

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***BACILLUS SUBTILIS* VE *BACILLUS CEREUS*
BAKTERİLERİNDEN PROTEAZ ENZİMİNİN KİSMİ
SAFLAŞTIRILMASI VE ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kim. Müh. Elif ORHAN**

Anabilim Dalı : KİMYA MÜHENDİSLİĞİ

Programı : KİMYA MÜHENDİSLİĞİ

MAYIS 2003

***BACILLUS SUBTILIS* VE *BACILLUS CEREUS*
BAKTERİLERİNDEN PROTEAZ ENZİMİNİN KİSMİ
SAFLAŞTIRILMASI VE ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kim. Müh. Elif ORHAN
(506001113)**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 5 Mayıs 2003
Tezin Savunulduğu Tarih : 30 Mayıs 2003**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Yüksel AVCIBAŞI GÜVENİLİR
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Bülent GÜRLER (İ.Ü.)
Doç. Dr. Melek TÜTER (İ.T.Ü.)**

MAYIS 2003

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimin başlangıcından sonlandırılmasına kadar her türlü bilgi ve desteğini esirgmeden beni yönlendiren çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Yüksel AVCIBAŞI GÜVENİLİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Bülent GÜRLER'e ve Dr. Habibe ERDENİZ'e yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Sayın Yrd. Doç. Dr. Hakan BERMEK'e yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarımı birlikte yürüttüğüm, çok büyük yardımını ve desteğini gördüğüm sevgili arkadaşım Kim. Müh. Ayşe GERZE'ye, aynı laboratuvarı paylaştığım ve önerilerinden yararlandığım değerli arkadaşım Kim. Müh. Sevda KARAKAŞ'a çok teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim süresince ilgi ve yardımlarını gördüğüm arkadaşlarım Yük. Kimyager Emel ERGÜN, Kim. Müh. Cem AKDERE ve Zekai AYSAN'a teşekkür ederim. Tez çalışmam sırasında yardımlarından dolayı Şenel KARANCI'ya teşekkür ederim. Yardımlarından dolayı Kim. Müh. Hale ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Ayrıca tüm öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Mayıs 2003

Elif Orhan

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	vii
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
ÖZET	x
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. ENZİMLER	4
2.1. Enzimlerin Tarihçesi	4
2.2. Enzimlerin Yapısı	5
2.3. Enzim Mekanizması	6
2.3.1. Aktif Merkez (Aktif Site)	6
2.3.2. Anahtar-Kilit Modeli	7
2.3.2.1. Enzim Substrat Etkileşimleri	8
2.4. Enzimlerin Sınıflandırılması	8
2.5. Enzimlerin Kalitesinin Değerlendirilmesi	9
2.5.1. Spesifik Aktivite	10
2.5.2. Protein Tayinleri	10
2.5.2.1. UV Absorpsiyonu Yöntemi	10
2.5.2.2. Biuret Yöntemi	10
2.5.2.3. Lowry Yöntemi	11
2.5.2.4. Protein Boya Bağlama Yöntemi	11
2.5.2.5. Kjeldahl Analizi	11
2.5.3. Kirletici Faktörler	11
2.5.4. Kararlılık	11
2.6. Enzim İzolasyon Kaynakları	12
2.6.1. Hayvansal Kaynaklar	12

2.6.2. Bitkisel Kaynaklar	12
2.6.3. Mikroorganizmalar	12
3. PROTEAZ ENZİMİ VE ÖZELLİKLERİ	13
3.1. Proteazın Yapısı ve İşlevi	13
3.2. Proteazların Sınıflandırılması	14
3.2.1. Serin Proteazlar	14
3.2.2. Sistein Proteazlar	16
3.2.3. Metallo Proteazlar (Çinko Proteazlar)	17
3.2.4. Aspartil (Asit) Proteazlar	18
3.3. Mikrobiyal Proteaz Enziminin Kullanım Alanları	19
3.3.1. Deterjan Sanayi	20
3.3.2. Deri Sanayi	21
3.3.2.1. Islatma	22
3.3.2.2. Kıldan Arındırma ve Yünden Arındırma	22
3.3.2.3. Ayırma	23
3.3.3. Peynir Yapımı	23
3.3.4. Bira Yapımı	24
3.3.5. Fırıncılık (Ekmek Yapımı)	24
3.3.6. Tekstil Sanayi	24
3.3.7. Klinik Uygulamalar	25
3.3.8. Kozmetik ve İlaç Sanayi	25
3.4. Proteaz Enziminin Karakterizasyonu	25
3.4.1. Proteaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi	25
3.4.2. Proteazın Aktivitesine Etki Eden Faktörler	25
3.4.2.1. pH Etkisi	25
3.4.2.2. Sıcaklık Etkisi	26
3.4.2.3. İnhibitörler	26
3.4.2.4. Aktivatörler	27
3.5. Bakteriye Kaynaklı Proteaz Enzimi Eldesi İçin Yapılan Çalışmalar	27
4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	31
4.1. Malzeme ve Metot	31
4.1.1. Malzeme	31
4.1.1.1. Cihazlar	32
4.1.1.2. Tamponlar ve Çözeltiler	33

