

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SUBTİLİZİN KİNETİĞİ
VE
ETİLMETAN SÜLFONATIN SPORLAŞMA
ÜZERİNE ETKİSİ**

Zübeyde KAYA

**DOKTORA TEZİ
(KİMYA ANABİLİM DALI)**

**DİYARBAKIR
HAZİRAN-1996**

D. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne
DİYARBAKIR

Bu çalışma, jürimiz tarafından **KİMYA** Anabilim Dalı'nda
DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı ve Soyadı İmzası


Başkan

:...Prof.Dr.Celal TÜZÜN.....

Üye

:...Doç.Dr.Halil HOŞGÖREN.....

Üye

:...Doç.Dr.Çetin AYTEKİN.....

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.28.10.6.1.1996


Prof.Dr.Zülküf Güneli

Enstitü Müdürü

TEŐEKKÜR

Çalıőmalarımın baőından bitimine kadar yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalıőmalarım için bana gerekli koőulları sağlayan Sayın Hocam Doç.Dr. Çetin AYTEKİN' e teőekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Hem yüksek lisans hem de doktora çalıőmalarımın mikrobiyoloji ile ilgili aőamalarında bazı olanaklar sağlayarak yardımlarını gördüğüm, D.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Doç.Dr. Kadri GÜL'e, katkılarından dolayı fakültemiz Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Doç.Dr. Erhan ÜNLÜ' ye ve laboratuvar çalıőmalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen, arkadaşım Arő.Gör. Mehmet DOĞRU' ya teőekkür ederim.

Arő.Gör. Zübeyde KAYA

AMAÇ

Proteolitik enzimler besin endüstrisi ve diğer biyoteknolojik alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Özellikle soya vb. besinlerin üretiminde, peynir yapımında, et endüstrisinde, deterjan sanayiinde ve tedavi yöntemlerinde önemli rol oynamaktadırlar.

Proteolitik enzimlerden alkalın serin proteazlar grubuna giren subtilizinler özellikle deterjan, dericilik ve tekstil sanayiinde kullanılmaktadırlar. Bu enzimler ***Bacillus subtilis*** ve diğer ***Basil*** türleri tarafından salgılanır.

Çalışmada ***Bacillus subtilis***' ten saflaştırılmış olan ve ticari olarak temin edilen subtilizin için farklı kaynaklı kazeinlerin, azokol ve azokazeinin substrat uygunluğunu saptamak, bazı organik bileşik, aminoasit ve metal iyonlarının bu enzim üzerindeki inhibisyon etkisini incelemek ve mutajen özelliğe sahip Etilmetan sülfonat' ın etkisine bağlı olarak sporlaşmanın mekanizmasını aydınlatmaya yönelik yeni bulgular ortaya koymak amaçlanmaktadır.

ÖZET

Bu çalışmada koyun, keçi inek ve manda gibi farklı tür hayvanların sütlerinden saflaştırılan kazeinler *B. subtilis* türlerinden saflaştırılmış ve ticari olarak sağlanan subtilizin için substrat olarak kullanıldı. Spektrofotometrik olarak tayin edilen K_M ve V_{max} değerleri, inek sütünden saflaştırılan kazeinlerin diğerlerine nazaran daha iyi bir substrat olduğunu gösterdi.

Ulaşılan bu sonuçlar ile kazeinlerin Ca^{2+} ve $(PO_4)^{3-}$ içerikleri arasında bir ilişki kurulmaya çalışıldı. Diğerlerine nazaran Ca^{2+} ve $(PO_4)^{3-}$ oranının inek kazeininde en düşük değere sahip olması, bu iyonların proteine kazandırdıkları rijit yapı nedeniyle enzim-substrat etkileşmesinde etken oldukları kanısını uyandırmaktadır.

Enzim için azokol, azokazein ve farklı kaynaklı kazeinler substrat olarak kullanılıp yapılan aktivite tayinlerinden inek kazeininin daha iyi bir substrat olduğu saptandı.

Enzim-substrat inkübasyon ortamına uygun derişimlerde tirozin, triptofan, fenol, sistein, etilmetan sülfonat (EMS) ve Hg^{2+} ve Cu^{2+} gibi metal iyonlarının farklı tuzları ilave edilerek kinetik etkileri incelendi. Elde edilen sonuçlardan inkübasyon ortamına ilave edilen bu bileşiklerin yarışmalı bir inhibisyona yol açtıkları saptandı.

Ayrıca subtilizinin sporlaşma aşamasında salgılanıp salgılanmadığını ve proteaz inhibitörlerinin bakterilerde sporlaşmayı da inhibe edip etmediğini belirlemek için **B. subtilis** uygun derişimde EMS ile Spinzer besi yerinde 37 °C' de 10, 15 ve 20 saat inkübasyona bırakılıp üretildi. Yapılan aktivite tayinlerinde EMS' li kültürlerde subtilizin aktivitesinin kontrolden daha düşük olduğu görüldü.

Aynı örneklerin Müzereli Spor Boyası ile boyanması sonucu mikroskop altında elde edilen görüntüler ile kontrolde hiç spor gözlenmezken, EMS' li kültürlerde spor oluştuğu sonucuna varıldı. Bu sonuç subtilizinin sporlaşma aşamasında salgılandığı görüşü ile ve proteaz inhibitörlerinin sporlaşmayı inhibe ettiği görüşü ile de çelişmektedir. EMS' nin bu etkisini belki nükleik asitlerle olan etkileşmesinde aramak ve bu doğrultuda çalışmalar yapmayı gerektirmektedir.

ABSTRACT

In this study casein was purified from sheep, goat, cow and water buffalo milk and used as a substrate for purified preparation of *Bacillus subtilis* subtilisin. On the basis of K_M and V_{max} value we can say that cow milk casein is the best substrate for the enzyme compared to other animals milk casein.

On the other hand we have investigated the possible relationship between the Ca^{2+} and $(PO_4)^{3-}$ content of casein and the casein appropriate for the enzyme. The cow milk casein with lower most $Ca^{2+}/(PO_4)^{3-}$ ratio suggest that these ions may have an influence on enzyme-substrate interaction.

Azocoll, azocaseine and the caseins from different sources have been used as a substrate for the enzyme, and among these the cow casein was found to be the best substrate.

Tyrosine, tryptophan, phenol, cysteine, ethylmethane sulphonate and different salts of Hg^{2+} and Cu^{2+} was added to the enzyme-substrate medium in appropriate concentrations to investigate their kinetic effects. These compounds added to incubation medium were found to cause a competitive inhibition.

Furthermore, *Bacillus subtilis* was incubated at 37 °C for 10, 15 and 20 hours in Spinzer medium containing appropriate amounts of EMS to determine whether subtilisin is excreted, or whether protease inhibitors inhibit the spor formation in bacteria.

Following the activity determination results, subtilisin activity in EMS medium was found to be lower than that of control.

Spore staining of the same samples and examination under microscope show that the spore formation occurs in EMS cultures, but not in controls. These results disagree with the opinions that the subtilisin is excreted during the sporulation and that protease inhibitors inhibit the sporulation. This effect of EMS might be due to an interaction with nucleic acids, and the future work should focus on this direction.

1. Giriş	1
1.1. EKSTRASELÜLER ENZİMLER	1
1.2. SUBTİLİZİNLERİN FİZİKSEL, KİMYASAL VE KARARLILIK ÖZELLİKLERİ	5
A. Subtilizin Carlsberg	5
B. Subtilizin BPN	5
C. Subtilizin Novo	5
D. Subtilizin Amylosacchariticus	6
1.3. SUBTİLİZİNLERİN PRİMER YAPILARI	6
A. Genel Karşılaştırma	6
B. Subtilizin BPN	6
C. Subtilizin Novo	7
D. Subtilizin Carlsberg	7
E. Subtilizin Amylosacchariticus	7
1.4. AKTİF BÖLGE ÇALIŞMALARI	8
A. Serin	8
B. Histidin	8
1.5. SUBSTRAT SPESİFİKLİĞİ VE ENZİMİK ÖZELLİKLER	9
1.5.1 Sentetik Substratlar	10
1.5.2. Kazein	12
1.5.3. Azokol	13
1.5.4. Azokazein	13
1.6. İNHİBİTÖRLER	14
1.6.1. Boya Bağlanması	14
1.6.2. Metal İyonlarının Etkisi	15
1.7. ALKALİN PROTEAZLAR VE SPORLAŞMA	16

2. MATERYAL VE METOD	17
2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	17
2.2. Kullanılan Tampon Sistemleri ve Folin Reaktifi (67): Ekler Kısımında Verilmiştir (Ek: 1-2).	17
2.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	18
2.4. Kazeinlerin Saflaştırılması	18
2.5. Fosfat Tayini.....	18
2.6. Kalsiyum Tayini	19
2.7. Elektroforez	19
2.7.1. Elektroforez İşlemi.....	19
2.7.2. Jellerin Üzerine Protein Örneklerinin Uygulanması.....	20
2.7.3. Protein Bantlarının Tespit Edilmesi Ve Boyanması	20
2.8. Kazein İle Proteaz Aktivite Tayini	20
2.9. Kazein Hidrolizi İle Proteaz Aktivitesini Belirlemek İçin Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması	21
2.10. Enzim Aktivitesi Üzerine pH' nın Etkisi	21
2.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	22
2.12. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Aminoasitlerin Ve Organik Maddelerin İnhibisyon Etkisi.....	22
2.13. Enzim Aktivitesi Üzerine Civa ve Bakır Tuzlarının İnhibisyon Etkisi	22
2.14. Diyaliz İşlemi.....	23
2.15. Azokazein İle Aktivite Tayini.....	23
2.16. Azokol İle Aktivite Tayini	24
2.17. Spor Boyama Çözeltileri	24
2.18. Spor Boyama.....	24
3. SONUÇLAR	25
4. SONUÇLARIN TARTIŞILMASI	45
KAYNAKLAR	52

EKLER	57
EK.1.....	57
1.1. 0.2 M Fosfat Tamponu:.....	57
1.2. 50 mM Fosfat Tamponu (pH: 8.0):.....	57
1.3. 0.2 M Tris-HCl Tamponu (pH: 8.0):.....	57
1.4. Karbonat-Bikarbonat Tamponu:.....	57
EK.2. Folin Reaktifinin Hazırlanması.....	57
EK.3. Elektrophorez Çözeltileri	58
3.1. A Tamponu:	58
3.2. B Çözeltisi:	58
3.3. C Çözeltisi:.....	58
3.4. D Tamponu:.....	58
3.5. Jel Çözeltisi:.....	58
3.6. Boyama Çözeltisi:	58
3.7. Boya Çıkarma Çözeltisi:.....	59
EK.4. Spinzer Besi Yeri:.....	59
Ek.5. Spor Boyama	59
5.1. Müzereli Spor Boyası:	59
5.2. Eozin Çözeltisi:.....	59
ÖZGEÇMİŞ	60

1. GİRİŞ

1.1. EKSTRASELÜLER ENZİMLER

Bakteri kaynaklı enzimler ilaç üretimi, mayalama ve yiyeceklerin saklanması gibi biyoteknoloji alanlarında gittikçe önem kazanmaktadır. Enzim üretiminde Basiller, mükülpesent olmamaları, yani kolay üremeleri ve korunmalarının zor olmaması nedeniyle en uygun bakteri türünü oluştururlar (1). Ayrıca bu bakteri sınıfının psikrofilik, mezofilik termofilik türleri yanında alkalofilik, nötrofilik ve asidofilik türlerinin özellikleri, yapılan araştırmalarla çok iyi tanımlanmıştır. Çözünür ekstraselüler enzimleri salgılayan 48 basil türünün hemen hemen hepsinin önemli özellikleri Bergey's Manual of Determinative Bacteriology' de belirtilmektedir (2). Bu bakterilerin bazıları tarafından salgılanan ama, 110 °C sıcaklık ve belli bir basınç altında nişastayı hidrolizleyen Amilaz ve pH 12.0' de kararlı ve aktif olan proteazlar, enzim adaptasyonuna yönelik çalışmalara önemli örnekler oluşturmaktadır (3).

Çoğu mikroorganizma grupları tarafından salgılanan proteazların bir kaç farklı türü olup, bunlar araştırmalarda kullanılmak üzere ya ticari olarak temin edilmekte ya da mantar, bakteri gibi bazı mikroorganizmalardan saflaştırılmaktadır (4). Bu proteazlar, Hartley tarafından etki mekanizmaları gözönüne alınarak başlıca dört grup

altında toplanmıştır: Serin proteazlar, tiyol proteazlar, metalo proteazlar ve asit proteazlar (5).

Bazı mikrobiyal proteazlar ve bunları salgılayan mikroorganizma grupları Çizelge 1.1' de verilmiştir.

Çizelge 1.1: Mikrobiyal Proteazların Sınıflandırılması

	Enzimin Kaynağı
SERİN PROTEAZLAR	1. Tripsin benzeri serin proteaz <i>Streptomyces</i>
	2. Alkalın serin proteaz <i>Bacillus, Streptomyces</i>
	3. Myxobacter-lytic proteaz <i>Sorangium</i>
	4. Stafilokokkal proteaz <i>St. aureus</i>
	5. Nötral serin proteaz <i>B. pumilus</i>
	6. Diğer serin proteazlar <i>Escherichia, Saccharomyces</i>
NÖTRAL PROTEAZLAR	1. Nötral metaloproteaz <i>Bacillus</i>
	2. Alkalın metaloproteaz <i>Pseudomonas, Serratia proteus</i>
ASİT PROTEAZLAR	1. Pepsin benzeri asit proteaz <i>Aspergillus, Mucor</i>
	2. Rennet benzeri asit proteaz <i>Bacillus, Mucor, Endothia</i>
TİYOL PROTEAZLAR	1. Clostripain <i>Clostridium</i>
	2. Streptokokkal proteaz <i>Grup A streptokoklar</i>

Bacillus subtilis' in 168 suşunun sporlaşmış kültürlerinde en az üç farklı proteolitik enzimin bulunduğu belirtilmiştir (6). Bu enzimlerden biri alkalın proteaz sınıfına giren subtilizin olup, kazeini hidrolizler. İkinci enzim prostetik grup olarak çinko içeren nötral proteazdır ve bu enzim de kazeini hidrolizler. Üçüncü enzim ise yüksek esteraz aktivitesine sahip olup kazeini hidrolizleyememektedir.

