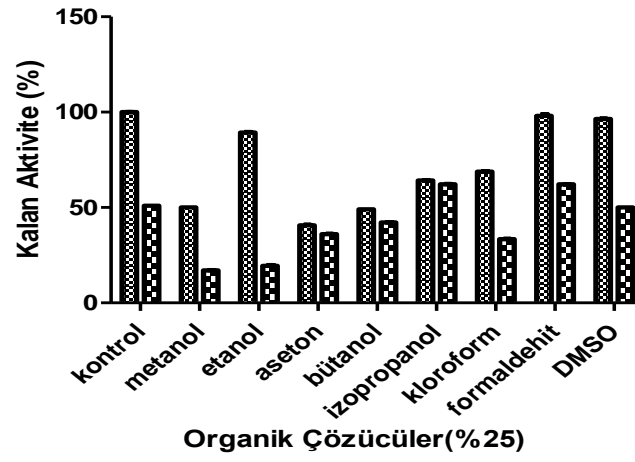
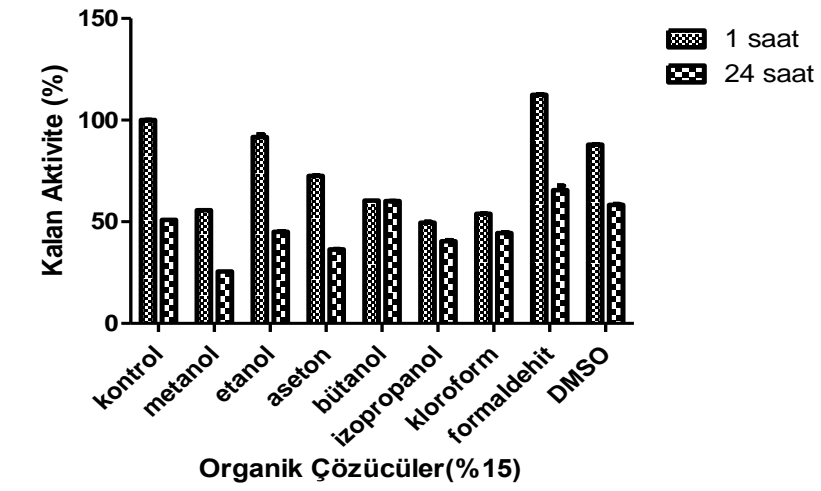
Şekil 4.14. Metal iyonlarının 1mM, 5mM ve 10mM'daki enzim aktivitesine etkisi grafikleri

4.6. Organik Çözücülerin Proteaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisine Yönelik Sonuçlar

%15, %25, %50'lik organik çözeltiler ile muamele edilen enzimin 1 ve 24 saatteki aktivitesine bölüm 3.2.3'deki gibi enzim aktivitesine etkisi belirlendi ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9 ve Şekil 4.14'de gösterildi. Bu sonuçlara göre, formaldehit dışındaki bütün organik çözücüler varlığında enzimin aktivitesinin %50' sini hatta daha fazlasını kaybettiği görüldü. Ancak formaldehitin %15 oranında arttırdığı gözlemlendi.

Çizelge 4.9. Organik çözücülerin *Bacillus licheniformis* A10 Alkalın Proteaz Aktivitesi üzerine etkisinin 1 ve 24 saat aralıktaki sonuçları

Organik çözücüler	Konsantrasyon(%)	Kalan aktivite (1h)	Kalan aktivite (24h)
Metanol	%15	55,69	25,51
	%25	50,03	17,33
	%50	6,60	0
Etanol	%15	92,99	45,31
	%25	89,53	19,82
	%50	45,31	22,62
Aseton	%15	72,68	36,58
	%25	40,59	36,10
	%50	29,95	26,43
Bütanol	%15	60,41	60,17
	%25	49,08	42,36
	%50	53,08	31,99
İzopropanol	%15	49,08	40,91
	%25	64,02	62,30
	%50	56,64	54,87
Formaldehit	%15	112,33	63,54
	%25	97,23	62,10
	%50	117,05	87,13
Kloroform	%15	53,80	44,76
	%25	68,91	33,69
	%50	52,95	11,32
DMSO	%15	78,79	58,73
	%25	97,27	50,03
	%50	51,91	46,69



Şekil 4.15. Organik çözücülerinin (%15, %25, %50) 1 ve 24 saatteki enzim aktivitelere etkisi

4.6. Proteaz Aktivitesi Üzerine Bazı İnhibitörlerin Etkisinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

Hazırlanan 1 mM ve 5 mM'lık β -merkaptotanol, EDTA, DTNB, PMSF; 1 mM ve 8 mM'lık üre çözeltileri ile enzim muamele edilip yarım saat bekletilerek bölüm 3.2.3'de anlatıldığı gibi aktiviteye etkisine bakıldı. Kontrol için kullanılan enzim inhibisyon çözeltisi ile muamele edilmedi ve 100 olarak alındı. Sonuçlara bakıldığında enzimin PMSF varlığında aktivitesini tamamen kaybettiği, EDTA varlığında aktivitesinin %98'ini kaybettiği, ancak β -merkaptotanol varlığında aktivitesinde artış olduğu gözlemlendi.

Çizelge 4.10. İnhibisyon çözeltilerinin *Bacillus licheniformis* A10 Alkalın Proteaz Aktivitesi üzerine yönelik çalışmalarının sonuçları

İnhibisyon çözeltileri	Konsantrasyon (mM)	Kalan aktivite (%)
Kontrol	0	100
β -merkaptotanol	1	193,65
	5	169,85
PMSF	1	2,82
	5	0
EDTA	1	2,42
	5	0,80
DTNB	1	48,64
	5	43,4
Üre	1	28,89
	8	4,29

4.8. Alkalın Proteaz Aktivitesi Üzerine Yüzeysel Aktif Maddelerin ve Okside Edici Ajanın Etkisinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

%1 ve %5'lik TritonX-100, Tween-20, Tween-80, SDS gibi yüzeysel aktif maddeleri ve H₂O₂ (okside edici ajan) ile hazırlanan çözeltiler enzim ile yarım saat muamele edilip bölüm 3.2.3'de anlatıldığı gibi aktivite tayini yapıldı. Bulunan sonuçlara göre; SDS'nin enzimi inhibe ettiği, %1'lik TritonX100, Tween-20, Tween-80 varlığında ise sırasıyla

kalan aktivitelerin %61, %41 ve %28 olduğu, %5'lik TritonX-100, Tween-20, Tween-80 varlığında ise yaklaşık %44, %34 ve %27 olduğu görüldü.