4.1.2. Metot	35
4.1.2.1. Santrifüjleme	35
4.1.2.2. Çöktürme	36
4.1.2.3. Diyaliz	36
4.1.2.4. İyon Değişirme Kromatografisi	36
4.1.2.5. SDS-PAGE	37
4.2. <i>Bacillus subtilis</i> ve <i>Bacillus cereus</i> Bakterilerinin Özellikleri	38
4.3. <i>Bacillus subtilis</i> ve <i>Bacillus cereus</i> Bakterilerinden Proteazın Kısmi Saflaştırılması	39
4.3.1. Besiyeri Hazırlanması ve Bakterilerin Üretilmesi	39
4.3.1.1. Besiyeri Hazırlanması	39
4.3.1.2. Bakterilerin Üretilmesi	40
4.3.2. Santrifüjleme	40
4.3.3. Amonyum Sülfat ($(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$) Çöktürmesi	40
4.3.4. Diyaliz	41
4.3.5. İyon Değişirme Kromatografisi	42
4.4. Aktivite ve Protein Tayini	42
4.4.1. Aktivite Tayini	42
4.4.2. Protein Tayini	44
4.5. <i>Bacillus subtilis</i> Bakteri Türü İle Yapılan Çalışma	46
4.5.1. Çalışma 1	46
4.5.2. Çalışma 2	48
4.5.3. Çalışma 3	53
4.5.4. Çalışma 4	62
4.6. <i>Bacillus cereus</i> Bakteri Türü İle Yapılan Çalışma	64
4.7. <i>Bacillus subtilis</i> ve <i>Bacillus cereus</i> Bakteri Türlerinden Elde Edilen Proteaz Enziminin Bazı Özelliklerinin İncelenmesi	67
4.7.1. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	67
4.7.1.1. Optimum Sıcaklık	67
4.7.1.2. Sıcaklık Kararlılığı	69
4.7.2. Enzim Aktivitesi Üzerine pH Etkisi	72
4.7.2.1. Optimum pH	72
4.7.2.2. pH Kararlılığı	75

4.7.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonu ve Reaksiyon Zamanının Etkisi	78
4.7.4. İlk Hız Deneyi	79
4.7.5. Proteaz Enziminin İnhibisyonu ve Aktivasyonu	81
4.7.5.1. Aktivatör Etkisinin İncelenmesi	82
4.7.5.2. İnhibitör Etkisinin İncelenmesi	83
4.7.6. SDS-PAGE ile Molekül Ağırlığı Tayini	84
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	87
KAYNAKLAR	92
EKLER	94
ÖZGEÇMİŞ	97

KISALTMALAR

DEAE	: Dietil amino etil
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez
kDa	: Kilo dalton
U	: Ünite
EDTA	: Etilendiamintetra asetik asit
NTA	: Nitrilotriasetik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
APS	: Amonyum persülfat
TEMED	: N,N, N', N'-tetrametil etilen diamin
BCA	: 2,2-Biçinölil 4,4-dikarbonik asit
BSA	: Bovin serum albümin
M. A.	: Molekül ağırlığı

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.1.	Spesifik Aktivite-Zaman Değerleri (Çalışma 1).....	47
Tablo 4.2.	Spesifik Aktivite-Zaman Değerleri (Çalışma 2).....	50
Tablo 4.3.	<i>Bacillus subtilis</i> Bakteri Türünden Proteazın Kısmi Saflaştırılması (Çalışma 2)	51
Tablo 4.4.	<i>Bacillus subtilis</i> Bakteri Türünden Proteazın Kısmi Saflaştırılması (Çalışma 3).....	56
Tablo 4.5.	İyon Değiştirme Kromatografisi Değerleri (Kolon 1 Değerleri)...	57
Tablo 4.6.	İyon Değiştirme Kromatografisi Değerleri (Kolon 2 Değerleri)...	59
Tablo 4.7.	İyon Değiştirme Kromatografisi Değerleri (Kolon 1 Değerleri)...	61
Tablo 4.8.	Tris-HCl ve NaOH-Boraks Tamponları ile Yapılan Aktivite Tayinlerinin Karşılaştırılması (<i>Bacillus subtilis</i>).....	63
Tablo 4.9.	<i>Bacillus subtilis</i> Bakteri Türünden Proteazın Kısmi Saflaştırılması (Çalışma 4).....	64
Tablo 4.10.	Tris-HCl ve NaOH-Boraks Tamponları ile Yapılan Aktivite Tayinlerinin Karşılaştırılması (<i>Bacillus cereus</i>)	65
Tablo 4.11.	<i>Bacillus cereus</i> Bakteri Türünden Proteazın Kısmi Saflaştırılması	66
Tablo 4.12.	Optimum Sıcaklık (<i>Bacillus subtilis</i> Çalışması).....	68
Tablo 4.13.	Optimum Sıcaklık (<i>Bacillus cereus</i> Çalışması).....	68
Tablo 4.14.	Sıcaklık Kararlılığı (<i>Bacillus subtilis</i> Çalışması).....	70
Tablo 4.15.	Sıcaklık Kararlılığı (<i>Bacillus cereus</i> Çalışması).....	71
Tablo 4.16.	Optimum pH (<i>Bacillus subtilis</i> Çalışması).....	73
Tablo 4.17.	Optimum pH (<i>Bacillus cereus</i> Çalışması).....	74
Tablo 4.18.	pH Kararlılığı (<i>Bacillus subtilis</i> Çalışması).....	76
Tablo 4.19.	pH Kararlılığı (<i>Bacillus cereus</i> Çalışması).....	77
Tablo 4.20.	Substrat Konsantrasyonu ve Reaksiyon Zamanının Etkisi (<i>Bacillus subtilis</i>).....	78
Tablo 4.21.	Substrat Konsantrasyonu ve Reaksiyon Zamanının Etkisi (<i>Bacillus cereus</i>).....	79
Tablo 4.22.	Substrat Konsantrasyonu Değişimi ile İlk Hız Değerleri (<i>Bacillus subtilis</i>).....	80
Tablo 4.23.	Substrat Konsantrasyonu Değişimi ile İlk Hız Değerleri (<i>Bacillus cereus</i>)	81
Tablo 4.24.	Aktivatör Etkisi (<i>Bacillus subtilis</i> Çalışması).....	82
Tablo 4.25.	Aktivatör Etkisi (<i>Bacillus cereus</i> Çalışması).....	83
Tablo 4.26.	İnhibitör Etkisi (<i>Bacillus subtilis</i> Çalışması).....	84
Tablo 4.27.	İnhibitör Etkisi (<i>Bacillus cereus</i> Çalışması).....	84