Metalo endopeptidaz grubunda olan metalo proteazlar nötral pH' da maksimum aktivite gösterirler, metal şelatlaştırıcı maddelere karşı duyarlıdırlar ve esteraz aktivitesi göstermezler.

Metalo proteazlar aktif merkezlerinde bir çinko atomu içerirler. Molekül ağırlıkları 38.000-40.000 olup, Ca^{2+} varlığında oldukça kararlıdırlar (7). Bu enzimler Basillerin salgıladığı en kararsız proteazlardır. Bu yüzden nötral proteazların uygulama alanı oldukça sınırlıdır (4). ***Bacillus megaterium*** (8,9), ***Bacillus polymyxa***, ***Bacillus thermoproteolyticus*** (10) ve ***Bacillus thuringiensis*** (11) sadece metalo proteaz salgırlar.

Üç proteaz türünden en az karakterize edilen enzim esterazdır. Molekül ağırlığı 36.000 olan bu enzim fenilmetil sülfonil florür (PMSF) ile inaktive olur. Bu enzim en çok gıda endüstrisinde kullanılır (12).

Serin proteazlar aktif bölgesinde serin artığı bulunduran enzimlerdir. Bu enzimler PMSF ve diizopropil floro fosfat (DFP) ile inhibe olmaktadır. Serin proteazların doğal substratları proteinler veya protein fragmentleri olmasına rağmen, bu enzimler için sentetik peptidler ve peptid amidleri de substrat olarak kullanılmaktadır (13).

Subtilizinler ***B. subtilis*** veya diğer Basil türü bakterilerin suşlarının salgıladığı serin proteazlardır. Genel olarak subtilizinler proteinlerin primer yapılarının tayini ve temizleyici olarak deterjan sanayiinde, dericilik ve tekstil sanayiinde kullanılmaktadırlar.

Subtilizin ilk olarak Linderstrom-Lang ve Ottesen tarafından ovalbuminin plakalbumine dönüşümü araştırılırken bulunmuştur (14).

Carlsberg' in laboratuvarında subtilizin Carlsberg' in izolasyonu ve kristalizasyonuna yönelik çalışmalar yapılmıştır (15,16). Daha sonraki çalışmalarda subtilizinin diğer bir çeşidi olan subtilizin BPN izolasyonu ve kristal halde elde edilmesi başarılmıştır (17). 1960 yılında Ottesen ve Spector subtilizin Novo olarak adlandırılan diğer bir bakteriyel ekstraselüler alkalın proteazın özelliklerini tanımlamışlardır (18).

Subtilizin Amylosacchariticus, Tsuru ve arkadaşları tarafından amonyum sülfat çöktürmesi, Duolite A-2, CM-selüloz ve DEAE-sephadex kromatografileri, Tris HCl-kalsiyum asetat tamponu (pH:8.5) ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır (19). Bu alkalın proteazın diğer subtilizinlerden farklı olan enzimik özellikleri belirtilmiştir. Subtilizin BPN, Carlsberg ve Novo gibi bu proteaz da esteraz aktivitesi göstermekte ve DFP ile inhibe olmaktadır (16,18,20,21).

Keay ve Moser' de ***B.subtilis*** (NRRL B3411), ***B. licheniformis*** ve ***B. pumilis***' ten aseton çöktürmesi, DEAE-selüloz, Duolite C-10 iyon değiştirme kromatografileri, dializ ve liyofilizasyon ile alkalın proteaz elde etmişlerdir . Bu alkalın proteazların aminoasit kompozisyonlarına, serolojik kros reaksiyonlarına ve proteaz aktivitesinin esteraz aktivitesi oranına dayanarak sınıflandırılacaklarını göstermişlerdir.Subtilizin Carlsberg, ***B. licheniformis*** ve ***B. pumilis***' ten elde edilen enzimleri Grup A, subtilizin Novo, BPN, Amylosacchariticus ve NRRL B3411' den elde edilen enzimleri ise Grup B olarak ayırarak bu enzimlere Basillopeptidaz isminin verilmesini önermişlerdir (22).

Welker ve Campbell ***B. amyloliquafaciens***' ten subtilizin BPN' nin izole edilebileceğini göstermişlerdir (23).

1.2. SUBTİLİZİNLERİN FİZİKSEL, KİMYASAL VE KARARLILIK ÖZELLİKLERİ

A. Subtilizin Carlsberg

Subtilizin Carlsberg' in izoelektrik pH' sı (pH_I) 9.4 olup, bu enzimin asidik pH' da (pH: 5.3 veya 6.5) kararlı olduğu, bazik pH' larda (pH: 8.1 ve 9.5) ise kararsız olduğu bulunmuştur. Sedimentasyon katsayısı 2.85S ve diizopropil fosforil (DIP)-enzim türevinin N- terminal aminoasit sırasının NH_2 -Ala-Glx şeklinde olduğu belirtilmiştir (16,24).

B. Subtilizin BPN

Subtilizin BPN' nin molekül ağırlığı 27.600 ve pH_I ' sı 7.80 olup, tek bir polipeptid zincirinden oluşmuştur (25). DIP-enzim türevinin amino ve karboksil terminal sekansları sırasıyla NH_2 -Ala-Glx ve Ala-Gln-COOH olarak tanımlanmaktadır. Bu sonuçlar Matsubara ve Nishimura' nın elde ettikleri sonuçlar ile uyum içindedir (26).

C. Subtilizin Novo

Subtilizin Novo fizikokimyasal özellikleri bakımından subtilizin Carlsberg ile benzerlikler göstermektedir. İzoelektrik pH'sı subtilizin Carlsberg' in izoelektrik pH' sından biraz daha düşüktür. Kararlılık karakteristikleri diğer subtilizinlere benzemektedir. Bununla birlikte %50 etanol ve 6 M üre gibi denatüre edici maddelere karşı dayanıklı olup, sodyum dodesil sülfat (SDS) ve sodyum tripoli fosfat gibi deterjanlara karşı kararlıdırlar (18).

D. Subtilizin Amylosacchariticus

Subtilizin Amylosacchariticus' un diğer subtilizinelere nazaran nötral çözeltilde daha az çözüdüğü ve enzim konsantrasyonu %0.5' ten daha yüksek ise pH: 6.5-8.5 arasında zayıf tuz çözeltilerine karşı diyaliz edilirse kristallenebileceği belirtilmiştir (19). Sedimentasyon katsayısı 2.89S, moleköl ağırlığı 22.700 olarak saptanmıştır. Amino terminal artığı Alanin, izoelektrik pH' sı 7.8 ve aminoasit kompozisyonu subtilizin BPN' nin aminoasit kompozisyonu gibidir (27).

1.3. SUBTİLİZİNLERİN PRİMER YAPILARI

A.Genel Karşılaştırma

Subtilizinlerin birçok fiziksel özellikleri benzer olmasına rağmen, aminoasit kompozisyonları önemli farklılıklar göstermektedir. Aminoasit dizi analizi çalışmalarıyla subtilizin BPN ve Novo' nun peptid haritası benzer olmasına rağmen subtilizin Carlsberg' in farklı olduğu saptanmıştır (28).

B. Subtilizin BPN

Subtilizin BPN' nin aminoasit dizisi triptik, kimotriptik, peptik ve siyanojen bromür ile yapılan kısmi hidroliz çalışmaları sonucu çıkarılmıştır (29,30,31). Protein disülfür köprülerinden yoksun 275 aminoasit artığından oluşmuş tek bir polipeptid zincirinden ibaret olup, pankreatik proteazların aminoasit dizisiyle homolog olmadığı gösterilmiştir (32). DFP ile etkileşen serin artığı 221 pozisyonunda

bulunmakta (Thr-Ser*-Met-Ala) ve bu aktif merkez çevresi memeli pankreatik proteazlarınkinden farklıdır.

C. Subtilizin Novo

Subtilizin Novo ile BPN' nin bazı enzimik ve kimyasal özelliklerinin karşılaştırılması, bu enzimlerin benzerliğini ortaya koymuştur (22).

D. Subtilizin Carlsberg

Subtilizin Carlsberg' in tam sekansı triptik ve kimotriptik peptidlerden tayin edilmiştir (33,36). Protein tek bir polipeptitte 274 artık içermekte ve 85 pozisyonunda bulunan bir delesyonla subtilizin BPN' den farklıdır. Subtilizin BPN (11 lizin ve 2 arginin artığı) ile Carlsberg' in (9 lizin ve 4 arginin artığı) toplam baz kompozisyonu benzer olmasına rağmen bunlar aynı pozisyonda değildir. Baz pozisyonlarındaki bu farklılıklar bu iki enzimin farklı triptik peptidlerini vermektedir (37).

E. Subtilizin Amylosacchariticus

Triptik hidroliz ve siyanojen bromür etkisi sonucu proteinde yaklaşık 275 aminoasit artığı olduğu saptanmıştır. Subtilizin Amylosacchariticus yalnızca 4 metiyonin ve 12 bazik aminoasit artığı ile diğer subtilizinlerden farklıdır.

1.4. AKTİF BÖLGE ÇALIŞMALARI

A. Serin

Subtilizin Carlsberg ve BPN' nin DFP ile inaktif hale gelmesi aktif bölgelerinde serin artığının bulunduğunu göstermiştir. Tsuru ve arkadaşları DFP' nin subtilizin Amylosacchariticus için de güçlü bir inhibitör olduğunu göstermişlerdir (19). Matsubara ve Nishimura ise subtilizin BPN' nin esterolitik ve proteolitik aktivitesinin DFP tarafından inhibe edildiğini belirtmişlerdir (22). Ayrıca Matsubara subtilizinin DIP türevini kristallendirmiş ve inhibitörün 1 molünün 1 mol proteinin serin artığına bağlı olduğunu göstermiştir (38).

Benzer sonuçlar Ottesen ve Schellman tarafından subtilizin Carlsberg için de bulunmuştur. Aynı çalışmacılar DFP ile pH: 7.6' da 10 dakika içinde %50 inaktivasyon oluştuğunu gözlemişlerdir (24).

Sanger ve Shaw P³²-DIP etiketli subtilizin Novo' nun kısmi asidik hidrolizinden sonra aktif serin içeren bir peptid izole etmişlerdir (39). Bu araştırmacılar Thr-Ser*P-Met-Ala serin artığı etrafındaki sekansın DFP' ye duyarlı bazı memeli proteazlarında bulunan Asp-Ser*-Gly sekansından farklı olduğunu ortaya koymuşlardır (40,41).

B. Histidin

Subtilizinin aktif bölgesi ile histidin arasındaki ilişki ilk kez Oosterbaan ve Cohen' in yapmış olduğu çalışmalarla belirlenmiştir (42). Daha sonraları kromoforik bir açılleyici madde olan furil-2-akriloilimidazol ile subtilizinin reaktif serin artığı çevresindeki

sekanslarının belirlenmesi çalışmaları sırasında Noller ve Bernhard histidin artığının serin artığından önce açillenebileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmacılar uzaysal konumda histidinin serine yakın olduğunu gözlemişlerdir (43).

Yeni bir madde olan benziloksikarbonil-L-fenil alanin bromometil ketonun (ZPBK) subtilizin BPN' nin aktivitesini azalttığı bulunmuştur. Bu reaksiyon spesifik olup tek bir histidin artığının kaybıyla sonuçlanmaktadır.

Radyoaktif işaretli ZPBK kullanılarak yapılan daha sonraki çalışmalar, subtilizin Carlsberg' de His 64' ün aktif merkez olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde subtilizin BPN' den radyoaktif işaretli histidin artığı içeren bir peptid parçası izole edildi ve bu peptidte radyoaktif işaretli His artığının çevresinin, subtilizin Carlsberg' deki His 64 ile uyum içinde olduğu görüldü (44).

1.5. SUBSTRAT SPESİFİKLİĞİ VE ENZİMİK ÖZELLİKLER

Subtilizinlerin bulunuşlarından beri bu enzimlerin proteolitik etkinlikleri ile ilgili sürekli veri elde edilmiştir.

Subtilizin Carlsberg için substrat olarak kazein kullanıldığında optimum pH değerinin 10-11 arasında olduğu saptanmıştır (16). Okunuki ve arkadaşları subtilizin BPN' nin kazein, hemogloblin, jelatin ve okside edilmiş lizozim içeren protein türlerini hidrolizlediğini göstermişlerdir (45). Ayrıca subtilizin BPN' nin pH: 8.5-9.5 arasında esteraz aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir (20).

1.5.1 Sentetik Substratlar

Benzoil veya asetil-L-aminoasit esterlerinin farklı çeşitleri test amacıyla kullanıldığı zaman subtilizin düşük bir spesiflik göstermektedir. Subtilizin Novo, BPN ve Carlsberg karşılaştırıldığında, subtilizin BPN ve Novo için benzoil-L-tirozin etil esterinin (BTEE), benzoil-L-leusin etil esterden çok daha iyi substrat olduğu görülmüştür (18,27).

Subtilizin Carlsberg' in bu iki substrata etkisi hemen hemen aynıdır. Dolayısıyla subtilizin Carlsberg, Novo ve BPN' den daha aktiftir denilebilir.

Kimotripsin ile subtilizin Carlsberg karşılaştırıldığında, kimotripsinin BTEE ile, subtilizin Carlsberg' den elli kez daha aktif olduğu görülür.

Subtilizinlerin tümü, alifatik aminoasitlere nazaran aromatik aminoasit esterleriyle belirgin bir şekilde aktivite göstermektedirler. N-asetil aromatik aminoasit esterleriyle yapılan deneylerde subtilizin Carlsberg için V_{max} değerinin diğer enzimlerin V_{max} değerlerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Subtilizin *Amylosacchariticus* ise en düşük aktiviteye sahiptir (45). Subtilizin *Amylosacchariticus*' un aminoasit sırası, BPN ve Novo enzimleriyle büyük benzerlikler göstermesine karşın, aktivitesindeki bu farklılık ilginçtir.