Çizelge 4.11. Yüzey aktif maddeleri ve okside edici ajan varlığında *Bacillus licheniformis* A10'dan izole edilen alkalın proteaz aktivitesi üzerine etkisi sonuçları

Yüzey aktif maddeleri ve okside edici ajan	Konsantrasyon (%)	Kalan Aktivite (%)
Kontrol	0	100
SDS	1	4,03
	5	0
TritonX-100	1	61,72
	5	44,38
Tween-20	1	41,15
	5	34,29
Tween-80	1	28,03
	5	27,83
H ₂ O ₂	1	27,28
	5	26,21

4.9. Alkalın Proteaz Enziminin Doğal Substratlara Olan Özgünlüğünün Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

Alkalın proteaz enziminin farklı substratlardaki aktivite miktarının belirlenmesi için 100 mM pH8,5 Tris-HCl tamponunda hazırlanan %0,65'lik kazein, hemoglobin, jelatin, BSA ve azokazein substrat çözeltisi kullanılarak bölüm 3.2.14'de belirtildiği yönteme göre aktivite tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.12'de gösterildi. *Bacillus licheniformis* A10'dan saflaştırılan alkali proteaz enziminin en iyi kazein ve azokazein varlığında aktivite gösterdiği tespit edildi.

Çizelge 4.12. Alkalın proteaz enziminin doğal substratlara olan aktivitesi

Doğal Substratlar (%0,6 w/v)	Kazein	Azokazein	Hemoglobin	Jelatin	BSA
Bağıl Aktivite (%)	100	97,36	28,73	60,40	17,74

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Alkalın proteazın uygulama alanları gıda ve besin endüstrisi, peptid sentezi, deri endüstrisi, endüstriyel ve evsel atıkların giderilmesi, fotoğraf endüstrisi, medikal alanlar, ipek işlenmesi ve en çok talep gördüğü deterjan endüstrisidir (Gençkal 2006).

Mikrobiyal proteazlar; mikroorganizmaların hızlı gelişmeleri, hücre kültürleri için limitli alanların yeterli olması ve genetik uygulamalarla yeni enzimlerin meydana getirilmesini sağladığı için enzim kaynağı olarak tercih edilmektedir. Böylece enzimleri üreten yeni mikroorganizmaların izolasyonu giderek önem kazanmaktadır. Çünkü artık reaksiyonları hızlandıran, olumsuz koşullara karşı daha dayanıklı olan yeni alkalın proteazlara ihtiyaç duyulmaktadır. Alkalın proteazlar, deterjan enzimlerinin önemli bir grubudur ve organik çözücüler varlığında doğal olarak stabil olmaları önemlidir. Bu nedenle özellikle *Bacillus* cinsi bakterilerden alkalın proteaz üretimi deterjan endüstrisi için oldukça ilgi gören bir konudur (Schallmey *et al.* 2004). Organik çözücülerini tolere edebilen bakteri proteazlarının kullanılması; denatürasyon, enzimin inaktive olması ve organik ortamdaki düşük ürün miktarı gibi önemli problemlerin çözümlenmesini sağlayabilmektedir (Haki and Rakshit 2003). Bu öneminden dolayı çok sayıda çalışma yapılmış ve birçok kaynaktan saflaştırılmış enzimin biyokimyasal özellikleri incelenmiştir.

Bu çalışmada *Bacillus licheniformis* A10 suşundan hücre dışı proteaz enzimi saflaştırılarak karakterize edilip, çeşitli kinetik özellikleri incelendi.

B. licheniformis A10'un hücre izolatlarının santrifüj ile uzaklaştırılmasıyla elde edilen homojenatlar %0-10, %10-20, %20-30, %30-40, %40-50, %50-60, %60-70, %70-80 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılarak proteaz enziminin %0-90 aralığında çöktüğü belirlendi. Amonyum sülfat çöktürmesi, etanol ve aseton gibi organik çözücülerle proteinlerin presipite edilmesi, filtrasyon ve ultrafiltrasyon gibi yöntemler, pek çok çalışmada kullanılan kısmi saflaştırma metodlarıdır. İyonik gücün

arttırılmasıyla proteinlerin agrege edilmesi esasına dayanan amonyum sülfat çöktürmesi metodu ile numune içerisindeki birçok safsızlık elimine edilir ve proteinler daha derişik halde elde edilir (Haddar *et al.* 2009; Rai and Mukherjee 2010). Yapılan çalışmalarda *B. licheniformis*'nin farklı suşlarından elde edilen kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin amonyum sülfat çöktürme aralıkları %10-80 (Rao *et al.* 2009), %30-80 (Sari 2011), %35-80 (Sonuç 2011) olarak belirlenmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra 100 mM Tris-HCl (pH=8,5) tamponunda diyaliz yapıldı. Diyalizin yapılması ise anyon değişim kromatografisinden önce ortamdaki iyonların uzaklaştırılması açısından önemlidir.

Yapılan çalışmalarda alkali proteazın saflaştırılmasında sırasıyla en fazla kullanılan yöntemler; jel filtrasyon kromatografisi, anyon değişim kromatografisi (Ramakrishna *et al.* 2010; Ghafoor and Hasnain 2010; Shah 2010), katyon değişim kromatografisi (Kumar 2002; Uchida *et al.* 2004; Haddar *et al.* 2009) ve afinite kromatografisidir (Coyle and Baneyx 2014; Kuhar *et al.* 2014). Bu çalışmada; proteaz enzimi, DE52 anyon değişim kromatografisi yöntemiyle %9,44 verimle, 1,38 kat saflaştırıldı. Literatürde benzer çalışmalar incelendiğinde; *Bacillus* türlerinden izole edilen proteaz enziminin %16,8 verimle, 2,11 kat (Sevinç 2010); ham petrol örneklerinden izole edilen *Bacillus* cinsi bakterilerden enzimin %11 verimle, 58 kat (Shah *et al.* 2010); yine *Bacillus* türleri üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise enzimin verimi ve saflaştırma katsayılarının sırasıyla %35 ve 17 (Kerimak 2008) olduğu gözlemlenmiştir. Tekin (2008)'in yaptığı çalışmada ise *B. licheniformis* DSM13'den izole edilen proteaz 1,6 kat %29,5 verimle proteaz enzimi saflaştırılmıştır. Literatür taramaları sonucunda, verimlerimizin bazı çalışmalarla benzer bir verime ve saflaştırma katsayısına sahip olduğu belirlendi.