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. : Enzim-Substrat Kompleksinin Oluşum ve Ayrışma Mekanizması	7
Şekil 3.1. : α -Kimotripsin Mekanizması.....	16
Şekil 3.2. : Papain Mekanizması.....	17
Şekil 4.1. : <i>Bacillus subtilis</i> ve <i>Bacillus cereus</i> Bakterilerinden Proteazın Saflaştırma İşlemleri.....	45
Şekil 4.2. : Spesifik Aktivite-Zaman Eğrisi (Çalışma 1).....	48
Şekil 4.3. : Spesifik Aktivite-Zaman Eğrisi (Çalışma 2).....	53
Şekil 4.4. : İyon Değişirme Kromatografisi (Kolon 1).....	58
Şekil 4.5. : İyon Değişirme Kromatografisi (Kolon 2).....	60
Şekil 4.6. : İyon Değişirme Kromatografisi (Kolon 3).....	62
Şekil 4.7. : Optimum Sıcaklık (<i>Bacillus subtilis</i>).....	69
Şekil 4.8. : Optimum Sıcaklık (<i>Bacillus cereus</i>).....	69
Şekil 4.9. : Sıcaklık Kararlılığı (<i>Bacillus subtilis</i>).....	71
Şekil 4.10. : Sıcaklık Kararlılığı (<i>Bacillus cereus</i>).....	72
Şekil 4.11. : Optimum pH (<i>Bacillus subtilis</i>).....	73
Şekil 4.12. : Optimum pH (<i>Bacillus cereus</i>).....	74
Şekil 4.13. : pH Kararlılığı (<i>Bacillus subtilis</i>).....	76
Şekil 4.14. : pH Kararlılığı (<i>Bacillus cereus</i>).....	77
Şekil 4.15. : Substrat Konsantrasyonu-İlk Hız Grafiği (<i>Bacillus subtilis</i>).....	80
Şekil 4.16. : Substrat Konsantrasyonu-İlk Hız Grafiği (<i>Bacillus cereus</i>).....	81
Şekil 4.17. : SDS-PAGE ile Molekül Ağırlığı Tayini.....	86
Şekil A.1. : Trosin Standart Eğrisi.....	94
Şekil A.2. : BSA Standart Eğrisi (280 nm).....	95
Şekil A.3. : BSA Standart Eğrisi (BCA yöntemi).....	96

BACILLUS SUBTILIS VE BACILLUS CEREUS BAKTERİLERİNDEN PROTEAZ ENZİMİNİN KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI VE ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Enzimler organizmada meydana gelen kimyasal reaksiyonların hızlarını arttıran biyolojik katalizörlerdir. Enzimler molekül ağırlıkları onbin ile bir milyon arasında değişen protein yapılı bileşiklerdir.

Yüksek aktivite için kıyasladığımızda enzimler, kimyasal katalizörlere göre daha avantajlıdır. Ayrıca enzim prosesleri için uygun olan 25-30°C'lik sıcaklık bir çok klasik kimyasal prosesler için gerekli olan yüksek veya düşük sıcaklıktan daha ekonomiktir.

Enzimlerin gerçek özellikleri yakın zamanda bilinmesine rağmen, enzimler uzun yıllardan beri kullanılmaktadırlar ve bilimsel araştırmada, klinik tanı ve endüstride büyük önemleri vardır.

Proteaz enzimi, canlılardaki hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen en önemli proteinlerden biridir. Proteazlar polipeptid ve protein zincirlerini hidrolizleyen enzimlerdir. Proteazlar proteini polipeptid zincirlerindeki amid bağlarını hidrolizleyerek parçalarlar. Proteazlar hayvan organları, bakteri, maya, ve bitkiler gibi geniş bir canlı yelpazesinde üretilirler.

Proteaz enzimi, endüstride geniş şekilde (deterjan, deri, bira sanayi, fırıncılık v.b.) kullanılmaktadır. Endüstride kullanılan proteaz enzimlerinin büyük bir kısmı bakteri kaynaklıdır. Özellikle *Bacillus* türlerinden üretilen proteaz enzimleri deterjan endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* bakteri türlerinden proteaz enziminin izolasyonu, saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi olarak belirlenmiştir.