Substrat olarak N-asetil-L-tirozin etil ester kullanıldığında, fenol, indol, hidrosinamat ve indolpropionat gibi aromatik bileşikler kompetitif inhibitör etkisi gösterirken, bu maddelerin N- α -benzoil-L-

arginin etil ester ile nonkompetitif inhibitörler oldukları bulunmuştur (46). Bu iki ester substratının aktif bölgeye farklı bir şekilde bağlı olduğu ileri sürülmektedir. Bu bağlanma modelleri subtilizinlerin spesifikliğı için uygun komplekslerin saptanmasına yardımcı olmaktadır.

Subtilizin Carlsberg asetil aminoasit esterleri ile daha yüksek V_{max} değerine sahip olmasına rağmen, bu enzimlerde (Novo, Amylosacchariticus, Carlsberg) aynı substratlar için K_M değerleri ve inhibitör denge sabitleri (K_I) değerleri birbirine yakındır.

Subtilizinlerin aminoasit sıralarında farklılıklar olmasına rağmen, benzer substrat bağlanma yerlerine sahiptirler. Subtilizin Carlsberg N-asetil aminoasit esterleriyle subtilizin Novo' dan daha yüksek V_{max} değerine sahipken, bu iki enzim için substrat olarak serbest aminoasit esterleri kullanıldığında V_{max} değerleri birbirine çok yakındır. Bu durum Carlsberg' in bağlanma bölgesinin Novo enziminin bağlanma bölgesinden daha az polar olduğunu, böylece serbest aminoasit esterlerindeki polar α -amino gruplarına daha çok duyarlı olduğunu göstermektedir (45).

Farklı bakteri ve moldlardan saflaştırılan alkalın ve nötral proteaz türlerinin sentetik substratlar üzerine etkisi ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda nötral proteazların hidrofobik aminoasit artıklarından önce gelen peptid bağlarını hidrolizlediğı, alkalın proteazların ise hidrofobik aminoasit artıklarından sonra gelen peptid bağlarını hidrolizlediğı saptanmıştır (47,48,49).

1.5.2. Kazein

Kazein bir fosfoprotein olup, 20 °C' de ortama asit ilavesiyle pH: 4.6' da çöker (50). Bu protein 150 yıldan beri inek sütünün başlıca proteini olarak bilinmektedir (51).

1925' te Linderstrom-Lang ve Kodama kazeinin saf bir protein olmadığını, heterojen bir yapıda olduğunu bulmuşlardır (52). Daha sonraları yapılan çalışmalarla kazeinin α_{S1} , α_{S2} , β ve κ olmak üzere 4 ayrı alt üniteden meydana geldiği belirlenmiştir (53,54). Bunların dışında ayrı bir alt ünite olarak belirlenen γ kazeinin ise β -kazeinin ve sütte bulunan proteazların etkisi ile oluştuğu gösterilmiştir.

Çizelge 1.2.' de kazein alt ünitelerinin bazı özellikleri ve içerdiği aminoasit artığı sayısı verilmektedir (55).

Çizelge 1.2: Süt Proteininin Kompozisyonu Ve Özellikleri

	%	Molekül Ağırlığı (kDa)	Amino asit artığı	Fosfor grupları
Ham protein	20	14.2-400		
Kazein	80			
α_{S1}	38.8	23.6	199	8
α_{S2}	10	25.2	207	10-13
β	35.9	24	200	5
κ	12.3	19	169	1
γ	3	12-21		

Kazein kalsiyum ve fosfat iyonlarıyla büyük miseller oluşturmaktadır (56). Her ne kadar kazein misellerinin yapısı hakkında

modeller geliştirilmişse de çeşitli kazeinlerin misel içindeki yapısı hala bilinmemektedir.

1.5.3. Azokol

Proteolitik enzimlerin aktivite tayininde kullanılan substratlardan biri olan azokol Kongo Kırmızısının yün veya pamuk üzerine emdirilmesi şeklinde kullanılan, suda çözünmeyen, kırmızı-kahverenkli bir azoboyadır. Azokol farklı proteazlar tarafından kolaylıkla hidrolizlenir ve ürün olarak renkli peptid parçaları meydana gelir.

Chavira ve arkadaşlarının *B. subtilis* ekstraktlarını ve subtilizin BPN' yi kullanarak yapmış oldukları çalışmada azokol hidrolizinin proteaz konsantrasyonuna ve zamana bağlı olarak lineer olduğu görülmüştür. Yine bu çalışmacılar azokolün enzimle inkübasyonu esnasında çalkalama hızının önemli olduğunu belirtmişlerdir (57).

1.5.4. Azokazein

Proteolitik enzimler için kullanılan substratlardan biri, kazeine diazotize arilamin bağlanması sonucu oluşan azokazeindir.

Proteinlere diazotize arilaminlerinin bağlanması kromoforik türevler meydana getirir. Böyle azoproteinler trikloro asetik asit ile etkileşince çöker ve renksiz filtratlar oluşur. Eğer azoprotein çözeltisi proteolitik hidroliz etkisi altında kalırsa, trikloro asetik asit içinde çözünen renkli ürünler oluşur. Hidrolizlenen substratın trikloro asetik asit çözeltisi içindeki yoğunluğu enzim çözeltisinin proteolitik

aktivitesinin bir fonksiyonudur. Bu bulgular proteolitik aktivite tayinleri için kolorimetrik metot temelini sağlar (58).

1.6. İNHİBİTÖRLER

1.6.1. Boya Bağlanması

Bazı enzim ve proteazların aktif bölgesine boyaların bağlanmasıyla ilgili çalışmalar bu etkileşimlerin çok spesifik olduğunu göstermiştir (59).

Biebrich Scarlet ([6-(2-hidroksil-1-naftil) azo]-3, 4'-azodibenzen sülfonat) α -kimotripsinin, thionin (3,6-diamino fenothiazin) tripsinin aktif bölgesine spesifik olarak bağlanmaktadır (12,60). Bu enzimlerin üç boyutlu yapısı benzer olmasına rağmen, boya-protein etkileşimleri farklıdır. Proflavin (3,6 diamokridin) bu enzimlerin ikisine de bağlanır. Yukarıdaki boyaların hiç biri subtilizinlerle etkileşmez.

4-(4'-aminofenil azo) fenil-arsonatın subtilizinlerin aktif bölgesine spesifik olarak bağlandığı bulunmuştur. Spektrofotometrik titrasyonlar subtilizinelere boyaların bir tek bağlanma bölgesinden bağlandığını göstermiştir. Boya bağlanması substrat konsantrasyonuna (benzoil-L-arginin etil ester veya asetil-L-tirozin etil esterle) bağlıdır.

Subtilizinlerle arsonatların etkileşimi çok yavaştır. Bununla birlikte reaksiyonun gerçekleşmesi için, reaksiyona giren maddelerin konsantrasyonuna bağlı olarak 15-60 dakika yetmektedir.

Fenil arsonat ve onun p-nitro, p-amino ve p-metil türevleri subtilizinler için zamana bağlı inhibitörlerdir (61).

1.6.2. Metal İyonlarının Etkisi

Subtilizinler üzerine bazı metal iyonlarının etkisini belirlemek üzere çalışmalar yapılmıştır. Tobe ve arkadaşları *Bacillus* türünden saflaştırdıkları subtilizinin 4.4 U/mg' si için, substrat olarak kazein kullanıldığında, 1 mM metal iyonları klorürlerinin enzim aktivitesini nasıl etkilediklerini araştırmışlardır. Bu çalışmada Hg^{2+} ' nin enzimi tamamen inhibe ettiği, Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} ve Sr^{2+} iyonlarının ise anlamlı bir inhibisyona neden olmadıkları saptanmıştır. Ancak yapılan bu çalışmalarda farklı anyonların etkisi araştırılmadığı gibi, bu etkilerin nedeni de açıklanmamıştır. Metal iyonlarının etkisi ile ilgili yapılan inhibisyon çalışmalarında elde edilen sonuçlar bu metal iyonlarının inhibisyon etkisinde bir düzenlilik olmadığını ortaya koymuştur (19,62,63).

Tsuru ve arkadaşları *B. subtilis*' ten saflaştırdıkları alkalın proteazın (2400 U/mg, pH: 10.5) aktivitesinin 1mM $HgCl_2$ ile %20' ye, 1mM $CuSO_4$ ile %97' ye, 1mM $Pb(CH_3COO)_2$ ve $AgNO_3$ ile %95' e düştüğünü gösterirken, Christison ve Martin bir *Cytophage*' den (NRCC: 12089) saflaştırdıkları alkalın proteazın (25.28 U/mg, pH: 8), substrat olarak kazein kullanıldığında 2 mM Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} iyonlarının herbirinin varlığında aktivitesinin değişmediğini, 2 mM Co^{2+} veya 2 mM Hg^{2+} nin aktiviteyi sırasıyla %21 ve %11' e düşürdüğünü saptamışlardır (19,63).

Yapılan bu çalışmalar kaynağı ve aktif ünite sayısı farklı subtilizinlerin, metal iyonlarının varlığında farklı oranlarda etkilendiği sonucunu doğurmaktadır.

1.7. ALKALİN PROTEAZLAR VE SPORLAŞMA

Glutamat içeren hidrolizlenmiş kazeinli besiyerinde üretilen *B. subtilis*' te 8 saat sonra sporlaşma olmaktadır. Sporlaştırma koşullarında hücre proteinlerinin %50, DNA' nın ise %10-20 oranında arttığı belirtilmektedir (64). Sporlar 0.1 mL etil metan sülfonat [(EMS) ya da metan sülfonik asit etil esteri] içeren fosfat tamponu içinde süspanse edilip, 35 °C' de 20 dakika inkübe edildiğinde asporojen mutantlar elde edildiği iddia edilmektedir (65).

Diğer yandan sporlaşma aşamasında nükleosit fosfataz, DNA polimeraz, inorganik pirofosfataz ve serin proteaz (subtilizin) gibi enzimlerin sentezlendiği, bir bakıma sporlaşmanın proteazlara gereksinim duyduğu, proteaz inhibitörlerinin sporlaşmayı da inhibe ettiği belirtilmektedir (64). Ayrıca PMSF ve benzeri tersinmez serin proteaz inhibitörlerinin de sporlaşmayı engellediği belirtilmektedir (66).

Tezimizin amacını; **1. *Bacillus subtilis*'** ten izole edilen ve ticari olarak temin edilen subtilizin için azocoll, azocasein ve farklı kaynaklı kazeinlerin substrat uygunluğunu karşılaştırmak **2.** Bazı metal iyonları ve organik bileşiğin bu enzim üzerindeki inhibisyon etkisini incelemek ve **3.** Mutajen özelliğe sahip EMS' nin etkisine bağlı olarak, sporlaşmanın mekanizmasını aydınlatmaya yönelik bulgular ortaya koymak oluşturmaktadır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetik asit, etil alkol, sodyum asetat, dietil eter, hidroklorik asit, nitrik asit, sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, trikloro asetik asit (TCA), sodyum dihidrojen fosfat, disodyum hidrojen fosfat, sodyum hidroksit, sodyum tungustat, sodyum molibdat, fosforik asit, lityum sülfat, brom, amonyum persülfat, tirozin, triptofan, sistein, fenol, civa-II-klorür, civa-II-nitrat, bakır klorür, bakır sülfat, K-EDTA, dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, amonyum sülfat, magnezyum sülfat, glukoz, boraks, metilen mavisi, eozin Merck Darmstad' tan

Kalsiyum karbonat, tris (hidroksimetil aminometan), akrilamid, N-N'-metilen bisakrilamid, N-N'-N'-N'-tetra metil etilen diamin (TEMED), sodyum dodesil sülfat (SDS), 2-merkaptoetanol (MET), commassie brilliant blue R-250, brom fenol blue, gliserin, etil metan sülfonat (EMS), azokazein, azokol ve kullanılan enzim (katalog no P-8775) , Sigma Chemical Co. St. Louis' den

Tripsin (E.C.3.4.21.4) ise Fluka' dan temin edilmiştir. Substrat olarak kullanılan kazein laboratuvarımızda saflaştırılmıştır.

2.2. Kullanılan Tampon Sistemleri ve Folin Reaktifi (67):

Ekler Kısımında Verilmiştir (Ek: 1-2).

2.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalkalayıcı (Braun Certomat-160), spektrofotometre (UV-160 Shimadzu UV-Visible), santrifüj (4235-A centrifuge), vortex (Fisons Whirli Mixer™), alev fotometresi (Jonway Flame Photometer PFP7), termostat (Clifton Heater), elektroforez aygıtı (Gelman Gelcell Gel Column), elektroforez güç kaynağı (Gelman Deluxe Regulated Power Supply), UV lambası, liyofilizatör (Edwards), mikroskop (Olympus BH-2).

2.4. Kazeinlerin Saflaştırılması

Değişik cins hayvanlardan (inek, koyun, keçi, manda) alınan 30' ar mL süt örnekleri saf su ile yarı yarıya seyreltildikten sonra sabit karıştırma hızıyla 40 °C' ye kadar ısıtıldı. Üzerine 2 mL %10' luk asetik asit ilavesinden sonra çökelek-sıvı karışımı oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi. Daha sonra 2 mL 1 M sodyum asetat (pH: 4.6) çözeltisi ilave edilip, karışım 2250xg' de 10 dakika santrifüjlendikten sonra üst sıvı atılarak kazein iki kez %95' lik etil alkol içinde süspanse edildi. Vakum altında süzöldükten sonra etil alkol-dietil eter karışımı ile yeniden süspanسیون haline getirildi ve ardından süzülerek kurumaya bırakıldı (68).

2.5. Fosfat Tayini

Farklı hayvanlardan saflaştırılan yaklaşık 0.5 gr kazein 3-4 damla derişik hidroklorik asit ile kömürleştirildikten sonra çözünönceye kadar derişik nitrik asit ilave edildi. Hacim saf su ile 50 mL' ye tamamlandı.

Standart fosfor çözeltileri referans olarak alınarak kazein çözeltilerinin 440 nm' de absorbands değerleri okundu. Standart eğriden fosfat miktarı tayin edildi (69).

2.6. Kalsiyum Tayini

Fosfat tayini için hazırlanmış olan kazein çözeltilerinin kalsiyum içerikleri standart kalsiyum çözeltileri ile kalibre edilmiş alev fotometresinde tayin edildi.