B. licheniformis A10'dan elde edilen ürünün moleköl kütlesi SDS-PAGE ile yaklaşık 40,55 kDa olarak tespit edildi. Zimogram analizi ile proteaz enziminin aktivite bandı belirlendi. Saptanan proteaz enziminin bulunduğu yer enzimin kazeini parçalamasından dolayı diğer bölgelere oranla daha açık renkte görünmektedir ki bu da proteaz enziminin varlığını teyit etmektedir. Öztürk'ün (2007) halotolerant *B. licheniformis* BA17'den

saflaştırdıkları alkalın proteazın molekül kütlesi 19,7 kDa olarak, Huang *et al* (2002) *B. pumilus*'a ait alkalın serin proteazın 32 kDa, Erarslan vd (2004) *B. clausii* GMBAE 42'ye ait serin alkalın proteazın 26,550 kDa olduğu belirtilmiştir. Ayrıca; Ryu *et al* (2008) *Bacillus sp.* RKY3'e ait alkalın proteazın 38 kDa; Kerimak (2008)'nin *B. marmariensis* GMBE 72 ile yaptığı çalışmada enzimin molekül kütlesi yaklaşık olarak 24,26 kDa olarak bulunmuştur. Kumar and Takagi (1999) *Bacillus spp.*'den saflaştırdıkları AP1 ve AP2 proteazların sırasıyla 28 ve 29 kDa olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada saflaştırılan proteaz enziminin molekül kütlesi, literatürdeki bazı çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

B. licheniformis A10'dan elde edilen proteaz enziminin, sıcaklık profili incelenmiş ve optimum sıcaklık değerinin 70°C olduğu tespit edildi. Kumar and Takagi (1999)'ın *Bacillus spp.*'den saflaştırdıkları AP1 ve AP2 olarak adlandırdıkları proteazların optimum sıcaklıkları sırasıyla 50 ve 55°C olarak bildirilmiştir. Sevinç (2010)'in yaptığı çalışmada *Bacillus spp.*'den izole edilen proteaz enziminin optimum sıcaklığı 55°C, Tekin (2008)'in çalışmasında *B. licheniformis* DSM13'den izole edilen proteazın optimum sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur. Ayrıca, Bezawada *et al.* (2011)'in çalışmasında *B. licheniformis* ATCC 21424'den izole edilen alkalın proteazın optimum sıcaklığı 60°C olarak belirlenmiştir. Optimum reaksiyon sıcaklığı, enzimler için özellikle de proteazlar açısından oldukça önemli bir parametredir (Sonuç 2011). Literatürdeki verilerle kıyaslandığında; bu tez kapsamında *B. licheniformis* A10'dan elde edilen proteaz enziminin yüksek bir optimum sıcaklık değerlerine sahip olması, bu enzimin özellikle deterjan endüstrisinde kullanılabilirliğinin oldukça yüksek olabileceğini göstermektedir.

B. licheniformis A10'dan elde edilen proteaz enziminin sıcaklık kararlılığı incelendiğinde, enzimin 70°C'de 60. dakikada %98 aktivite kararlılığını koruduğu görüldü. Enzim 60°C 'de 60. dakikada aktivitesinin yaklaşık %5'ini kaybetmiştir, ancak enzim 20°C ve 30°C'de sıcaklığının %40'ını, 40°C'de %70'ini, 50°C'de %54'ünü ve 80°C'de ise %10'unu koruduğu tespit edildi. Öztürk (2007)'ün çalışmasında *B. licheniformis* BA17'den izole edilen enzimin 60 dakikada hızla aktivite kaybettiği ve

stabil kalabildiği değerin 40°C olduğu bulunmuştur. APT5'e ait alkalın proteaz enziminin çalıştığı sıcaklık aralığı 50-60°C ve optimum sıcaklık isteği 50°C olup bu sıcaklıktaki 4 saatlik stabilitesi %100'dür. Tekin (2008)'in çalışmasında ki *B. licheniformis* DSM13'den izole edilen enzimin optimum sıcaklığı 50°C olduğu bulunmuştur ve 2 saat sonunda aktivitesinin %50'sini koruduğu görülmüştür. Enzimin sıcaklık kararlılığı incelendiğinde yüksek sıcaklıklarda aktivitesini koruyabildiği ancak düşük sıcaklıklarda sıcaklık değerinin yaklaşık olarak yarıya düştüğü görülmüştür. Rao *et al.* (2009)'in çalışmasında *Bacillus* bakterilerinden saflaştırılan proteazın optimum sıcaklık aktivitesi 70°C olarak bulunmuştur, ancak elde ettikleri proteazın 70°C'de 60 dakika sonunda aktivitesini hızla kaybettiği bildirilmiştir. Bu sonuçlarla karşılaştırıldığında *B. licheniformis* A10'dan elde edilen proteaz enziminin yüksek sıcaklıklarda kararlılık gerektiren ticari uygulamalarda iyi bir aday olabileceği düşünülmüştür.