Proteaz enzimi, *Bacillus* türü bakterilerin uygun besi yerlerinde üretilmesi, sporlandırılması daha sonra santrifüjlenerek bakterilerin uzaklaştırılması ile elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen süpernatanta, sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, DEAE-Selüloz iyon değiştirme kromatografisi işlemleri uygulanarak saflaştırma yapılmıştır.

Çalışmada aynı zamanda elde edilen enzimin, optimum pH, optimum sıcaklık, pH kararlılığı, sıcaklık kararlılığı, enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonu, reaksiyon süresi, inhibitör ve aktivatör etkisi incelenmiştir. Ayrıca elde edilen enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE işlemi yapılarak tayin edilmiştir.

Bacillus subtilis türü ile yapılan çalışmada süpernatantın spesifik aktivitesi 11 U/mg, doyurma sonrası çöktürmenin spesifik aktivitesi 6 U/mg, diyaliz sonrası 10 U/mg ve DEAE-Selüloz iyon değiştirme kolon kromatografisi sonrası spesifik aktivitesi 84 U/mg'dır. Kolon sonrası 8 kat saflaştırma sağlanmıştır. *Bacillus subtilis* türünden elde

edilmiş proteazın spesifik aktivitesi 84 U/mg olarak ölçülmüştür. Yapılan çalışmada saf proteazın spesifik aktivitesi ile elde edilen proteazın spesifik aktivitesi aynı bulunmuştur. Yapılan SDS-PAGE sonucunda elde edilen enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 45 kDa olarak bulunmuştur.

Bacillus cereus bakteri türü ile yapılan çalışmada süpernatantın spesifik aktivitesi 12 U/mg, doyurma sonrası çökeltinin spesifik aktivitesi 14 U/mg'dır. Doyurma sonrası 1.2 kat saflaşma sağlanmıştır. Yapılan SDS-PAGE sonucunda elde edilen enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 37 kDa olarak bulunmuştur.

PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEASE FROM *BACILLUS SUBTILIS* AND *BACILLUS CEREUS* BACTERIA

SUMMARY

Enzymes are biological catalysts that increase the speed of chemical reactions taking place in the organism. Enzymes are the compounds with protein structure of which molecular weights vary between ten thousand and a million.

When we compare for the high activity, enzymes are more advantageous than the chemical catalysts. Besides, 25-30°C temperature which is suitable for enzyme processes is more economic than high or low temperatures that are necessary for many chemical processes.

Despite the fact the real properties of the enzymes have been known only recently, Enzymes have been used for long years and they have considerable importance in scientific research, clinic diagnosis and industry.

Protease enzyme is one of the most important proteins catalysing the hydrolysis reactions in living beings. Enzymes are the things that hydrolyse the chains of Proteases polypeptide and protein. Proteases pull the protein into the parts by hydrolysing the amide bonds that are in the polypeptide chains. Proteases are produced in a very wide living beings scale such as animals, bacteria, yeast, and plants.

Protease enzyme is widely used in industry (detergent, leather, beer industry, bakery etc.). A considerable part of protease enzymes used in the industry is originated from bacteria. Especially protease enzymes that are produced from *Bacillus* species are widely used detergent industry.

The purpose of this study was determined as isolation, purification and investigation of some properties of protease enzyme from *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* bacteria species.

Protease enzyme is obtained by producing spore genesis of bacteria, which is from *Bacillus* species in suitable food places, and removing the bacteria afterwards being centrifuged. The purification was realized by applying respectively ammonium sulphate precipitation, dialyse, DEAE-Cellulose ion exchange chromatography to the supernatant that was produced later.

In the study at the same time, the affect of substrate concentration, reaction time, inhibitor and activator on the optimum pH, optimum temperature, pH stability, temperature stability, enzyme activity of the obtained enzyme.

Besides, molecular weight of the obtained enzyme was determined by realization of transaction of SDS-PAGE .

In the study carried out with *Bacillus subtilis* species, specific activity of supernatant is 11 U/mg, specific activity of the precipitate after precipitation is 6 U/mg, after dialysis it is 10 U/mg and specific activity is 84 U/mg after DEAE–Cellulose ion

exchange column chromatography. After column 8 folds purification was obtained. Specific activity of the protease obtained from *Bacillus subtilis* is measured as 84 U/mg. In the conducted study, pure specific activity of the protease and obtained specific activity of the protease were found to be the same. Molecular weight of the enzyme obtained as a result of conducted SDS-PAGE is found to be approximately 45 kDa.

In the study carried out with *Bacillus cereus* bacteria species, specific activity of supernatant is 12 U/mg, specific activity of the precipitate after precipitation is 14 U/mg. after precipitation 1.2 fold purification was obtained. Molecular weight of the enzyme obtained as a result of conducted SDS-PAGE is found to be approximately 37 kDa.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Enzimler basit ve bileşik proteinlerdir ve canlı organizmaların kimyasal reaksiyonlarında hayati önem taşırlar. Enzimler de diğer katalizörler gibi reaksiyon hızlarını arttırmırlar. Enzimler çok etkin katalizörlerdir. Benzer koşullar altında, enzim varlığındaki reaksiyon oranı, katalizörün yokluğundaki reaksiyon oranına göre bir veya birkaç milyon kat daha yüksek olabilir [1]. Örneğin vücutta karbonik asidin sentezi karbonik asit anhidraz enziminin katalize edilir. Karbonik asidin CO_2 ve H_2O katalize edilmemiş bozunumu yavaştır ve reaksiyonun dengeye ulaşması saatler sürebilir. Şayet karbonik asit anhidraz kullanılırsa reaksiyon dengeye bir dakika hatta daha kısa sürede ulaşır [2].