2.7. Elektroforez

Jellerin hazırlanması ve gerekli diğer çözeltiler ekler kısmında verilmiştir (Ek: 3).

2.7.1. Elektroforez İşlemi

Değişik tür hayvanların kazeinlerinin elektroforez profilleri Weber&Osborn yöntemiyle elde edildi (70).

Jel tüplerinin 6 cm' lik bölümü öngörülen şekilde hazırlanan jel çözeltisi ile dolduruldu. Bu çözeltinin üzerine ince uçlu bir pastör pipeti ile tüpün bir kenarından damla damla saf su akıtılarak çözeltinin hava ile temasını kesmek üzere 4-5 mm' lik bir su tabakası oluşturuldu. Yaklaşık 45 dakika süreyle UV lambasından 5-10 cm uzaklıkta fotopolimerizasyona bırakıldı. Fotopolimerizasyon tamamlandıktan sonra jelin üstündeki su dikkatlice absorban bir kağıt yardımıyla alındı.

2.7.2. Jellerin Üzerine Protein Örneklerinin Uygulanması

Hazırlanan jellerden birine molekül ağırlıkları bilinen standart protein çözeltisinden, diğerlerine ise saflaştırılan inek, koyun, keçi ve manda kazeinleri (%0.2, 50 mM fosfat tamponu (pH: 8) içinde) ve teknik kazein örnekleri eşit miktarda verildi. Her bir jel için 8 mA'lık bir akım uygulandı. Çeşitli zaman aralıklarıyla brom fenol blue boyasının ilerleyişi kontrol edilerek, elektroforez işleminin ilerleyişi izlendi. Boya jel tüpünün alt kısmına yaklaşıncaya akım kesildi, jel tüpleri aygıttan çıkarıldı. Bir enjektör yardımıyla jel ile jel tüpü arasına su sıkılarak jellerin tüplerden çıkması sağlandı.

2.7.3. Protein Bantlarının Tespit Edilmesi Ve Boyanması

Daha önceden hazırlanan commassie brilliant blue R-250 çözeltisi proteinlerin boyanarak tespit edilmesinde kullanıldı. Jeller bu boya içerisinde 30 dakika tutularak boyama ve tespit işlemi gerçekleştirildi. Bu sırada jeller tamamen boyandığı için boya çıkarma çözeltisinde 1-2 gün bekletildi. Bu sürenin sonunda protein bantları gözle görünür duruma getirildi.

2.8. Kazein İle Proteaz Aktivite Tayini

Anson Yöntemi modifiye edilerek kazein ile aktivite tayini yapıldı. 0.2 M Karbonat-Bikarbonat (pH: 9.5) ve 0.2 M Tris-HCl (pH: 9.0) tamponları içinde ayrı ayrı %0.3'lük kazein çözeltisi hazırlandı. Buradan hazırlanan farklı derişimlerdeki kazein çözeltilerinin ikişer mL' si ile aynı tamponlar içinde seyreltilmiş 10 µL enzim çözeltisi (2.3 µg/µL) belli bir

çalkalama hızında (120 rpm) 37 °C' de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon 2 mL 0.4 M TCA çözeltisinin ilavesiyle durduruldu. Reaksiyon karışımı 37 °C' de 20 dakika çalkalayıcıda bekletildikten sonra 5000 rpm' de 10 dakika santrifüjlenip süzöldü. 1 mL süzöntü alınarak üzerine 5 mL 0.4 M sodyum karbonat ilave edildi. Daha sonra 1 mL sulandırılmış (1:3) Folin reaktifi katıldı. Karışım hızla karıştırıldıktan sonra 37 °C' de tekrar 20 dakika sabit hızdaki çalkalayıcıda bekletildikten sonra 660 nm' de absorbans değerleri okundu.

Bir enzim ünitesi deney koşullarında 0.5 µg tirozinin verdiği mavi renge eşdeğer renk veren TCA ile çözünür fragmentler açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlandı (71).

2.9. Kazein Hidrolizi İle Proteaz Aktivitesini Belirlemek İçin Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Kalibrasyon eğrisi 0.2 N HCl içinde 0-60 µg/mL' lik standart tirozin çözeltileri hazırlanarak elde edildi. Bu standartların direk 280 nm' de veya 1 mL' si 5 mL 0.4 M sodyum karbonat ve 1 mL sulandırılmış (1:3) Folin reaktifi ile karıştırılıp, 20 dakika 37 °C' de bekletildikten sonra 660 nm' de absorbansı okundu (10).

2.10. Enzim Aktivitesi Üzerine pH' nın Etkisi

Farklı tamponlarda hazırlanan, derişimleri sabit kazein ve enzim çözeltileri kullanılarak aktivite tayini yapıp, enzim için optimum pH

değeri saptandı. Bu amaçla 0.2 M Fosfat (pH: 7.0), 0.2 M Tris-HCl (pH: 8.0; 9.0), 0.2 M Karbonat-Bikarbonat (pH:9.5; 10.0; 10.5; 11.0) tamponları kullanıldı.

2.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Optimal pH' da ve sabit derişimde hazırlanan kazein ve subtilizin çözeltileri kullanılarak 25; 30; 37; 45; 55 ve 60 °C' de aktivite tayinleri yapılıp, enzim için optimum sıcaklık değeri belirlendi.

2.12. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Aminoasitlerin Ve Organik Maddelerin İnhibisyon Etkisi

Enzim çözeltilisi 0.2 M Karbonat-Bikarbonat tamponu (pH: 9.5) içinde belirli derişimlerde hazırlanmış olan tirozin, triptofan, sistein, fenol ve EMS ile 37 °C' de 30 dakika öninkübasyona bırakıldıktan sonra aktivite tayini yapıldı.

2.13. Enzim Aktivitesi Üzerine Civa Ve Bakır Tuzlarının İnhibisyon Etkisi

Bakır ve civa tuzlarının Karbonat-Bikarbonat tamponunda çözünmemesi nedeniyle enzim çözeltilisi 0.2 M Tris-HCl (pH: 9.0) tamponu içinde hazırlanmış olan Hg(NO₃)₂, HgCl₂, CuSO₄ ve CuCl₂ ile 37 °C' de 30 dakika öninkübasyona bırakıldıktan sonra aktivite tayini yapıldı.

Ham enzim ile Cu²⁺ tuzlarının inhibisyon etkisi incelendiğinde düzenli sonuçlar elde edilemediğinden dolayı enzim diyalizlenip,

liyofilize edildikten sonra bakır bileşikleri ile öninkübasyona tabi tutulup, aktivite tayini yapıldı.

2.14. Diyaliz İşlemi

Diyaliz hortumu 90 °C' de kaynatılan K-EDTA içinde 3 dakika süreyle bekletildi. Üst sıvı dökülüp hortum bol miktarda saf su ile yıkanarak kullanıldı.

Diyaliz işlemi 0.2 M Tris-HCl (pH: 9.0) tamponu içinde gece boyu yapıldı.

2.15. Azokazein İle Aktivite Tayini

Aktivite tayini Leighton ve Prestidge' nin yöntemleri modifiye edilerek yapıldı.

0.2 M Karbonat-Bikarbonat tamponu (pH: 9.5) içinde %2' lik ticari azokazein çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden hazırlanan farklı derişimlerdeki azokazein çözeltilerinin 0.5 mL' si ile 0.2 M Karbonat-Bikarbonat tamponuyla (pH:9.5) seyreltilmiş 10 µL enzim çözeltisi (2.3µ g/µL) belli bir çalkalama hızında (120 rpm) 37 °C' de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon 2 mL %10' luk TCA çözeltisinin ilavesiyle durduruldu ve reaksiyon tüpleri 0 °C' de 15 dakika bekletildi. Daha sonra 5000 rpm' de 10 dakika santrifüjlenip süzöldü. 0.8 mL süzöntü alınarak üzerine 0.2 mL 1.8 N NaOH ilave edildi ve 420 nm' de absorbands okundu (72,73).

2.16. Azokol İle Aktivite Tayini

Virgülden sonra dördüncü hanesine kadar duyarlılıkta tartılmış farklı azokol miktarları 3 mL 0.2 M Karbonat-Bikarbonat tamponu (pH: 9.5) içinde süspansiyon haline getirildi. Aynı tampon içindeki seyreltilmiş 10 µL enzim (2.3 µg/µL) çözeltisi ile belli bir çalkalama hızında (240 rpm) 37 °C' de 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra reaksiyon karışımı üzerine 1 mL 0.6 M soğuk TCA ilave edildi. 5000 rpm' de 10 dakika santrifüjlendikten sonra üst sıvının 520 nm' de absorbans değeri okundu (74).

2.17. Spor Boyama Çözeltileri

Spor boyama çözeltileri Ekler kısmında verilmiştir (Ek.5).

2.18.Spor Boyama

Sıvı besi yerinden alınan bakteri örneği lam üzerinde yayıldıktan sonra alevde fikse edildi. Lamın üzerine müzereli spor boyası dökülerek, alt kısımlarından lamlar 4 dakika ısıtıldı. Yıkandıktan sonra %10' luk nitrik asit dökülerek 2-3 dakika bekletildi ve tekrar yıkandı. Son olarak, lamın üzerine eozin döküldü ve 5 dakika sonra lam yıkandı, havada kurutuldu. Spor oluşumu mikroskop altında incelendi.

3. SONUÇLAR

Alkalin proteazlar olarak bilinen subtilizinler aktif bölgelerinde serin artığı bulunan, Basil türü bakteriler özellikle **Bacillus subtilis** tarafından salgılanan serin proteazlardır.

Subtilizinler için kullanılan substratlardan biri olan kazein özellikle zengin aromatik aminoasit içeriği nedeniyle kimotripsin gibi birçok proteolitik enzim için de kullanılmaktadır (50).

Bu amaçla manda, inek, koyun ve keçi sütlerinden saflaştırılan kazeinlerin, **B. subtilis** türlerinden saflaştırılmış olan ve ticari olarak sağlanan subtilizin enzimi için substrat olarak uygunluğunu araştırmak üzere yapılan aktivite tayinleri ile elde edilen sonuçlar ve bunlara bağlı Lineweaver-Burk eğrileri Şekil 3.1' de K_M ve V_{max} değerleri ise Tablo 3.1' de verilmiştir.

Farklı tür hayvanlardan saflaştırılan kazeinlerin yapıları hakkında kaba bir fikir sahibi olmak üzere, saflaştırılan proteinelere SDS-PAGE uygulandı. Deney sonucu elde edilen elektroforez bant profilleri Şekil 3.2' de görülmektedir.

Kullanılan enzim için substrat uygunluğunu karşılaştırmak üzere kazeinin dışında azokol ve azokazein gibi substratlar kullanılarak elde edilen sonuçlar Şekil 3.3 ve Tablo 3.2' de verilmiştir.

Kazeinlerin substrat uygunluğu ile Ca^{2+} ve $(PO_4)^{3-}$ içerikleri arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak üzere yapılan kalsiyum ve

fosfat tayinleri sonucu elde edilen Ca^{2+} , $(PO_4)^{3-}$ ve $Ca^{2+}/(PO_4)^{3-}$ miktarları Tablo 3.3' de verilmiştir.

Enzimin optimum pH ve sıcaklığını belirlemek için yapılan çalışmalarla ilgili sonuçlar Şekil 3.4 ve 3.5' de verilmiştir.

Enzim-kazein inkübasyon ortamına uygun derişimlerde fenol, tirozin, triptofan, sistein ve EMS ilave edilerek yapılan kinetik çalışmalarda elde edilen sonuçlara bağı Lineweaver-Burk eğrileri Şekil 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 ve 3.10' da substrat için K_M ve V_{max} değerleri ise Tablo 3.4' te verilmiştir.

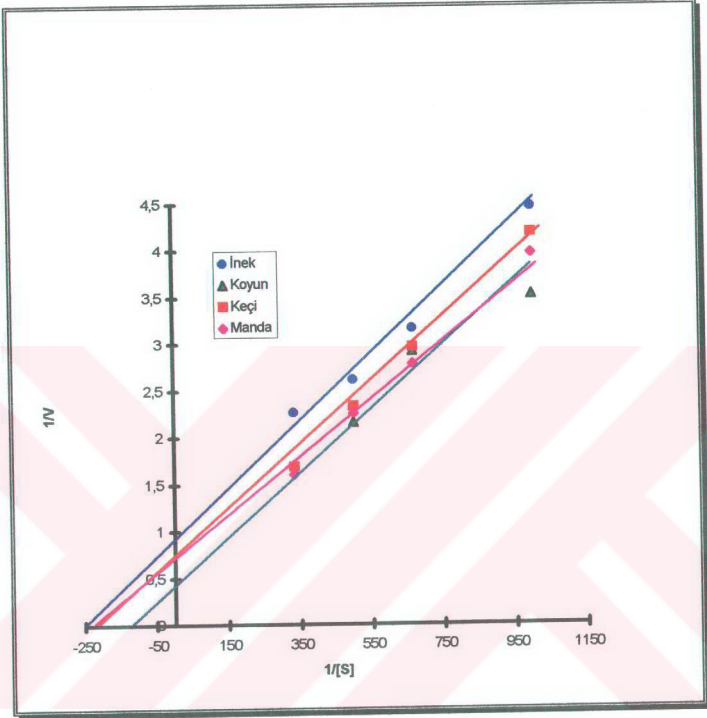
Tripsin üzerine EMS' nin inhibisyon etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmalardan elde edilen Lineweaver-Burk eğrisi Şekil 3.11' de, bu enzimin kullanılması durumunda substrat için K_M , V_{max} ve subtilizin için aynı koşullarda saptanan sözü edilen sabitlerin değerleri Tablo 3.5' de verilmiştir.

Subtilizin aktivitesi üzerine Hg^{2+} ve Cu^{2+} nin farklı tuzlarının inhibisyon etkisinin olup olmadığını belirlemek için yapılan çalışmalarda substrat olarak inek, manda, koyun ve keçi kazeinleri, inhibitör olarak $Hg(NO_3)_2$, $HgCl_2$, $CuCl_2$ ve $CuSO_4$ kullanıldı. Bu deneylerle ilgili veriler Şekil 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, , 3.19' da ve Tablo-3.6' da verilmiştir.