B. licheniformis A10'dan izole edilen enzimin pH profili incelenmiş ve optimum pH'nın 9,0 olduğu bulundu. Enzimin pH 7-10 aralığında aktivitesinin birbirine yakın olduğu saptandı. Ancak pH 4-7 ve pH 10-11 aralığında enzimin aktivitesinde düşüş olduğu görüldü. Tekin (2008)'in yaptığı çalışmada *B. licheniformis* DSM13'den izole ettikleri proteazın optimum pH'sının 11 olduğu tespit edilmiştir. Bezawada *et al.* (2011)'in benzer bir çalışmada ise *B. licheniformis* ATCC 21424'den saflaştırdıkları proteazın, optimum pH'nın 10 olduğu görülmüştür. Kumar and Takagi (1999)'nin *Bacillus spp.*'den saflaştırdıkları AP1 ve AP2 olarak adlandırdıkları proteazların optimum pH'larının, sırasıyla 11 ve 12 olduğu belirlenmiştir. Enzimin optimum pH'sı literatürdeki bu çalışmalar ile uyumludur. Bununla birlikte, optimum pH'nın 9,0 olarak bulunması, enzimin alkali şartlarda da aktif olduğunu ve dolayısıyla alkali proteaz olduğunu göstermektedir.

B. licheniformis A10'dan saflaştırılan proteaz enziminin pH kararlılığı incelendiğinde ise, pH 7,5-9,5 aralığında iki saatlik inkübasyon sonrasında, aktivitesinin %70'den fazlasını koruduğu görüldü. Ancak pH 6,0 ve 7,0'de bu oran %45 ve %62'ye düşerken, pH 10-10,5 aralığında ortalama %55'e, pH 11,0'de ise %28,97'ye düştüğü gözlemlendi. Enzimin optimum pH'sının 9,0 olması ve iki saatlik inkübasyon

sonrasında aktivitesinde çok az kayıp olması oldukça dikkat çekicidir. Bezawada *et al.* (2011)'in çalışmasında *B. licheniformis* ATCC 21424'den saflaştırılan proteazın, optimum pH'nın 10,0 olduğu ve iki saatlik süre sonunda aktivitesinin yaklaşık %60'ını koruduğu görülmüştür. Tekin (2008)'in çalışmasında, *B. licheniformis*'e ait APT5 izolatından elde edilen enzimin çalıştığı pH aralığı ise 10,0-11,5 olup optimum pH'sının 11,0 ve bu pH değerinde enzimin 3 günlük stabilitesinin %100 olduğu belirlenmiştir. Literatürdeki bu çalışmalarla karşılaştırıldığında *B. licheniformis* A10'dan elde edilen proteazın, pH kararlılığının oldukça iyi olduğu görüldü. Bu yüzden yüksek pH'larda kararlılık gösteren bu enzimin; özellikle proteazların alkali pH'larda kararlılığını uzun süre korumasının istendiği deterjan endüstrisinde kullanılma potansiyelinin olduğu görülmektedir.

B. licheniformis A10'dan saflaştırılan proteaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisi incelendiğinde; K^{+1} , Mn^{+2} ve Mg^{+2} metalleri aktivatör etkisi gösterirken, Fe^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Ag^{+1} ve Co^{+2} metalleri inhibitör etkisi gösterdiği belirlendi. Ca^{+2} metalinin ise enzim aktivitesinde bir değişiklik yapmadığı tespit edildi. Genellikle alkali proteazlar Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} gibi divalent katyonların varlığında maksimum aktivite göstermektedir (Kumar and Takagi 1999). Sarker *et al.* (2013)'in yaptıkları çalışmada, *B. licheniformis* P003'den izole edilen alkalın proteaz enziminin aktivitesini Mn^{+2} ve Mg^{+2} metalleri arttırırken, Fe^{+2} metalinin düşürdüğü görülmüştür. Bezawada *et al.* (2011)'in çalışmasında; *B. licheniformis* ATCC 21424'den saflaştırılan proteazın aktivitesini Mn^{+2} ve Ca^{+2} 'un arttırdığını bulmuşlardır. 1, 5 ve 10 mM'lık Fe^{+2} metal iyonlarının varlığında ise aktivitede sırasıyla %2, %34 ve %45 oranlarında bir azalma söz konusudur. 1, 5 ve 10 mM'lık Ca^{+2} metal iyonu ise aktivitede herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. 1, 5 ve 10 mM'lık K^{+1} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} metal iyonları, yaklaşık %5'lik bir artışa neden olmuştur. 1, 5 ve 10 mM'lık Ag^{+1} , Zn^{+2} ve Ni^{+2} metal iyonları ise sırasıyla %20, %40 ve %33'lük bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir.

B. licheniformis A10'dan saflaştırılan proteaz enziminin, organik çözücüler varlığında kararlılığı incelendiğinde ise; etanol, bütanol, izopropanol, kloroform, aseton ve DMSO'nun %15, %25 ve %50'lik çözeltileri ile 1 saat inkübasyonu sonucunda,

enzimin kalan aktivitesi sırasıyla %78, %97 ve %51 iken, 24 saatte kalan aktiviteleri sırasıyla %58, %50 ve %46'dır. Metanol varlığında da 1 saatin sonunda aktivite de %50 oranında azalma gözlemlendi ancak 24 saat sonunda aktivitenin tamamen kaybolduğu belirlendi. Ayrıca formaldehit varlığında 1 saat sonunda enzimin aktivitesinde yaklaşık %17 oranında artış gözlenirken 24 saat sonunda yaklaşık %25 oranında aktivite kaybı gözlemlendi. Bhunia and Dey (2011)'in yaptıkları çalışmada *B. licheniformis* NCIM2042'den elde ettikleri proteazın; DMSO varlığında %25, etanol, metanol, benzen ve toluen varlığında ise aktivitesini %92'den fazlasını koruduğu gözlemlenmiştir. *B. licheniformis* A10'dan saflaştırılan proteazın; %15, %25 ve %50 DMSO varlığında *B. licheniformis* NCIM2042'den daha iyi bir kararlılık sergilediği görülmüştür. Ancak etanol, aseton ve bütanol varlığında bu durumun tersi söz konusudur ki, enzimin *B. licheniformis* NCIM2042'den daha düşük bir kararlılık sergilediği gözlemlenmiştir. Shah *et al.* (2010)'ın *Bacillus* cinsinden saflaştırdıkları proteaz ise DMSO ve etanol varlığında bir saatlik inkübasyon sonrasında aktivitesinin sırasıyla %70 ve %80 arasında koruduğu, ksilen, toluen, ve benzen varlığında ise aktivitesinde artış gözlemlendiği görülmüştür. Ancak bütanol varlığında aktivitede ciddi bir düşüş söz konusudur. Bu verilerden; *B. licheniformis* A10'dan izole edilen proteazın DMSO, etanol ve bütanol varlığında daha az kararlı olduğu görülmüştür. Literatürde organik çözücülerle kararlı proteazlara oldukça az oranda rastlanmaktadır. Buna karşılık, organik çözücüler varlığında kararlılığını koruyan proteazların endüstride sentetik reaksiyonlarda kullanım alanları bulunmaktadır (Sonuç 2011). Sonuç olarak; *B. licheniformis* A10'dan saflaştırılan proteazın organik çözücülere karşı 1 saat inkübasyon sonucunda kararlılık gösterdiği, 24 saatlik inkübasyon sonunda ise düşük kararlılıkta olduğu belirlendi.