Enzimlerin faaliyetleri binlerce yıldır bilinmektedir. Bununla birlikte, enzimlerin özelliklerinin tam olarak anlaşılması ancak son zamanlarda olmuştur. Enzimler hakkında yapılan araştırmalar, protein kimyası, moleküler biyofizik ve moleküler biyoloji alanlarındaki fikirlerin birleşimi ile yeni bir aşamaya girmiştir [3]. Binlerce enzim tanımlanmış ve bunların çoğu kristallendirilmiştir. En önemlisi de 1926 yılında Sumner'ın üreaz enzimini kristallendirerek enzimin, basit bir protein olduğunu ilan etmesidir. Bu nedenle proteinler, biyolojik sistemlerde kimyasal dönüşümlerin kinetiğini belirlemede rol oynar [3,4].

Enzimlerin izolasyonu için ham maddeler, hayvan organları, bitkisel materyaller ve mikroorganizmalardır. Enzimler evrensel olarak canlı organizmalarda bulunurlar. Her bir hücre, kendi metabolik reaksiyonlarını sürdürmek için bir çok farklı enzim sentezler. Enzim saflaştırılması için prosedürlerin seçimi, enzimlerin kullanım yerlerine bağlıdır. Hücre içi enzimlerin izolasyonu genel olarak kompleks biyolojik karışımların ayrılması şeklinde gerçekleşir.

Diğer taraftan hücre dışı enzimler genel olarak, sadece birkaç bileşen içeren bir ortama konurlar. Enzimlerin katalizör olarak sahip oldukları yüksek spesifiklik özellikleri sadece onların doğal durumlarında mevcuttur. Bu doğal oluşuma sadece

belirli pH, sıcaklık ve iyon şiddetinde ulaşılır. Bu durumda, enzim izolasyonları için sadece bazı spesifik yöntemlerden yararlanılabilir [3].

Geçtiğimiz 15 yıl boyunca, ticari olarak faydalı enzimlerin keşfedilmesi ve bu enzimlerin gelişme koşullarındaki değişimlerle verimini arttırmak , bitkilerde ve hayvanlarda patojen süreçlerdeki bu enzimlerin rolleri hakkında bilgi sahibi olmak ve hücre dışı enzimlerin protein sentezlerindeki etkileri üzerinde çalışmak için önemli avantajlar sunan, mikroorganizmaların geniş bir yelpazesi tarafından üretilen hücre dışı enzimlerin araştırılmasına önemli çabalar harcanmıştır.

Farklı türlerden veya sınıflardan olan benzer işlevli enzimler arasındaki farklılıklar enzimlerin ticari kullanımları için çok önemlidir. Ayırıcı spesifikliğe sahip olan yetmişin üzerinde enzim, mikrobik gelişmenin hücre dışı ürünleri olarak tarif edilmektedir. Göreceli olarak bunlardan pek azı, spesifikliğinin kesin belirlenmesine izin verecek kadar yeterli derecede saflaştırılmıştır. Bir çok sanayi uygulaması için bu önemli değildir . Enzimler veya geniş spesifiklikteki karmaları, genel olarak, dar spesifikliğe sahip olan enzimlere göre daha çok tercih edilebilir olmaktadır [5].

Proteolitik enzimler, proteaz veya proteinazlar, proteinlerin peptid bağlarını uygun koşullar altında özel olarak hidrolize eden enzimlerdir. Tüm proteazlar pH, sıcaklık, iyon gereklilikleri, spesifiklikleri, aktiviteleri ve kararlılıkları yönünden karakteristik özelliklere sahiptirler. Bu biyokimyasal parametreler, proteazın kullanım alanını belirler. Bireysel uygulamalar için enzimlerin dünya çapındaki gereklilikleri, büyük ölçüde değişiklik gösterir.

Ticari enzimlerin saflık dereceleri uygulamaya bağlı olarak değişir. Enzimlerde uygulanan saflaştırma işlemlerine göre yüksek aktivite ve saflık elde edilebilir. Saflaştırma işlemleri arttıkça maliyet artar. Endüstride kullanılan proteaz enzimleri, onlarca tona kadar büyük miktarlarda üretilmektedir ancak düşük birim fiyatları vardır çünkü saflık dereceleri daha azdır. Tıbbi proteazlar için pazar, ton yönünden küçüktür ancak yüksek saflıkta oldukları için birim aktivitesi başına fiyatları çok yüksektir [3].

Bu çalışmanın amacı, proteaz enziminin *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* bakteri türlerinden izolasyonu, kısmi saflaştırılması ve sonrasında bazı özelliklerinin incelenmesidir.

Dünyadaki enzim üretiminin en az dörtte birini oluşturan, proteazlar endüstride kullanılan en önemli enzim gruplarından biridir. Proteazlar deterjan, deri, süt ürünleri, bira ve gıda endüstrilerinde kullanılır. Endüstriyel alanda en çok kullanıma sahip olan proteazlar, bakterilerden elde edilen proteazlardır. *Bacillus* türlerinin sporlarından izole edilen serin proteazlar deterjan endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [6].