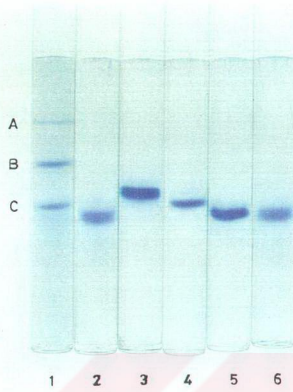
Bacillus subtilis in üreme evrelerinden logaritmik fazda metalo proteaz, stasyonere fazda serin proteaz salgıladığı ve sporlaşma ile serin proteaz salgılanması arasında varolduğu iddia edilen (64,66) ilişkiden yola çıkarak ve proteaz inhibitörlerinin sporlaşmayı da inhibe ettiği iddiasını (64) göz önüne alarak, biri kontrol olmak üzere iki besi

yerinden birine 1 mM EMS ilave edilip, bununla sporlaşma arasında bir ilişki olup olmadığı araştırıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.20, 3.21, 3.22, 3.23, 3.24 ve 3.25' de verilmiştir.Yine bu kültürlerin üst sıvılarından alınan eşit hacimdeki örneklerin elektroforez bant profilleri Şekil 3.26' da verilmiştir.





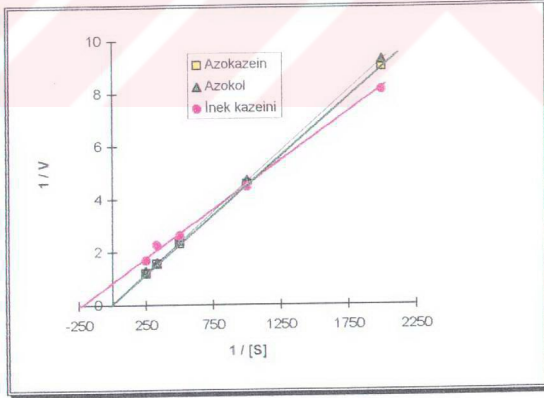
Şekil 3.1: Farklı Hayvanlardan Safılaştırılan Kazeinlerin Subtilizin İçin Substrat Olarak Kullanılması Durumunda Elde Edilen Sonuçlar



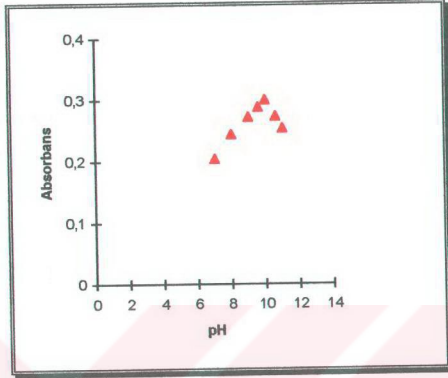
Şekil 3.2: Farklı Kaynaklı Hayvanlardan Safılaştırılan Kazeinlerin Elektroferez Bant Profilleri

*1. Standart proteinler, 2. Teknik kazeini, 3. Manda kazeini, 4. Keçi kazeini, 5. Koyun kazeini, 6. İnek kazeini

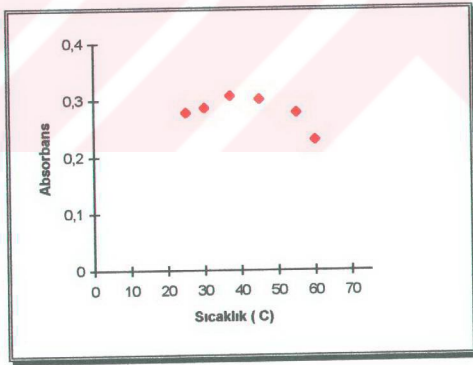
*Standart Proteinler: A. Albumin bovin (66 KDa), B. Albumin egg (45 KDa), C. Karbonik anhidraz (29 KDa).



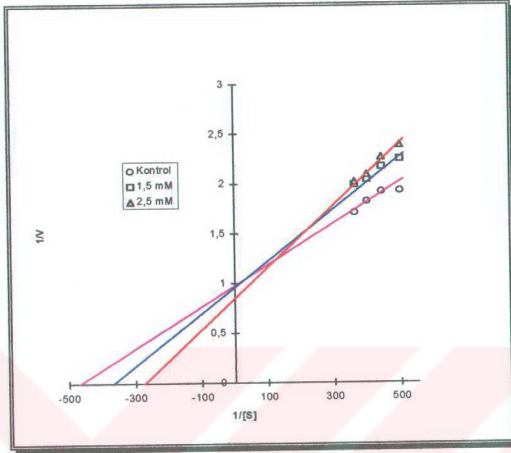
Şekil 3.3: İnek Kazein, Azokazein Ve Azokol' ün Subtilizin İçin Substrat Olarak Kullanılması Durumunda Elde Edilen Sonuçlar



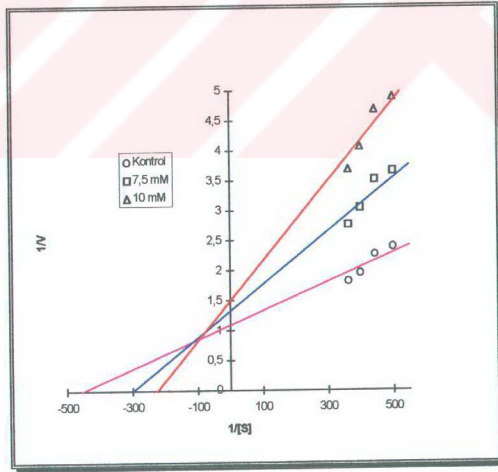
Şekil 3.4 : Enzim Aktivitesi Üzerine pH ' nın Etkisi



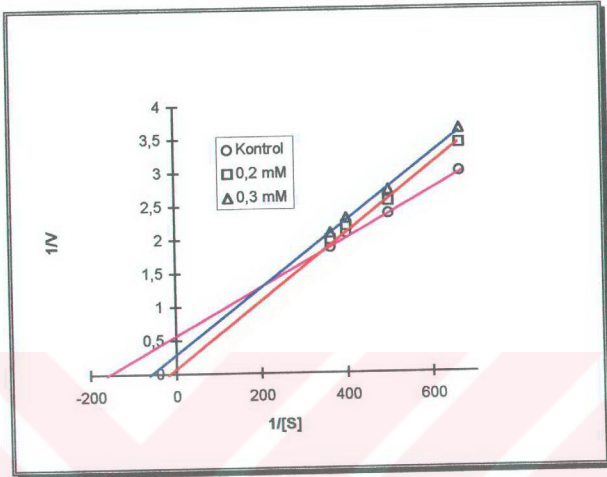
Şekil 3.5 : Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi



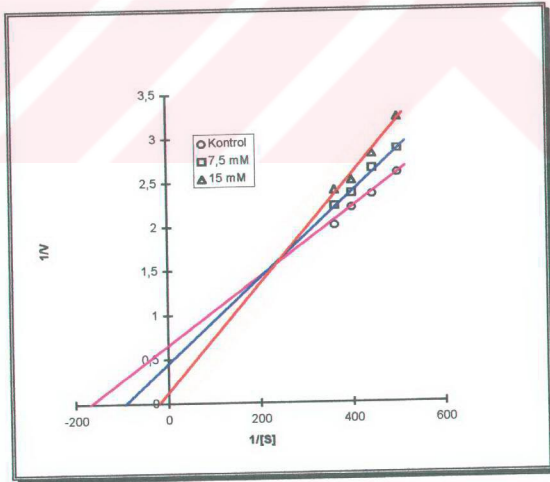
Şekil 3.6: Fenol'ün İnhibisyon Etkisi



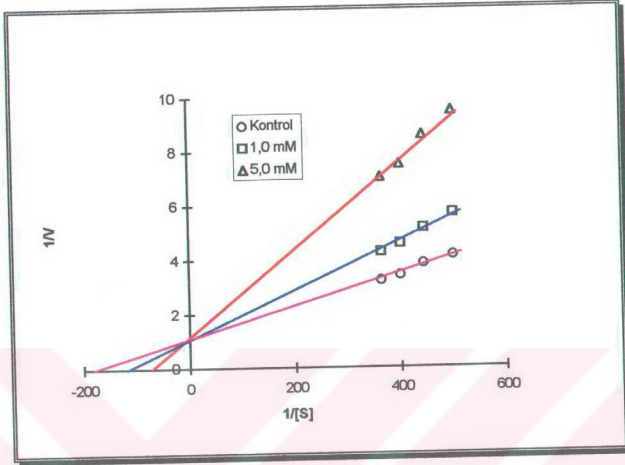
Şekil 3.7: Tirozin'in İnhibisyon Etkisi



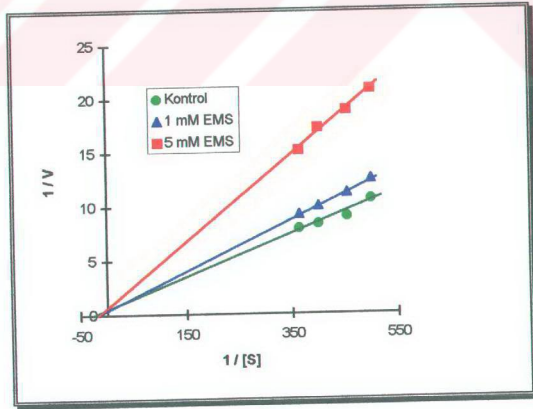
Şekil 3.8: Triptofan'ın İnhibisyon Etkisi



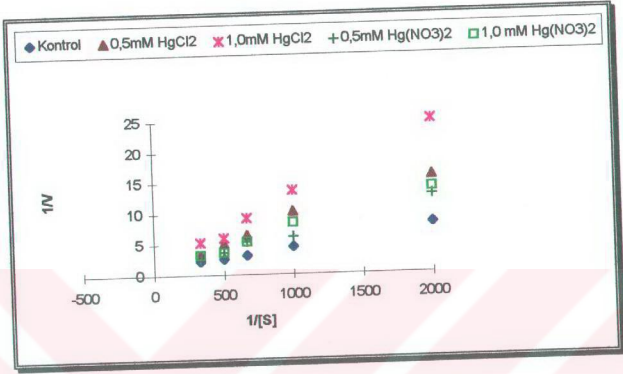
Şekil 3.9: Sistein'in İnhibisyon Etkisi



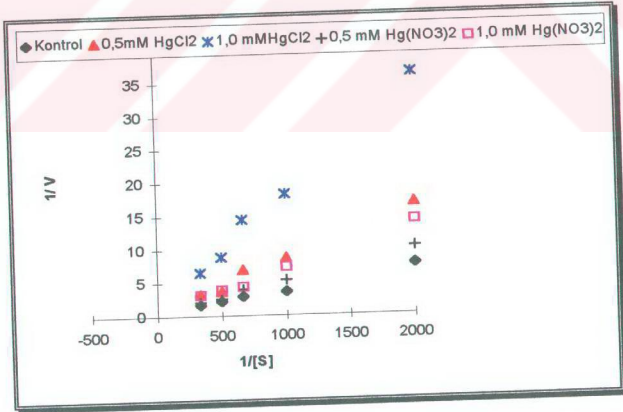
Şekil 3.10: Etilmetansulfonat (EMS) in Inhibisyon Etkisi



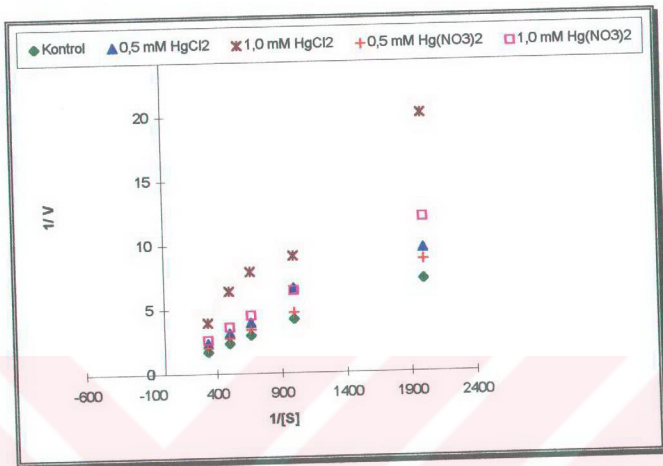
Şekil 3.11: Tripsin Üzerine EMS' nin Inhibisyon Etkisi



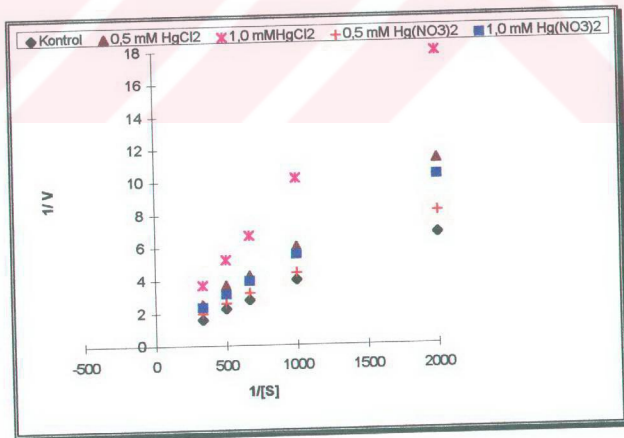
Şekil 3.12: Hg²⁺ Tuzlarının İnhibisyon Etkisi (Substrat : İnek Kazeini)



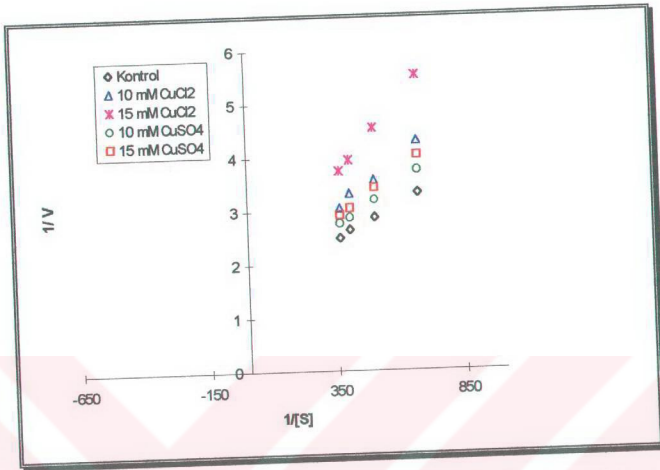
Şekil 3.13: Hg²⁺ Tuzlarının İnhibisyon Etkisi (Substrat : Koyun Kazeini)