Çalışmada kullanılan proteaz enzimine, yüzey aktif maddelerin ve hidrojen peroksitin etkisini belirlemek için %1'lik ve %5'lik SDS, Tween-20, Tween-80, Triton X-100 ve H₂O₂ kullanıldı. *B. licheniformis* A10'dan saflaştırılan proteazın; %1 ve %5'lik Tween-80 ve H₂O₂ varlığında aktivitesinde sırasıyla %72, %73 oranında azalma, %1 ve %5'lik Triton X-100 varlığında sırasıyla %39 ve %56 oranında azalma gözlemlendi. %1 ve %5'lik Tween-20'de ise kalan aktiviteler sırasıyla %41 ve %34'dür. Ancak SDS varlığında %1'lik çözeltide kalan aktivite %4 iken %5'lik çözelti varlığında ise aktivite kalmadığı

belirlendi. Bhunia and Dey (2011)'in yaptıkları çalışmada *B. licheniformis* NCIM2042'den elde ettikleri proteazın oda sıcaklığında 60 dakikada Tween-80, TritonX-100 ve SDS varlığında stabilitesini koruduğu görülürken, Sarker *et al.* (2013)'in yaptıkları çalışmada, *B. licheniformis* P003'den izole edilen alkalın proteaz enziminin, Tween-20, Tween-80, SDS ve H₂O₂ varlığında aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Nadeem *et al.* (2013)'in yaptığı çalışmada *B. licheniformis* UV-9'dan elde edilen proteazın deterjan katkı maddeleri ve yükseltgenler karşısında aşırı kararlılık göstermiştir ve bu da *B. licheniformis* A10'dan saflaştırılan proteazdan daha kararlı olduğunu göstermektedir. Kumar *et al.* (1999) *Bacillus spp.*'den saflaştırdıkları AP1 ve AP2 olarak adlandırdıkları proteazların aktivitesinde ise %1'lik Triton X-100 varlığında sırasıyla %39 ve %14 artış gözlenmiştir. AP1 ve AP2'nin %5'lik SDS varlığında ise enzim aktiviteleri değişmiştir. Bu sonuçlar; AP1 ve AP2 enziminin *B. licheniformis* A10'dan elde edilen emzime göre Triton X-100 ve SDS varlığında daha kararlı olduğunu göstermektedir. Nadeem *et al.* (2013)'in yaptığı çalışmada, *B. licheniformis* UV-9'dan elde edilen proteazın, deterjan katkı maddeleri ve yükseltgenler karşısında aşırı kararlı olduğunu belirtmişlerdir.

B. licheniformis A10'dan saflaştırılan proteaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi incelendi. 1 mM PMSF varlığında enzim %98 oranında aktivite kaybettiği, 5 mM'lık PMSF varlığında ise %100 inhibe olduğu görüldü. Bunun yanı sıra enzim aktivitesinde; 1 mM ve 5 mM'lık EDTA varlığında sırasıyla %98 ve %99'luk bir kayıp olduğu gözlemlendi. 1 mM DTNB ve üre varlığında kalan aktivite sırasıyla %48 ve 28 iken, 5 mM DNTB varlığında kalan aktivite %43, 8 mM üre varlığında kalan aktivite ise %4'dür. Öztürk'ün (2007) yaptığı çalışmada, *B. licheniformis* BA17'den izole edilen alkalın proteaz enziminin PMSF varlığında tamamen inhibe olduğu görülmüştür. Nadeem *et al.* (2007)'in yaptığı çalışmada *B. licheniformis* UV-9'dan izole edilen proteazın da PMSF varlığında tamamen inhibe olduğu görülmüştür. Sari (2011), *B. circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enzimi 5mM'lık PMSF varlığında %95 inhibe olduğu, 5mM EDTA varlığında %27'lik, 5mM üre varlığında %16'lık ve 5mM DTT varlığında %9'luk bir kayıp gözlenmiştir. Ancak β -merkaptetanol varlığında aktivitesinde bir değişim gözlenmemiştir. Reddy *et al.* (2008) yaptıkları *Bacillus sp.* RKY3'den saflaştırdıkları

proteazın PMSF, EDTA ve β -Mercaptoethanol varlığında kalan aktiviteleri sırasıyla %0, 64 ve 95 olarak bildirilmiştir. Literatürlerle karşılaştırıldığında serin spesifik inhibitörü olan PMSF ile tamamen inhibe olması enzimin bir serin proteaz olduğunu ve EDTA varlığında meydana gelen aktivite kaybının ise enzimin metal bağlama bölgesine sahip olabileceği sonucunu ortaya çıkarmıştır. Enzimin β -merkaptotanol varlığında aktivitesinde bir azalmanın olmaması sistein proteaz özellikte olmadığı göstermiştir. DTNB varlığında enzimin aktivitesinde yaklaşık %50 oranında bir düşüş olmuşken üre varlığında bu oran yaklaşık %95'dir.