Bu çalışmada endüstride kullanım alanının yaygınlığı ve ekonomik olması nedeniyle, enzim kaynağı olarak bakteriler kullanılmıştır.

2. ENZİMLER

2.1. Enzimlerin Tarihçesi

Enzim deyimi (literatürde maya) ilk olarak KÜHNE tarafından 1876 tarihinde ortaya atılmıştır. Maya, fermentasyondaki önemi ile araştırmaların gözde konusuydu. O yıllarda LIEBIG ve PASTEUR'ün fermentasyon olayının yaşayan hücrelerden bağımsız düşünülemeyeceğini vurgulamışlardır. 1783 yılında SPALLANZALİ, mide suyunun suni oluşturulmuş bir halde eti sindirebileceğini ortaya koydu ve 1836 yılında SCHWANN aktif madde pepsini isimlendirdi. Varlığından 19. yüzyıldan beri şüphenilen tripsine şimdiki adını KÜHNE vermiştir . 20. yüzyılın başında, enzimlerin protein özellikleri ortaya konmuştu. Proteinlerin kimyasının bilinmesi, 19. yüzyılın ikinci yarısında organik kimya teknik ve kavramları üzerinde önemli etkiler yarattı. Bu olay protein yapısının peptid kuramına yol açtı bu da FISCHER tarafından ortaya atılmıştır. Proteinlerin sentezi için uygulanan yöntemler enzimlerin saflaştırılmasına eşit değildi. Buna karşı, WILLSTATTER, enzimlerin proteinler olmadığını ancak “aktif prostatik grupta” kollodimsi taşıyıcılar olduğunu ileri sürdü. Ancak, 1930 yılında pepsin ile başlayarak, kristal proteolitik enzimlerin serilerini izole etmiş olan NORTHROP ve meslektaşları tarafından yapılan kesinleştirici çalışma ile enzimlerin protein yapıları ortaya konmuş oldu.

Hücre içi enzimlerin izolasyonu ve karakterize edilmesi, doğal olarak daha karmaşık idi ve bir kez daha, bu tür enzimin makul miktarlarda mevcut olmasından önce, 1940'lı yılların sonlarında, proteinlere uygulanabilen ayırma tekniklerinde önemli iyileştirmelere gerek vardı. Erişilebilen başlatma malzemesinin büyük miktarları ve fermentasyon deneylerinin tarihi önemi nedeniyle, ilk saf hücre içi enzimleri, mayadan ve iskelet kasından elde edildi. Bununla birlikte saflaştırma yöntemleri iyileştirildikçe, saf halde elde edilen enzimlerin sayısı artmaya devam etmiştir. Protein saflaştırma yöntemleri bugün öylesine karmaşıktır ki, eğer kaynak zayıf ise sadece küçük miktarlar elde edilebilir, ancak yeterli çaba ile, her türlü istenen enzim tamamen saf hale getirilebilir.

Enzimlerin protein özelliği kabul edildikten sonra, bunların oluşumu ve yapılarının daha kesin analizi için yol açtı. Amino asitlerin çoğu, 20. yüzyıl başlarında tanımlanmıştı. Özgül ağırlık ölçüm analizi veya mikro biyolojik deneme gibi, daha sonra mevcut olan aminoasit analiz yöntemleri oldukça kesindi ancak çok yavaştı ve büyük miktarlarda malzemeye gereksinim duyulmaktaydı. İlk otomatikleştirilen amino asit analiz makinesinin tanımında 1958 yılında en yüksek tanımına ulaşmış olan amino asitlerin iyon değişim kromatografisi üzerine MOORE ve STEIN çalışması ile atılım gerçekleştirildi. Çağdaş makineler bir analiz için gerekli olan zamanı 1 saatin altına ve gerekli olan protein miktarını da 1 µg altına düşürdü.

Günümüzde protein zincir analizlerinin yöntemleri öylesine iyi gelişmiştir ki herhangi bir polipeptid zincirinin aminoasit sırasının belirlenmesi için zaman veya maliyetin dışında hiçbir engel yoktur [3].

2.2. Enzimlerin Yapısı

Enzimlerin bir kısmı basit proteinlerdir, bunların katalitik aktivite gösteren kısmı polipeptid zinciridir. Pepsin, tripsin ve üreaz enzimleri bu çeşit enzimlere örnektir. Diğer bir kısım enzimler ise bileşik proteinlerdir. Yapılarında protein kısmına ek olarak, protein olmayan **kofaktör** denilen küçük molekülü bir grup daha bulunur. Kofaktör, proteine sıkı bir şekilde bağlı ve disosiyasyon olmuyorsa **prostatik grup**, gevşek bir şekilde bağlı olup disosiyasyon olabiliyorsa **koenzim** adını alır [7].

Kofaktör denilen ve protein olmayan birimin olmaması durumunda enzimlerin çoğunun katalitik aktiviteleri kaybolur. Bu durumdaki bir enzimin aktif olmayan birimine **apoenzim**, kofaktörü içeren aktif enzime **haloenzim** denir [8]. Kofaktör organik yapılı ise **koenzim**, metal iyonu ise **aktivatör veya anorganik kofaktör** olarak adlandırılır. Aktivatör etkisi gösteren metal iyonları, krom, kobalt, bakır, mangan, iyot, molibden ve çinkodur [7]. Metal iyonları bazı durumlarda aktif enzim ile çok sıkı bir şekilde bağlanmaz ve kolay bir şekilde uzaklaştırılabilir. Diğer durumlarda metal iyonları enzim yapısı ile bütünleşmiş parçalar olup izolasyon ve saflaştırma işlemleri boyunca yapıda kalırlar. Metal iyonları insan vücudundaki enzimler için çok önemli olup aynı zamanda sağlık açısından gereklidirler [9].