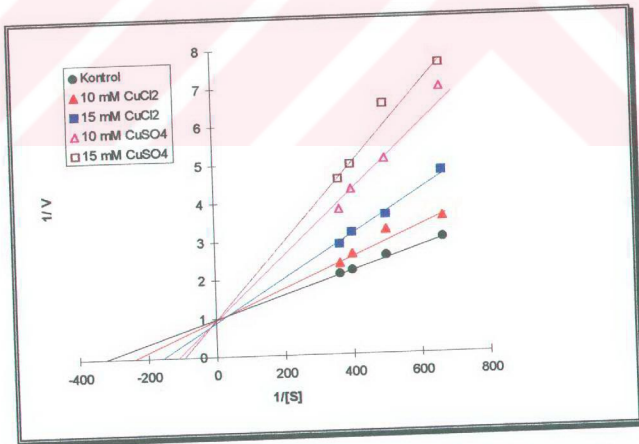
Şekil 3.14: Hg^{2+} Tuzlarının İnhibisyon Etkisi (Substrat : Keçi Kazeini)



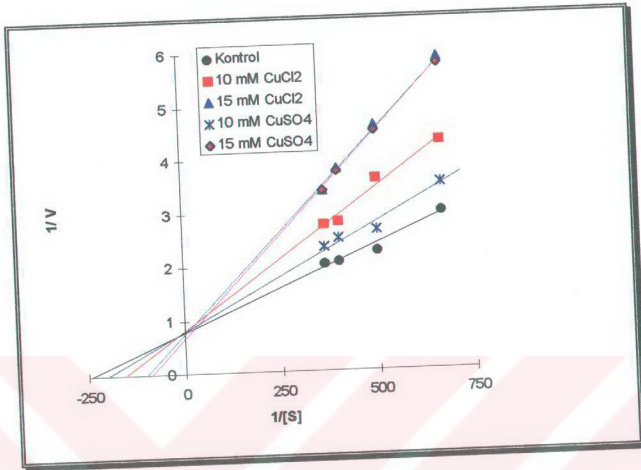
Şekil 3.15: Hg^{2+} Tuzlarının İnhibisyon Etkisi (Substrat : Manda Kazeini)



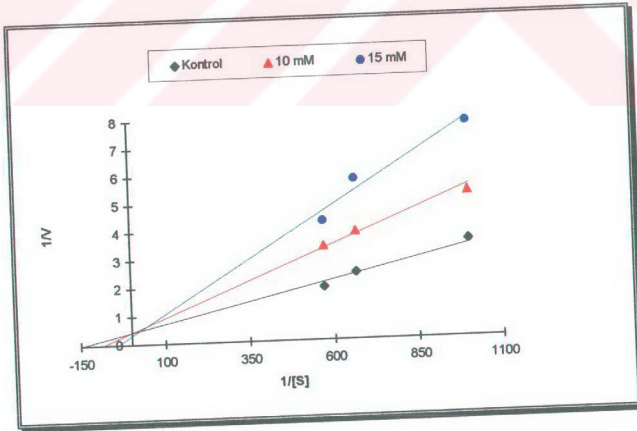
Şekil 3.16: Cu²⁺ Tuzlarının İnhibisyon Etkisi (Substrat : İnek Kazeini)



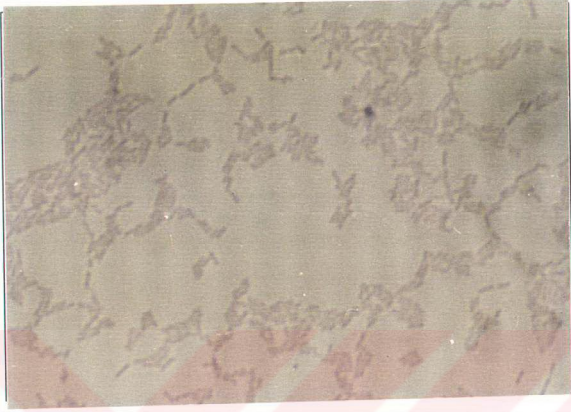
Şekil 3.17: Cu²⁺ Tuzlarının İnhibisyon Etkisi (Substrat : Manda Kazeini)



Şekil 3.18: Cu^{2+} Tuzlarının İnhibisyon Etkisi (Substrat :Koyun Kazeini)



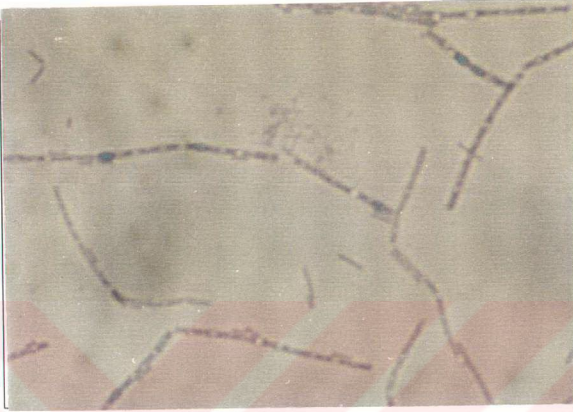
Şekil 3.19: Bakır Sülfatın İnhibisyon Etkisi (Substrat : Keçi Kazeini)



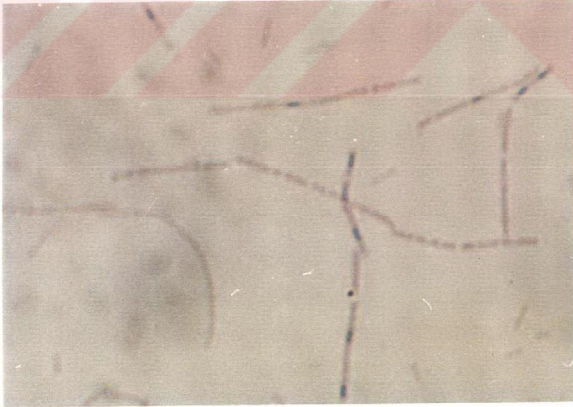
Şekil 3.20: Spor boyama sonucu *B. subtilis* kültürlerinin mikroskop altındaki görüntüsü (Kontrol;10. saat).



Şekil 3.21: 1 mM EMS ile etkileştirilen, spor boyası ile boyanmış *B. subtilis* kültürlerinin mikroskop altındaki görüntüsü (10. saat).



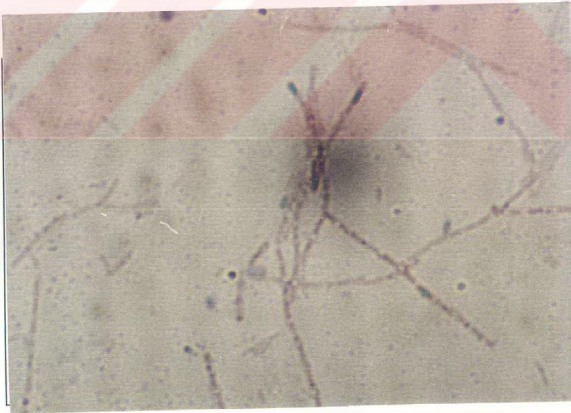
Şekil 3.22: Spor boyama sonucu *B. subtilis* kültürlerinin mikroskop altındaki görüntüsü (Kontrol; 15. saat).



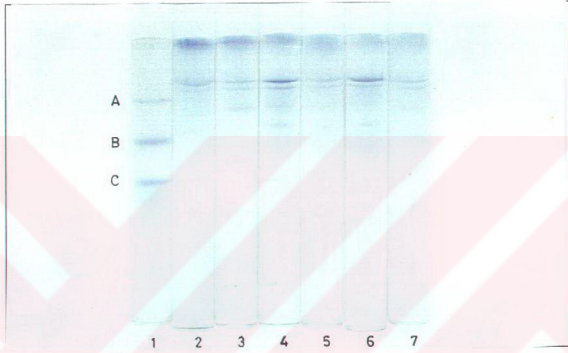
Şekil 3.23: 1 mM EMS ile etkileştirilen, spor boyası ile boyanmış *B. subtilis* kültürlerinin mikroskop altındaki görüntüsü (15. saat).



Şekil 3.24: Spor boyama sonucu *B. subtilis* kültürlerinin mikroskop altındaki görüntüsü (Kontrol; 20. saat).



Şekil 3.25: 1 mM EMS ile etkileştirilen, spor boyası ile boyanmış *B. subtilis* kültürlerinin mikroskop altındaki görüntüsü (20. saat).



Şekil 3.26: 10 Saatlik Öninkübasyondan Sonra 10, 15 Ve 20. Saatlerde Alınan Bakteri Üst Sıvısının Elektroferez Bant Profilleri

*1. Standart proteinler, 2. Kontrol (10. saat), 3. 1mM EMS' li üst sıvı (10. saat), 4. Kontrol (15. saat), 5. 1 mM EMS'li üst sıvı (15. saat), 6. Kontrol (20. saat), 7. 1 mM EMS' li (20. saat)

*Standart Proteinler: A. Albumin bovin (66 KDa), B. Albumin egg (45 KDa), C. Karbonik anhidraz (29 KDa).

Tablo 3.1: Farklı Kaynaklı Sütlerden Saflaştırılan Kazeinlere Bağlı Olarak Subtilizin İçin K_M Ve V_{max} Değerleri

Substratlar							
İnek Kazeini		Manda Kazeini		Keçi Kazeini		Koyun Kazeini	
$K_M \cdot 10^{-3}$	V_{max}	$K_M \cdot 10^{-3}$	V_{max}	$K_M \cdot 10^{-3}$	V_{max}	$K_M \cdot 10^{-3}$	V_{max}
4.05	1.124	4.22	1.379	4.45	1.366	8.18	2.347

Tablo 3.2: Kazein, Azokazein ve Azokol' e Bağlı Olarak Subtilizin İçin K_M Ve V_{max} Değerleri

Substratlar	$K_M \times 10^{-3}$	V_{max}
İnek kazeini	4,05	1,124
Azokol	35	7,87
Azokazein	40	9,09

Tablo 3.3: Farklı Kaynaklardan Saflaştırılan Kazeinlerin 1 Gramında Bulunan Ca^{2+} Ve $(PO_4)^{3-}$ İçerikleri

	$(PO_4)^{3-}$ ($gx10^{-2}$)	Ca^{2+} ($gx10^{-4}$)	$Ca^{2+} / (PO_4)^{3-} \times 10^2$
İnek	2,177	2,556	1,17
Manda	2,07	2,546	1,23
Keçi	2,00	2,536	1,27
Koyun	2,719	15,54	5,715

Tablo 3.4: Değişik Maddelerin İnkübasyon Ortamında Farklı Derişimlerde Bulunması Durumunda Hesaplanan K_M Ve V_{max} Değerleri

	Fenol		Tirozin		İnhibitörler Triptofan*		Sistein		EMS		
	Kontrol	1,5mM	2,5mM	7,5mM	15mM	0,2mM	0,3mM	7,5mM	15mM	1mM	5mM
$K_M \cdot 10^{-3}$	2,12	2,66	3,81	3,26	4,24	40,5	16,6	10,8	41,66	7,58	13,8
V_{max}	1,000	1,031	1,176	0,714	0,666	6,5	3,72	2,11	6,3	0,916	0,786

*Triptofanın inhibisyon etkisi incelendiğinde kontrol için $K_M = 6,04 \cdot 10^{-3}$ ve V_{max} 1,675 olarak hesaplandı.

Tablo 3.5: EMS' nin inkübasyon ortamında farklı derişimlerde bulunması durumunda tripsin için hesaplanan K_M , V_{max} değerleri

	Subtilizin		Tripsin	
	$K_M \times 10^{-3}$	V_{max}	$K_M \times 10^{-3}$	V_{max}
Kontrol	2,12	1,000	36	1,960
1 mM EMS	7,58	0,916	69	2,880
5 mM EMS	13,8	0,786	66	1,660

Tablo 3.6: Farklı kaynaklı sütlerden saflaştırılan kazeinler ile Cu^{2+} ve Hg^{2+} tuzlarının varlığına bağlı olarak subtilizin için K_M ve V_{\max} değerleri

	İnek Kazeini	Substratlar							
		Manda Kazeini		Keçi Kazeini		Koyun Kazeini			
		$K_M \cdot 10^{-3}$	V_{\max}	$K_M \cdot 10^{-3}$	V_{\max}	$K_M \cdot 10^{-3}$	V_{\max}	$K_M \cdot 10^{-3}$	V_{\max}
	Kontrol	4.05	1.124	4.22	1.379	4.45	1.366	8.18	2.347
HgCl_2	0.5mM	8.7	1.111	7.22	1.369	6.39	1.333	17.1	2.101
	1.0mM	13.3	1.111	12.1	1.351	12.9	1.333	35.0	2.0
$\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$	0.5mM	6.5	1.111	5.05	1.379	5.37	1.353	10.6	2.202
	1.0mM	7.2	1.111	6.37	1.335	7.52	1.333	15.6	2.283
	Kontrol	1.72	0.644	3.11	1.015	7.3	2.451	4.07	1.28
CuCl_2	10mM	2.64	0.643	4.09	1.005	---	-----	6.53	1.247
	15mM	3.67	0.624	5.62	1.025	---	-----	9.34	1.236
CuSO_4	10mM	2.01	0.625	9.0	1.010	12.4	2.469	5.15	1.262
	15mM	2.3	0.624	9.79	0.993	18.2	2.488	9.71	1.30

4. SONUÇLARIN TARTIŞILMASI

İnek, koyun, manda ve keçi sütlerinden saflaştırdığımız kazeinlerin subtilizin için substrat uygunluğu incelendiğinde Şekil 3.1 ve Tablo 3.1' de verilen K_M ve V_{max} değerleri inek sütünden saflaştırılan kazeinin diğerlerine nazaran daha uygun substrat olduğunu göstermiştir. Ulaşılan bu sonuçların, kullanılan kazeinlerin aminoasit bileşimlerinden kaynaklanabileceği düşünülmekle birlikte, bu sonuçlar ile, kullanılan kazeinlerin Ca^{2+} ve $(PO_4)^{3-}$ içerikleri arasında bir ilişki kurulmaya çalışıldı.