B. licheniformis A10'dan saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara karşı spesifitesini belirlemek amacıyla %0,65'lik (w/v) kazein, bovin serum albumin (BSA), jelatin, azokazein ve hemoglobinden oluşan protein substratları kullanıldı. *B. licheniformis* A10'dan saflaştırılan proteaz enzimin doğal substratlara olan spesifitesi sonuçları incelendiğinde, enzimin en çok ilgiyi kazein substratına, daha sonra sırasıyla azokazein (% 97,36), jelatin (% 60,40), hemoglobin (% 28,73) ve BSA'ya (% 17,74) gösterdiği tespit edildi. Kumar *et al.* (1999) *Bacillus spp.*'den saflaştırdıkları AP1'in kazein, albümin ve keratin spesifitesinin sırasıyla %100, 8,1 ve 0,05, AP2'nin ise %100, 7,8 ve 0,03 olduğu belirlemişlerdir. Öztürk'ün (2007) yaptığı çalışmada, halotolerant *Bacillus licheniformis* BA17'den izole edilen alkalın proteaz enziminin, doğal substratlar içerisinde en yüksek aktiviteyi %96 oranında azokazeine gösterdiği tespit edilmiştir.

B. licheniformis A10'dan saflaştırılan proteaz enziminin, kazein varlığında kinetik sabitlerinin (K_M ve V_{max}) belirlenmesi için Lineweaver-Burk grafiği kullanılmış ve bu değerler sırasıyla 0,033 mg/ml ve 8,17 $\mu\text{mol. ml}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ olarak bulundu. K_M değeri, enzimin substrata ilgisinin bir ölçüsüdür. K_M değeri ne kadar küçükse enzimin substrata olan ilgisinde o kadar büyüktür (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Bulunan K_M ve V_{max} değerleri kullanılarak k_{cat} ve V_0 değerleri sırasıyla; 1, 392 s^{-1} ve 42,18 $\mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ olarak belirlendi. Şu veriler literatürde bulunan bazı çalışmalarla karşılaştırıldığında; Nadeem *et al.* (2013)'in yaptığı çalışmada; *B. licheniformis* UV-9'dan izole edilen proteazın K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 5 mg/ml ve 61,58 M. $\text{ml}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Kerimak

(2008)'nin yaptığı çalışmada *Bacillus* türünden izole edilen alkalın proteaz enziminin K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 3,12 mg/ml ve 1,6 M/ml/dak olarak bulunmuştur. Rao *et al.* (2009)'ın *Bacillus* spp.'den saflaştırdıkları proteazın K_M 'sini 0.597 mg ml⁻¹ ve V_{max} 'ı ise 13825 mmol min⁻¹ olarak bildirmişlerdir. Sonuç (2011)'un çalışmasında; *B. subtilis* M33'den saflaştırdıkları serin alkali proteazın K_M değerinin 0,706 mg/ml, V_{max} değerinin ise 3000 μ M.min⁻¹ olduğu belirlenmiştir. Towatana *et al.* (1999) *Bacillus* sp. PS7 19'dan saflaştırdıkları proteazın ise K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,6 mM ve 1,0 M. ml⁻¹.dk⁻¹ olduğunu tespit etmişlerdir. Kazan vd (2005)'nin *B. clausii* GMBAE 42'den proteaz enziminin saflaştırılması çalışmasında, saflaştırılan proteazın K_M değeri 0,655 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Bu verilere bakıldığında *B. licheniformis* A10'dan saflaştırılan proteaz enziminin substrata ilgisinin, literatüre göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak; *B. licheniformis* A10'dan amonyum sülfat çöktürmesi ve DE52 anyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan proteaz enziminin, alkali pH'larda ve yüksek sıcaklıklarda uzun süreli kararlılık gösterdiği belirlenmiştir. Saflaştırılan proteazın 40,55 kDa molekül kütlesine sahip olduğu ve bu değer literatürle uyumlu olduğu tespit edildi. Enzimin optimum sıcaklığının ve optimum pH'sının sırasıyla 70°C ve 9 olduğu ve kararlılığının literatürdeki diğer çalışmalara oranla daha yüksek olduğu görülmüştür. Enzim metal iyonları ile muamele edildiğinde ise kararlılığını büyük oranda koruduğu, organik çözeltiler varlığında ise enzimin aktivitesinin bir kısmını kaybettiği belirlenmiştir. Enzimin yüzey arttırıcı maddelere ve okside edici ajanlara karşı aktivitesinde kayıplar gözlemlendiği belirtildi. En yüksek spesifiteyi kazeine karşı gösteren enzimin; serin spesifik inhibitörü olan PMSF ile tamamen inhibe olması onun, serin proteaz olduğunu düşündürmektedir. *B. licheniformis* A10'dan saflaştırılan proteaz enziminin K_M değerinin literatürdeki diğer çalışmalara göre daha düşük olduğu ve dolayısıyla substrata olan ilgisinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Adıgüzel, A. 2006. Çeşitli Termal Tesislerin Su Örneklerinden İzole Edilentermofilik Bakterinin Moleküler Karakterizasyonu. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 130.
- Arda, M. (2000). Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi no:46, Ankara
- Başağa, H., Çetindamar D. 2000. Uluslararası Rekabet Stratejileri: Biyoteknoloji. TÜSİAD Rekabet Stratejileri Dizisi-7, Yayın No: TÜSİAD-T/2000-12/289. 31-56.
- Beilen, J.B., Li, Z. 2002. Enzyme technology: an overview. Current Opinion in Biotechnology, 13: 338–344.
- Bezawada J., Yan S., John R. P., Tyagi R. D., Surampalli R. Y.,2011. Recovery of *Bacillus licheniformis* Alkaline Protease from Supernatant of Fermented Wastewater Sludge Using Ultrafiltration and Its Characterization. Hindawi Access to Research Biotechnology Research International, 238549 (10.4061), 3-12.
- Bhunja B., Dey A., 2012. Statistical Approach for Optimization of Physiochemical Requirements on Alkaline Protease Production from *Bacillus licheniformis* NCIM 2042. Hindawi Publishing Corporation Enzyme Research, 905804 (10.1155), 4-10.
- Bradford MM (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 on Thermophiles. (Ed: Reysenbach A-L, Voytek M. Mancinelli, R. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. (218).
- Coyle BL, Baneyx F., 2014. A cleavable silica-binding affinity tag for rapid and inexpensive protein purification. Biotechnol Bioeng, 10.1002(25257), 54-63.
- Çırakoğlu, B. 2009. Biyoteknolojideki Gelişmelerin Temel Prensipleri ve Sanayiye Uygulamaları. İzmir, 176-324, İzmir.
- Demirjian, dc., Moris-Vara, F., Sassidy, Cs. (2001). Enzymes from Extremophiles. Curr Opin Chem Biol. 5,144–51.
- 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, Deepa Arul Priya, J, Gautam P, Purification and characterization of thermostable organic solvent-stable protease from *Aeromonas veronii* PG01. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 66, 311–318 (2010).
- Erarslan,A., Denizci, A.A., Kazan, D., Abeln, E.C.A. 2004.Newly isolated *Bacillus clausii* GMBAE 42:an alkaline protease producer capable to grow under highly alkaline comditions.Journal of Applied Microbiology,96;320-327
- Ferrero, M.A., Castro, G.R., Abate, C.M., Baigori, M.D., Sineriz, F. 1996. Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR29: isolation, production and characterization. Appl Microbiol Biotechnol 45:327-332.