Enzimlerin koenzim kısmı protein kısmına göre daha dayanıklıdır. Bazı koenzimler nükleotid yapılıdır, niasinamid-adenin di nükleotid, niasinamid-adenin di nükleotid

fosfat bunlara örnektir. Bazı koenzimler ve prostetik gruplar B grubu vitaminlerinden biriyle beraber bulunurlar, örneğin α -keto asitleri dekarboksile eden enzimlerin koenzimi, tiaminpirofosfat ve transaminazların koenzimi pidoksal fosfattır.

Enzimin etki ettiği maddeye substrat denir. Koenzim veya prostetik grup enzimin etki edeceği kimyasal reaksiyonu, apoenzim ise hangi substrata etki edeceğini tayin eder. Örneğin koenzimi niasinamid-adenin di nükleotid olan enzimler dehidrojenleme reaksiyonlarını kataliz ederler, hidrojenin hangi substrattan ayrılacağını apoenzim belirler [7].

2.3. Enzim Mekanizması

2.3.1. Aktif Merkez (Aktif Site)

Tüm enzimler proteindir ancak tüm proteinler enzim değildir. Aradaki fark, enzimlerin katalitik aktivitesinin olmasıdır. Katalitik aktiviteden sorumlu olan enzim yapısının parçası, enzimin “aktif sitesi” olarak adlandırılmaktadır ve genel olarak enzimin toplam hacminin sadece % 10-20’sini oluşturmaktadır [10].

Enzimin aktif merkezi, substratı veya varsa prostetik grubu bağlayan ve bağ oluşumunda ya da ayrılmasında direkt olarak rol oynayan katalitik gruplara katkıda bulunan bölgedir.

Bir enzimin aktif merkezi bir nokta, bir hat veya bir düzlem şeklindedir. Lineer aminoasit sırasının farklı bölgelerinden gelen gruplardan oluşmuş üç boyutlu karışık bir yapıdır [9]. Aktif merkez, enzim reaksiyonunu yerine getiren aminoasit yan zincirlerinin bir sırasını içeren hidrofil yarığıdır. Enzim aktif merkezi, enzim reaksiyonlarında katalizörlüğe yardımcı olan bir veya daha fazla kofaktörü bağlar [10].

Bir substratın enzimlerin aktif merkezine uyumlu bir yapıda olması gerekir. Protein substratın özgül bir kısmının aktif bölgeye uyması peptid bağının hidrolizi ile sonuçlanır. Aktif bölgenin substrata yüzde yüz uyması halinde anahtar kilit modeli meydana gelir. Daha genel olarak substratın bağlanması aktif bölgede konformasyon değişikliğine neden olur ve enzim substratı bağlayabilir hale gelir [2].

2.3.2. Anahtar-Kilit Modeli

Emil Fisher'in 1890 yılında tanımladığı anahtar kilit modelinin, katalizörlerin incelenmesinde oldukça doğru ve verimli bir yol olduğu ispatlanmıştır. Bu modele göre enzim (kilit), substrat (anahtar) tamamlayıcı şekillere sahiptirler ve birbirlerine uyarlar. Enzim katalizinde ilk ve en kritik basamakta, enzim ve substrat, enzim-substrat kompleksi (ES) olarak adlandırılan aktive olmuş kompleksi oluşturmak üzere birleşirler ve koenzim substratı aktive eder. Bu kompleks, bir ya da daha fazla ürünün ortaya çıktığı ve sonrasında enzimin rejenere edildiği bir enzim-ürün kompleksini (EP) oluşturmak üzere aşağıda gösterilen reaksiyonlara göre bir kimyasal değişime uğrar [9].

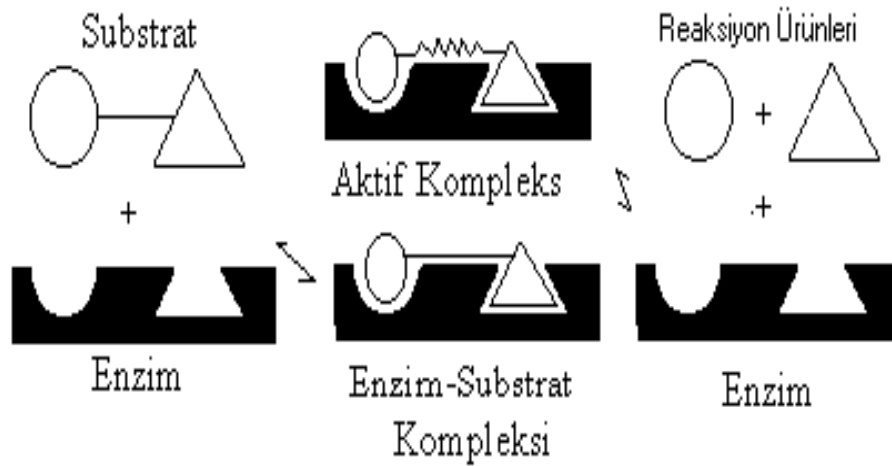


(Enzim) (Substrat) (Enzim-Substrat Kompleksi)



(Enzim Ürün Kompleksi) (Enzim) (Ürün)

Anahtar kilit modeline göre 'ES' kompleksinin oluşum ve ayrışma mekanizması Şekil.2.1 de görülmektedir [7].