Tablo 3.3' de verilen kazeinlerin Ca^{2+} ve $(PO_4)^{3-}$ içeriklerine bakıldığında, diğerlerine nazaran $Ca^{2+}/(PO_4)^{3-}$ oranının inek kazeininde en düşük değere sahip olduğu görülmektedir. Bu oranın inek kazeinine kazandırdığı üçüncül yapının, enzim-substrat kompleksi oluşmasına daha elverişli olduğu kanısını uyandırmaktadır.

İnek sütünden saflaştırılan kazein substrat olarak kullanılıp, farklı pH ve sıcaklıklarda ölçülen aktivite değerleri sonucu Şekil 3.4 ve 3.5' ten anlaşılacağı gibi enzim için optimal pH' nın 10.0 ve optimal sıcaklığın 37 °C olduğu saptanmıştır. Saptanan, bağıl olarak yüksek sayılabilecek bu pH değeri kullanılan enzimin bir alkalın proteaz olduğunu göstermektedir.

Substrat olarak azokol ve azokazein kullanılarak yapılan aktivite tayinlerinde elde edilen ve Şekil 3.3 ve Tablo 3.2' de verilen sonuçlardan da anlaşılacağı gibi, kazein için bulunan K_M değerinin

azokol ve azokazein için bulunan K_M değerlerinden daha küçük olduğu ve dolayısıyla kazeinin enzim için bu iki substrattan daha iyi bir substrat olduğu kanısını uyandırmaktadır.

Farklı kaynaklardan saflaştırılan kazeinler ile ticari olarak temin edilen kazein (Sigma, C-5890)' in 50 mM fosfat tamponu (pH: 8.0) içindeki %0.2' lik çözeltilerinin elektroforez bant profilleri Şekil-3.2' de verilmiştir. Kabaca molekül yapıları ve molekül ağırlıkları itibarıyla, farklı kaynaklardan saflaştırılan kazeinlerin benzer olması, substrat uygunluğunu, $Ca^{2+}/(PO_4)^{3-}$ içeriğine dayandırmamız düşüncesini desteklemektedir.

Bu enzimlerin genellikle aromatik veya apolar aminoasitlerin katıldığı peptid bağlarını hidrolizlediği belirtilmiştir (75).

Bu verinin ışığında enzim-kazein inkübasyon ortamına uygun derişimlerde fenol, tirozin, triptofan, sistein ve EMS ilave ederek kinetikleri incelendi. Şekil 3.6-3.10' da ve Tablo 3.4' te verilen sonuçlar bu bileşiklerin yarışmalı inhibisyona yol açtıklarını göstermektedir.

Fenol, tirozin ve triptofanın subtilizin için birer yarışmalı inhibitör olmaları, enzimin substrat üzerindeki aromatik aminoasit artıklarının katıldığı peptid bağlarına etkidiği görüşünü desteklemektedir. Triptofanın çok düşük derişimlerinin (0.2-0.3 mM) kuvvetli bir inhibisyona neden olması, kullanılan diğer inhibitörlere nazaran, bu molekülün geometrisinin enzimin aktif merkezinin geometrisi ile daha çok benzerlik taşıdığını düşündürmektedir.

Glazer' de *B. subtilis* türlerinden saflaştırılan subtilizinin esterolitik aktivitesini sentetik substratlar kullanarak araştırırken indol,

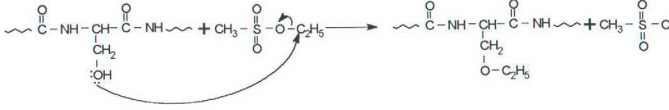
fenol gibi bazı aromatik bileşiklerin yarışmalı inhibisyona yol açtıklarını saptamıştır (76).

Diğer yandan Christison ve Martin *Cytophage'* den izole ettikleri subtilizinin, azokol kullanarak aktivitesini araştırırken, L-Cys' nin 5.10^{-4} M' lik derişiminin enzimi inhibe ettiğini göstermişlerdir (63). Yine Tsuru ve ark. 2.10^{-3} M Cys' nin *B. subtilis var. amylosacchariticus*'tan saflaştırdıkları alkalin proteazın aktivitesini etkilemediğini belirtmişlerdir (19).

Çalışmamızda Cys' nin yarışmalı bir inhibisyona neden olması, enzimin aktif merkezinde bulunan serinin alkol grubunun komşu histidin artıklarının imidazol halkası olarak bunlardan alkolat anyonu oluşturulmasını, Cys artığının sülfhidril grubu histidin artığının imidazol halkasını protonlayarak engellediği, dolayısıyla serinin nükleofilik gücünü azalttığı kanısını uyandırmaktadır. Nitekim Steitz ve arkadaşlarının X-ışınları ile yaptıkları çalışmalarda subtilizin BPN' nin aktif merkezindeki Ser 195 ile yakın çevresindeki His 57 arasında hidrojen köprüleri kurulduğunu göstermişlerdir(77). Ancak Cys' nin diğer şelatlaştırıcı sülfhidril bileşikleri gibi, kofaktör ya da aktivatör etkisine sahip metal iyonlarını uzaklaştırarak inhibisyona yolaçabileceği belirtilmiştir (63,19).

Klorometil keton gibi alkilleyici maddeler, kimotripsinin ve tripsinin aktif merkezlerini alkilleyerek inhibe ederken, subtilizine etkiledikleri bilinmektedir (78). Alkilleyici bir bileşik olarak düşünülebilen EMS' nin subtilizin ve tripsin için bir yarışmalı inhibitör

olması, bu bileşiğin etki mekanizmasının araştırılması için daha detaylı çalışmaların yapılmasını gerektirmektedir.



Farklı kaynaklardan saflaştırılan ekstraselüler enzimlerin aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonlarının etkisi incelenmiş ve elde edilen sonuçlar bu metal iyonlarının inhibisyon etkisinde bir düzen olmadığını ortaya koymuştur (19,62,63). Tsuru ve ark. *B. subtilis*' ten saflaştırdıkları alkalin proteazın (2400 U/mg, pH:10.5) aktivitesinin 1 mM HgCl₂ ile %20' ye, 1 mM CuSO₄ ile %97' ye, 1 mM Pb(CH₃COO)₂ ve AgNO₃ ile %95' e düştüğünü gösterirken, Christison ve Martin *Cytophage*' den (NRCC: 12089) saflaştırdıkları alkalin proteazın (25.28 U/mg, pH: 8.0), substrat olarak kazein kullanıldığında 2 mM Ca²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺ ve Fe²⁺ iyonlarının herbirinin varlığında aktivitenin değişmediğini, 2 mM Co²⁺ veya 2 mM Hg²⁺' nin aktiviteyi sırasıyla %21 ve %11' e düşürdüğünü saptamışlardır (19, 63).

Tobe ve ark. Bacillus türlerinden saflaştırdıkları alkalin proteazın (4500 U/OD₂₈₀, pH: 11) aktivitesinin yine substrat olarak kazein kullanıldığında 1 mM Li⁺, Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cd²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ ve Sr²⁺ gibi iyonların her birinin varlığında değişmediğini, 1 mM Cu²⁺, Zn²⁺ ve Hg²⁺ iyonlarının ise aktiviteyi sırasıyla %82, %67 ve %0' a düşürdüğünü belirlemişlerdir (62).

İnek, koyun, keçi ve manda sütlerinden saflaştırdığımız kazeinler substrat olarak kullanıldığında yapılan aktivite tayinlerinde metal iyonlarının inhibisyon etkisini belirlemek için $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, HgCl_2 , CuCl_2 ve CuSO_4 kullandık. Bu Hg^{2+} ve Cu^{2+} tuzlarının enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkileri Şekil 3.12-3.19' da, deneysel verilerden hesaplanan K_M ve V_{\max} değerleri Tablo 3.6' da verilmiştir.

Kullanılan bu tuzların her birinin, farklı kaynaklı her bir substrat koşulunda yarışmalı inhibitörler oldukları saptandı. 0.5 mM Hg^{2+} derişimi anlamlı bir inhibisyona neden olurken bu inhibisyon değerlerine ancak daha yüksek Cu^{2+} derişimleri ile ulaşılabilirdiği görüldü. Ham enzim ile Cu^{2+} tuzlarının inhibisyon etkisi incelendiğinde düzenli ve tekrarlanabilen sonuçlar elde edilemediğinden, bakır tuzlarının inhibisyon etkisi diyalizlenip liyofilize edilen enzim (33.88 U/mg) ile çalışıldı. Diyalizlenmiş enzimin spesifik aktivitesi ham enzimin spesifik aktivitesinin (9.7 U/mg) yaklaşık 3.5 katı olmasına rağmen, bakır tuzları ile anlamlı inhibisyon değerlerine ulaşmanın, ancak bakır tuzlarının derişiminin civa tuzlarının derişiminin 15-20 kat fazlasıyla mümkün olduğu saptandı. Bu sonucun Hg^{2+} ' nin Cu^{2+} ' ye nazaran daha yumuşak katyon olması, dolayısıyla enzim ile yaptığı kimyasal bağların kovalent karakterinin daha yüksek olmasıyla açıklanabileceği kanısındayız.

Grafiklerde de görüldüğü gibi $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, HgCl_2 ' ye nazaran daha düşük bir inhibisyona neden olurken, CuCl_2 ile CuSO_4 ' ün inhibisyon etkileri arasında düzenli bir derişim saptanamamıştır. Bu durum,

anyonların yük yoğunluğunun ve derişimlerinin bir fonksiyonu olarak enzimin iyon atmosferini farklı oranlarda değiştirmeleri ile açıklanabilir.

Kullanılan farklı kazeinler ile farklı inhibisyon değerlerine ulaşılması kazeinlerin aminoasit kompozisyonunun ve Ca^{2+} ve PO_4^{3-} içeriklerinin farklı olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir.

İto ve ark. *B. subtilis* sporlarından, asporojen suş elde etmek üzere EMS kullandıkları, Dancer ve ark. fenilmetan sülfonil florür (PMSF) ve diizopropil fosforflorür (DFP) gibi tersinmez proteaz inhibitörlerinin sporlaşmayı da inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Mutajen etkiye sahip EMS' nin hem subtilizin için hem de tripsin için yarışmalı inhibitör olduğunu saptamamız ve sporlaşma ile subtilizin salgılanması arasında bir ilişki olduğunu iddiası (66) bu maddenin sporlaşma üzerinde bir etkisi olup olmadığı sorusunu doğurdu. Diyarbakır' ın Çermik ilçesindeki termal kaplıca suyundan izole ettiğimiz (79) termotoleran *B. subtilis* kültürlerine 37 °C' deki inkübasyonun başlama anında, Spinzer besi yerindeki derişimi 1, 5, 50, 500 ve 1000 mM olacak şekilde EMS ilave ettik. 30, 60 ve 120 dakika sonra kültür ortamından alınan örneklerden spor boyama ile hazırlanan preparatların mikroskop altında incelenmesi sonucu spor oluşmadığı gözlemlendi. Daha sonra, Spinzer besi yerinde 37 °C' de 10 saat öninkübasyona tabi tutulan iki kültür ortamından biri kontrol olarak tutulurken diğerine derişimi 1 mM olacak şekilde EMS ilave edildi. EMS ilavesinden sonra 10. ve 15. saatlerde iki ayrı kültür ortamından hazırlanan preparatlar mikroskop altında incelendi. İlk inkübasyon anından 20 saat sonra EMS' li besi yerinde bol miktarda sporlaşmış

hücre görülürken EMS' siz kültürden hazırlanan preparatta spor görülmedi (Şekil 3.20, 3.21, 3.22, 3.23, 3.24, 3.25). 25 saat sonra ise hem kontrol hem de EMS' li preparatlarda spor oluşumu saptandı. Şekil 3.26'da da görüldüğü gibi kontroller ile EMS'li besiyerlerinin üst sıvılarında protein miktarları bakımından bir farklılık vardır. Elektroforeze eşit hacimlerde örnek verilmesine karşın kontrollerin protein içeriğinin daha fazla olduğu görülmektedir. Diğer yandan sporlaşma ile subtilizin salgılanması arasında var olduğu iddia edilen ilişkinin (66) aksine, EMS'li besiyerlerinde spor oluşumu (Şekil 3.21) görülmesine karşın, bu besiyerlerinin üst sıvılarının elektroforez band profilinde subtilizine karşılık gelen (26 000) band görülmemektedir.

Diğer yandan her preparat hazırlama zamanında sıvı besi yerinden alınan örneklerde enzim aktivite tayini yapıldı. EMS' li kültürlerde subtilizinin aktivitesinin (10. saatte 0.040 , 15. saatte 0.013 ve 20. saatte 0.033), kontrolden (10. saatte 0.053 , 15. saatte 0.028 ve 20. saatte 0.038) daha düşük olması, subtilizinin sporlaşma aşamasında salgılandığı iddiası ile çelişmektedir. Diğer yandan Mandelstam ve arkadaşlarının belirttiği proteaz inhibitörlerinin sporlaşmayı da inhibe ettiği iddiasıyla (64) da çelişmektedir. EMS' nin bu etkisini belki nükleik asitlerle olan etkileşmesinde aramak ve bu doğrultuda çalışmalar yapmayı gerektirmektedir.