- Fujiwara, S.(2002). Extremophiles: Developments of Their Special Functions and Potential Resources. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 94, 518-525.
- Gençkal, H., 2006. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 703-710.
- Gupta, R., Beg, Q. K., Khan, S., Chauhan, B., 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbial Biotechnology* 60: 381 –395.
- Gül-Güven, R.(2004). *Alicyclobacillus acidocaldarius* subspecies *ritmannii*'nin b-Galaktozidaz Enzimi Üzerine Çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır.(64).
- Gül-Güven, R.(2007). Sıcak Su Kaynaklarından Bakteri _zolasyonu, Tanımlanması ve *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *ritmannii*'nin b-galaktozidaz Enziminin Saflaştırılması. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, D_YARBAKIR.(196).
- Haddar A, Bougatef A, Agrebi R, Sellami-Kamoun A, Nasri M, A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization. *Process Biochemistry* 44, 29–35 (2009).
- Haki, GD., Rakshit, Sk. (2003). Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: a Review. *Bioresour Tecnol*. 89,17–34.
- Huang, Q., Peng, Y., Li, X., Wang, H., Zhang Y. 2002. Purification and Characterization of an Extracellular Alkaline Serine Protease with Dehairing Function from *Bacillus pumilus*. *Current Microbiology*, 46: 169–173.
- Johnvesly, B.; Naik, G.R.: Studies on Production of thermostable Alkaline Protease from Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in o Chemically Defined Medium”, *Process Biochemistry*, 37 (2001) 139-144.
- Joo H. S., C. Ganesh, Kumar, A., Gun-Chun. P., 2002. Optimization of the production of an extra cellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Appl Biochem Biotechnol*. (2):35-48.
- Joo, H.-S., Kumar, C.G., Park, G.-C., Paik, S.R., and Chang, C.-S., “Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties”, *Journal of Applied Microbiology*, 95: 267–272 (2003).
- Joo, H.S.; Chang, C.S.: “Oxidant and SDS-Stable Alkaline Protease from a Halotolerant *Bacillus clausii* 1-52: Enhanced Production and Simple Purification”, *Journal of Applied Microbiology*, 98 (2005) 491-497.
- Joseph Jenkins. (1999). *The Humanure Handbook* (Chapter 3. Thermophilic Microorganisms) 143 Forest Lane, Grove City, PA.
- Kazan, D; Denizci, A.A; Öner, M.N.K; Erarslan, A.: “Purification and Characterisation of a Serine Alkaline Protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42”, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 32 (2005) 335-344.
- Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2009. *Biyokimya*. Aktif Yayınevi, 92-118, Erzurum.
- Kerimak Öner, N. M. 2008. Zorunlu Alkalifilik *Bacillus marmariensis* GMBE 72 Soyundan İzole Edilen Alkalın Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, Sayfa: 3-50.
- Kornilowicz-Kowalska T, Bohacz J. Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects. *Waste Manage* 2011;31:1689–701.

- Kristjansson, M.M., Asgerisson, B.(2002). Properties of Extremophilic Enzymes and Their Importance in Food Science and Technology. Handbook of Food Enzymology (ed. J.R. Whitaker), NY, USA, p.77-99.
- Kristjonsson, J. K. ve Stetter K.O. (1991). Thermophilic Bacteria Thermophilic Bacteria (Ed:Kristjonsson J.K). CRC Pres, Inc. London, 1-13.
- Kuhar K, Mittal A, Kansal R, Gupta VK., 2014. Purification of a protease inhibitor from *Dolichos biflorus* using immobilized metal affinity chromatography. *Indian J Biochem Biophys*, 66-74.
- Kumar, C., Tiwari, M. and Jany, K. 1999. Novel alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus* spp.: purification and some properties. *Process Biochemistry*, 32, 441–449.
- Kumar, C.G., “Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*”, *Letters in Applied Microbiology*, 34: 13-17 (2002).
- Kumar, C.G., H., Takagi, 1999. Microbial Alkaline Proteases: From a Bioindustrial Viewpoint , *Biotechnology Advances*, vol. 17, P: 561-594.
- Laemmli DK, Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature*, London, 227,680 (1970).
- Laxman, R.S., Sonawane, A.P., More, S.V., Rao, B.S. Rele, M.V. Jogdand, V.V., 2005. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* . *Process Biochemistry* 40: 3152 – 3158.
- Mabrouk, S.S., Hashem, A.M., El-Shayeb, N.M.A., Ismail, A.M.S., Abdel-Fattah, A.F. 1999. Optimization Of Alkaline Productivity By *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresource Technology*, 69: 155-159.
- Nadeem M., Qazi J. I., Syed Q., and Gulsher M.. “Purification and characterization of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis* UV-9 for detergent formulations”, *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 35(2): 187-195 (2013).
- Nelson, D. L. And Cox, M. M. 2005. *Lenninger biyokimyanın etkileri*. Palme Yayıncılık. 61-78, 444-445.
- Nilegaonkar, S.S.; Zambare, V.P.; Kanekar, P.P.; Dhakephalkar, P.K.; Sarnaik, S.S.: “Production and Partial Characterization of Dehairing Protease from *Bacillus cereus* MCM B-326”, *Bioresource Technology*, 98 (2007) 1238-1245.
- Olajuyigbe, F. M., Ajel, J. O., “Some Properties of Extracellular Protease from *Bacillus licheniformis* Lbbl-11 Isolated from “iru”, A Traditionally Fermented African Locust Bean Condiment”, *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 3 (1): 42-46 (2008).
- Öztürk, S. 2007. Ülkemizden Ğzole Edilen *Bacillus licheniformis* BA17’den Elde Edilen Alkalın Proteaz Enziminin Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 93.
- Panda M. K., Sahu M. K., Tayung K., 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).
- Patel, R.K.; Dodia, M.S.; Joshi, R.H.; Singh, S.P.: “Purification and Characterization of Alkaline Protease from a Newly Isolated Haloalkaliphilic *Bacillus* sp.”, *Process Biochemistry*, 41 (2006) 2002-2009.