KAYNAKLAR

1. Dellweg, H. (ed.); *Fifth International Fermentation Symposium Versuchs and Lehranstalt Für Spiritus Fabrikation und Fermentation Technologie*. Berlin (1976).
2. Gibson, T., Gordon, R.H.; In Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (ed.); *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8 th ed. 529, The William and Wilkins Co., Baltimore (1975).
3. Madeson, G.B., Norman, B.E., and Slott, S.; *Die Starke*, 25 : 304 (1973).
4. Boing, J.T.P.; *Industrial Microbiology*. 4 th ed. 634, Published by the Saybrook Press Inc., Connecticut (1982).
5. Hartley, B.S.; *Annual Review of Biochemistry*. 45, Annual Reviews, Inc., California (1960).
6. Higerd, T.B., Hoch, J.A., Spizzen, J.; *J. Bacteriology*, 112 : 1029 (1972).
7. Matsubara, H., and Feder, J.; In P.D. Boyer (ed). *The Enzymes*, Vol.3, 721, Academic Press Inc., New york (1971).
8. Keay, L., Feder, J., Garnett, L.R., Moseley, M.H., and Cirulis, N.; *Biochim. Biophys. Acta*. 299 : 829 (1971).
9. Millet, J., Acher, R., and Aubert, J.P.; *Biotechnol. Bioeng.* 11 : 1233(1969).
10. Keay, L., Wildi, B.S.; *Biotechnol. Bioeng.* 12 :179 (1970).
11. Li, Y., and Yousten, A.A.; *Apl. Microbiol.* 30 : 352 (1976).
12. Hageman, J.H., Carlton, B.C.; *Arch. Biochem. Biophysics*. 139 : 67 (1970).
13. Walsh, K.A., Wilcox, P.E.; *Methods In Enzymology*. Ed. by Perlman, G.E., Lorand, L., 31-39. Academic Press, New York and London (1970).
14. Linderstrom-Lang, K., and Ottesen, M.; *Nature*, 159 : 807 (1947).
15. Güntelberg, A.V., and Ottesen, M.; *Nature*, 170 : 802 (1952).

16. Güntelberg, A.V., and Ottesen, M.; *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, Ser. Chim. 29 : 36 (1954).
17. Hagihara, B., Matsubara, H., Nakai, M., Okunuki, K.; *J. Biochem.* (Tokyo) 45 : 185 (1958).
18. Ottesen, M., Spector, A.; *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*. 32 : 63 (1960).
19. Tsuru, D., Kira, H., Yamamoto, T., and Fukumoto, J.; *Agr. Biol. Chem.* (Tokyo) 30(12) : 1261 (1966).
20. Matsubara, H., Hagihara, B., Nakai, M., Komaki, T., Yonetani, T., and Okunuki, K.; *J. Biochem.* (Tokyo) 45 : 251 (1958).
21. Matsubara, H., Nishimura, S.; *J. Biochem.* (Tokyo) 45 : 503 (1958).
22. Olaitan, S.A., DeLange, R.J., Smith, E.L.; *J. of Biol. Chem.*, 243 : 5296 (1968).
23. Welker, N.E., and Campbell, L.L.; *J. Bacteriol.* 94 : 1124 (1967).
24. Ottesen, M., Schellman, C.G.; *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*. Ser. Chim. 30 :157 (1957).
25. Matsubara, H., Kasper, C.B., Braun, D.M., Smith, E.L.; *J. of Biol. Chem.*, 240 : 1125 (1965).
26. Matsubara, H., Nishimura, S.; *J. Biochem.* (Tokyo) 45 : 413 (1958).
27. Hund, J.A., and Ottesen, M.; *Biochem. Biophys. Acta*, 48 : 411 (1961).
28. Tsuru, D., Kira, H., Yamamoto, T. and Fukumoto, J.; *Agr. Biol. Chem.* (Tokyo) 31 : 330 (1967).
29. Kasper, C.B., and Smith, E.L.; *J. of Biol. Chem.*, 241 : 3754 (1966).
30. Markland, F.S., Kreil, G., Ribadeau-Dumas, B., and Smith, E.L.; *J. of Biol. Chem.*, 241 : 4642 (1966).
31. Markland, F.S., Ribadeau-Dumas, B., Smith, E.L.; *J. of Biol. Chem.*, 242 : 5174 (1967).
32. Smith, E.L., Markland, F.S., Kasper, C.B., DeLange, R.J., Landon, M., and Evans, W.H.; *J. of Biol. Chem.*, 241 : 5974 (1966).
33. DeLange, R.J., and Smith, E.L.; *J. of Biol. Chem.*, 243 : 2134 (1968).
34. DeLange, R.J., and Smith, E.L.; *J. of Biol. Chem.*, 243 : 2143 (1968).

35. Landon, M., Evans, W.H., and Smith, E.L.; *J. of Biol. Chem.*, 243 : 2165 (1968).
36. Evans, W.H., Landon, M., and Smith, E.L.; *J. of Biol. Chem.*, 243 : 2172 (1968).
37. Smith, E.L., DeLange, R.J., Evans, W.H., Landon, M., and Markland, F.S.; *J. of Biol. Chem.*, 243 : 2184 (1968).
38. Matsubara, H.; *J. Biochem.* (Tokyo) 46 : 107 (1959).
39. Sanger, F., and Shaw, D.C.; *Nature*, 187 : 872 (1960).
40. Dixon, G.H., Kauffman, D.L., and Neurath, H.; *J. Am.Chem.Soc.*, 80 : 1260 (1958).
41. Gladner, J.A., and Laki, K.; *J. Am.Chem.Soc.*, 80 : 1263 (1958).
42. Oosterbaan, R.A., and Cohen, J.A.; *In "Structure and Activity of Enzyme "* (Goodwin, T.W., Harris, J.I., and Hartley, B.S., (eds.), 87, New York (1964).
43. Noller, H.F., Bernhard, S.A.; *Biochemistry*, 4 : 1118 (1965).
44. Markland, F.S., Shaw, E., Smith, L.; *Proc. Natl. Acad. Sci.,U.S.*, 61 : 1440 (1968).
45. Okunuki, K., Matsubara, H., Nishimura, S., and Hagihara, B.; *J. Biochem.* (Tokyo) 43 : 857 (1956).
46. Hagihara, B., Nakai, M., Matsubara, H., Komaki, T., Yonetani, T., and Okunuki, K.; *J. Biochem.* (Tokyo) 45 : 305 (1958).
47. Barel, A.O., Glazer, A.N.; *J. of Biol. Chem.*, 243 : 1344 (1968).
48. Glazer, A.N.; *J. of Biol. Chem.*, 242 : 433 (1967).
49. Morihara, K.; *Biochem. Biophys. Res. Com.* , 26 : 656 (1967).
50. Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Farnell, H.M., Harwalker, V.R., Jenness, R., Whitney, R.McL; *Dairy Sci.* 67 : 1599 (1984).
51. Graham, E.R.B., McKenzie, H.A., Murphy, W.H.; *Comp. Biochem. Physiol.* Vol.104B, No.4 : 747 (1993).
52. Linderstrom-Lang, K., Kodama, S.; *Cr. Trav. Lab. Carlsberg*, 16 : 1 (1925).
53. McKeekin, T.L.; *Chemistry and Molecular Biology* (Edited by McKenzie, H. A.) Vol.I, 3-15, Academic Press, New York (1970).
54. Von Hippel, P.H., Waugh, D.F.; *J. Am. Chem. Soc.*, 77 : 4311 (1955).

55. Frings, ByE., Holtz, C., Kunz, B.; *Milchwissenschaft.*, 8(3) : 130 (1993).
56. Cheryan, M., Richardson, T., Olson, N.F.; *J. Dairy Sci.*, 58 : 651 (1975).
57. Chavira, JR.R., Burnet, T.J., Hageman, J.H.; *Analytical Biochemistry*, 136 : 446 (1984).
58. Tomarelli, R.M., Jesse Charney, M.S., Mary Lord Harding, M.N.; *Miniature Meeting of The Philadelphia Section of The American Chemical Society*, Dec. 1. (1948).
59. Boyer, W.H., Carlton, B.C.; *Arch. Biochem. Biophys.* 128 : 442 (1968).
60. Glazer, A.N.; *J. Biol. Chem.*, 242 : 4528 (1967).
61. Glazer, A.N.; *J. Biol. Chem.*, 243 : 3693 (1968).
62. Tobe, S., Takami, T., Hirose, Y., Mitsugi, K.; *Agr. Biol. Chem.* 39 (9) : 1749 (1975).
63. Christison, J., Martin, S.M.; *Can. Microbiol.* 17 : 207 (1971).
64. Mandelstam, J., and Waites, W.M.; *J. Biochem.* 109 : 793 (1968).
65. Ito, J., Spizizen, J.; *Mutation Research*, 13 : 93 (1971).
66. Dancer, B.N., Mandelstam, J.; *J. of Bacteriology*, Vol.121, No.2, 406 (1975).
67. Fraiss, F.; *Practical Biochemistry-Laboratory Manuals*, 52. University Park Press, Baltimore (1972).
68. Fraiss, F.; *Practical Biochemistry-Laboratory Manuals*, 6. University Park Press, Baltimore (1972).
69. Quinlan, K.P., Desesa, M.A.; *Anal. Chem.* 27 : 1626 (1955).
70. Weber, K., Osborn, M.J.; *Biol. Chem.* 244 : 404 (1969).
71. Anson, M.L.; *Gen. Physiol.* 22 : 79 (1938).
72. Leighton, T.J., Doi, R.H.; *J. Mol. Biol.* 76 : 103 (1973).
73. Prestidge, L., Gage, V., Spizizen, J.; *J. of Bacteriology*, ol.107, No.3, 815 (1971).
74. Donaghy, J.A., McKay, A.M.; *J. of Applied Bacteriology*, 4 : 662 (1993).
75. Morihara, K., Tsuzuki, H.; *Acta Biochem. Biophys.* 129 : 620 (1969).

76. Glazer, A.N.; *J. Biol. Chem.* 10 : 433 (1967).
77. Steitz, T.A., Henderson, R., and Blow, D.M.; *J. Mol. Biol.* 46 : 337 (1969).
78. Show, E., Ruscica, J.; *J. Biol. Chem.* 243 : 6312 (1968).
79. Aytekin, Ç., Kızıl, M., Kaya, Z., Akdağ, Z., Ensari, Y., Balci, K.; *Tr J. of Biology*, 18 : 77 (1994).

EKLER

EK.1

1.1. 0.2 M Fosfat Tamponu:

30 mL 0.2 M sodyum hidroksit üzerine 50 mL 0.2 M sodyum dihidrojen fosfat katıldıktan sonra hacim saf su ile 100 mL' ye seyreltilir.

1.2. 50 mM Fosfat Tamponu (pH: 8.0):

47 mL 50 mM sodyum hidroksit üzerine 50 mL 50 mM sodyum dihidrojen fosfat katılır ve hacim saf su ile 100 mL' ye getirilir.

1.3. 0.2 M Tris-HCl Tamponu (pH: 8.0):

29 mL 0.2 M hidroklorik asit üzerine 50 mL 0.2 M tris katılarak hacim 100 mL' ye seyreltilir.

pH: 9.0: 6 mL 0.2 M hidroklorik asit üzerine 50 mL 0.2 M tris ilave edildikten sonra hacim saf su ile 100 mL' ye tamamlanır.

1.4. Karbonat-Bikarbonat Tamponu:

pH: 9.5: 73 mL 0.2 M sodyum bikarbonat

pH: 10: 49 mL 0.2 M sodyum bikarbonat

pH: 10.5: 18 mL 0.2 M sodyum bikarbonat

pH: 11.0: 5.5 mL 0.2 M sodyum bikarbonat

çözeltilerinin hacminin 0.2 M sodyum karbonat ile 100 mL' ye tamamlanmasıyla hazırlanır.

EK.2. Folin Reaktifinin Hazırlanması

500 mL' lik balona 100 gr $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 gr $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 mL %85' lik H_3PO_4 , 100 mL derişik HCl ve 700 mL saf su bırakıldıktan sonra çözelti 10 saat süreyle yavaş bir şekilde geri soğutucu altında kaynatılır. 150 gr Li_2SO_4 , 50 mL saf su ve bir kaç

damla Br_2 ilave edilir. Bromun aşırısını tutmak için soğutucusuz olarak 15 dakika kaynatılıp soğutulur. Hacim daha sonra 1000 mL' ye tamamlanır.

EK.3. Elektroforez Çözeltileri

3.1. A Tamponu:

$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	38.6 gr
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	8.8 gr
SDS	2 gr

Hacim saf su ile 1000 mL' ye tamamlanır.

3.2. B Çözeltisi:

Akrilamid	5.5 gr
N-N'-metilen bisakrilamid	0.15 gr
Saf su	25 mL

3.3. C Çözeltisi:

Amonyum persülfat	375 mg
Saf su	25 mL

3.4. D Tamponu:

A tamponunun 1:1 oranında saf su ile seyreltilmesi sonucu hazırlandı.

3.5. Jel Çözeltisi:

A tamponu	15 mL
B çözeltisi	13.5 mL
C çözeltisi	1.5 mL
TEMED	45 μ L

3.6. Boyama Çözeltisi:

Commasie Brilliant Blue R-250	125 mg
%50 metanol	45.4 mL
Glasiyel asetik asit	4.6 mL

3.7. Boya Çıkarma Çözeltisi:

Glasiyel asetik asit	75 mL
%50 metanol	50 mL
Saf su	875 mL

EK.4. Spinzer Besi Yeri:

K_2HPO_4	14 gr
KH_2PO_4	6 gr
$(NH_4)_2SO_4$	2gr
$MgSO_4$	0.2 gr
Glukoz *	5 gr

* Besi yeri 15 dakika 1.5 atmosferde otoklavla steril edildikten sonra glukoz katıldı.

EK.5. Spor Boyama

5.1. Müzereli Spor Boyası:

Boraks	5 gr
Metilen mavisi	2 gr
Saf su	100 mL

Süzgeç kağıdı ile süzildükten sonra kullanıldı.

5.2. Eozin Çözeltisi:

Eozin	1 gr
Saf su	100 mL

Süzgeç kağıdı ile süzildükten sonra kullanıldı.

ÖZGEÇMİŞ

1967 Diyarbakır doğumluyum. Üniversite öğrenimimi 1985-1989 yılları arasında Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde tamamladım. 1989 yılında D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisansa başladım. "**Mikrodalganın *Staphylococcus simulans* ve *Bacillus coagulans* Üzerine Etkisinin Elektroforetik olarak İncelenmesi**" konulu Yüksek Lisans çalışmamı 1991 yılında Doç.Dr. Çetin AYTEKİN danışmanlığında tamamladım. 1992 yılında D.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. 1992 yılında başladığım Doktora çalışmamın konusunu "**Subtilizin Kinetiği Ve Etilmetan Sülfonatin Sporlaşma Üzerine Etkisi**" oluşturmaktadır. Halen aynı yerde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.