- Pillai P, Mandge S, Archana G. Statistical optimization of production and tannery applications of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* P13. *Process Biochem* 2011;46:1110–7.
- Polaina, J. and MacCabe, A. P. 2007. *Industrial Enzymes Structure, Function and Applications*. Springer, 161-243, Spain.
- Rahman, R., Geok, L., Basri, M. and Salleh, A. 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., Mukherjee, A. K., “Ecological significance and some biotechnological application of an organic solvent stable alkaline serine protease from *Bacillus subtilis* strain DM-04”, *Bioresource Technology*, 100: 2642–2645 (2009).
- Ramakrishna D.P.N, Gopi Reddy, N., and Rajagopal, S.V., “Purification and Properties of an Extra Cellular Alkaline Protease Produced By *Bacillus subtilis* (MTTC N0-10110)” *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6 (4): 493-504 (2010).
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., “Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 597-635, (1998).
- Rao, S., Sathish, T., Ravichandra, P. and Prakasham, R. 2009. Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. *Process Biochemistry*, 44, 262–268.
- Ravindran B, Ganesh Kumar A, Aruna Bhavani P.S. and Sekaran G, Solid-state fermentation for the production of alkaline protease by *Bacillus cereus* 1173900 using proteinaceous tannery solid waste. *Current Science*, 5, 100 (2011).
- Reddy, L. Wee, Y. and Ryu, H. 2008. Purification and characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus* sp. RKY3. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83, 1526-1533.
- Romero, F. I., Garcia, L. A., Salas, J. A., Diaz, M., and Quiros, L. M. Production, purification and partial characterization of two extra cellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. *Process Biochem.* 36, 507-515, 2001.
- Ryu, H-W., Reddy, L.V.A., Wee, Y.-J. 2008. Purification and characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus* sp. RKY3. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*.
- Salleh, AB., Rahman, RNZR, Basri, M., “New Lipases and Proteases, 2nd ed.”, *Nova Science Publishers, Inc.*, New York, 29 (2006).
- Sari, E., 2011. “*Bacillus circulans* M34’ten proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara. 61-62.
- Sarker K. P., Talukdar S. A., Deb P., Sayem SM. A., 2013. Mohsina K. Optimization and partial characterization of culture conditions for the production of alkaline protease from *Bacillus licheniformis* P003. *SpringerPlus*, (2:506), 1-10.
- Schallmeyer M, Singh A, Ward OP. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol* 2004;50:1–17.
- Segel I.H., 1968. *Biochemical calculations*. Inc., New York, 403.
- Sevinç, N. 2010. Türkiye Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* sp. Suşlarından Proteaz Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, Sayfa: 5-30.

- Shah, K., Mody, K., Keshri, J., Jha, B., "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 (2010).
- Sonuç, M.N., 2011. *Bacillus Subtilis* M33'den Hücre Dışı Alkali Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Takami, H., Akiba, T., Horikoshi, K. 1989. Production of extremely thermo stable alkaline protease from *Bacillus sp.* no. AH-101. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30, 120-124.
- Tekin, N., 2008. Türkiye Kaynaklı *Bacillus spp.*'lerin Alkalın Proteaz Üretim Kapasiteleri ve Enzimlerin Kısmen Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Telefoncu A., Pazarlıoğlu N., 2010. *Biyoteknoloji Temel Prensipler ve Uygulamalar*. İzmir, 385-392, İzmir.
- Thangam, E.B. and Rajkumar, G. S. Purification and characterization of alkaline protease from *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35, 149–154, 2002.
- Towatana, N., Pamupong, A. and Suntinanalert, P. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus sp.* PS7 19. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87, 581-587
- Toyokawa, Y., & Takahara, H., Reungsang, A., Fukuta, M., Hachimine, Y., Tachibana, S., Yasuda, M., "Purification and characterization of a halotolerant serine proteinase from thermotolerant *Bacillus licheniformis* RKK-04 isolated from Thai fish sauce", *Appl Microbiol Biotechnol*, 86:1867–1875 (2010).
- Uchida, H., Kondo, D., Yamashita, S., Tanaka, T., Tran, L.H., Nagano, H., Uwajima, T., "Purification and properties of a protease produced by *Bacillus subtilis* CN2 isolated from a Vietnamese fish sauce", *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 79-582 (2004).
- 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.
- Voet D., Voet J.G., "Biochemistry", Third Edition, *John Wiley & Sons, Ltd*, 522-523, (2004).
- Walsh, G., "Proteins Biochemistry and Biotechnology" *John Wiley and Sons, Ltd.*, 420-422, (2002).
- Ward, O.P, 1985a. "Proteolytic Enzymes" In *Comprehensive Biotechnology*, Edited by M. Moo-Young, Pergamon Press, Great Britain, P:789-818.
- Wiseman, A. , 1987. *Hanbook of Enzyme Biotechnology*. Second Edition. Chapter The application of Enzymes in Industry : 274 – 373.
- Yücel, F. 2010. Hibridoma Teknolojisi. Erciyes Üniversitesi. Yayın No:180 Erişim: [<http://misoyal.nku.edu.tr/admin/userfiles/biyoteknolojiyesildevrim3.pdf>]. Erişim tarihi:20.06.2011.
- Zanghloul TI, Elmahdy AR. Biodegradation of chicken feathers wastedirected by *Bacillus subtilis* recombinant cells: scaling up in a laboratory scalefermentor. *Bioresour Technol* 2011;102:2387-93.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Trabzon'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 2008 yılında kazandığı Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden 2012 yılında mezun oldu. 2012-2013 Eğitim Öğretim yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim yüksek lisans öğrenimine başladı.