Şekil 2.1. 'ES' Kompleksinin Oluşum ve Ayrışma Mekanizması

2.3.2.1. Enzim Substrat Etkileşimleri

Enzim katalizörlüğünün önemli özelliklerinden bir tanesi, yüksek spesifik kovalent olmayan enzim substrat bağlama etkileşimlerinin nedeniyle meydana gelen, onun yüksek substrat seçiciliğidir. Bununla birlikte enzim ve substrat arasında gerçek kovalent bağlarda oluşabilir. Aşağıda enzimler tarafından yararlanılmakta olan enzim-substrat etkileşimlerinin dört tipi verilmektedir [10].

1. Elektrostatik etkileşimler : pH 7 ve civarında sulu çözeltiler içinde yüklü olan iyonize edilebilen fonksiyonel grupları içeren substratlar, enzim aktif merkezindeki zıt yüklü aminoasit yan zincirlerine, elektrostatik etkileşimler yoluyla bağlanmaktadır.

2. Hidrojen bağlama : Hidrojen bağları, elektronların tek bir çiftini içeren bir hidrojen bağı vericisi ile bir asidik hidrojen içeren bir hidrojen bağı alıcısı arasında oluşturulabilir. Bu etkileşimler polar substrat fonksiyonel gruplarının bağlanması için geniş ölçüde kullanılmaktadır. Hidrojen bağının gücü, etkileşen grupların kimyasal yapısı ve geometrik hizalanmasına bağlıdır.

3. Polar olmayan (Van der Waals) etkileşimler : Van der Waals etkileşimleri, substrat ve aktif merkez arasındaki atomlar arası temaslardan meydana gelmektedir. Aktif merkez şekli genel olarak, substratın şekline büyük oranda tamamlayıcı olduğundan dolayı, Van der Waals etkileşimlerinin miktarı, her bir tek etkileşimin çok zayıf olmasına rağmen (6-8 kJ/mol), oldukça önemli olabilir.

4. Hidrofobik etkileşimler: Eğer substrat bir hidrofobik grup veya yüzey içeriyorsa ve bu enzim aktif merkezinin hidrofobik tarafına bağlandıysa, uygun bağlama etkileşimleri gerçekleşebilir. Bu hidrofobik etkileşimler, sulu çözelti içinde kalmaktansa polar olmayan çözücü içine toplanma ve biriktirmek için hidrofobik organik moleküllerin eğilimleri yönünden göz önüne serilebilirler. Bu toplama ve biriktirme süreçleri, enerji olarak, hidrofobik moleküller tarafından başka türlü bozulacak olan su hidrojen bağı arası şebekelerinin maksimizasyonu nedeniyle, uygundur.

2.4. Enzimlerin Sınıflandırılması

Bilinen enzimlerin sayısının hızla artması nedeniyle enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması için sistematik bir yola ihtiyaç duyulmuştur. Uluslararası Biyokimya

Birliği tarafından kurulan bir komisyon, yeni bir sınıflandırma sistemi geliştirmiştir [8]. Buna göre enzimler sistematik olarak etki ettikleri reaksiyon tipine göre altı sınıfa ve her sınıf alt sınıflara ayrılmıştır.

1. Oksidoredüktazlar : Biyolojik redoks reaksiyonlarını kataliz eden enzimlerdir. Bu enzimler CH-OH, CH-NH₂, C=O, C=CH grupları üzerine etki ederler ve etki ettikleri gruplara göre alt sınıflara ayrılırlar.

2. Transferazlar : Bazı grupların bir bileşik molekülünden diğereine geçmesine kataliz eden enzimlerdir. Bu enzimler metil, formil, hidroksimetil, açıl, glikozil, fosfat, amil ve kükürtlü grupların yer değiştirme reaksiyonlarını hızlandırır ve aktarılan gruba göre metiltransferaz, aminotransferaz gibi alt sınıflara ayrılırlar.

3. Hidrolazlar : Ester, glikozil, eter, peptid, asit, anhidrit C-C, C-Halojen, ve P-N bağlarına etki ederek bu bileşiklerin hidroliz reaksiyonlarını kataliz ederler ve etki ettikleri bağ tipine göre alt sınıflara ayrılırlar. Alt grupları aşağıdaki gibidir.

- **Proteazlar (Proteolitik Enzimler) :** Polipeptid ve protein zincirlerinin hidrolizlerini katalizlerler.

- Esterazlar ve Lipazlar : Ester ve lipidleri alkole hidroliz ederler.

- Amidazlar : Çeşitli amid ve peptid bağlarını hidrolizlerler.

- Karbohidrazlar : şekerler ya da şekerlerle alkoller arasındaki glikozit bağlarını hidrolizlerler.

- Fosfatazlar : Fosforik asit – ester ve anhidritlerini hidroliz ederler.

4. Liyazlar : Bir organik bileşikteki C-C, C-O, C-S ve C-Halojen bağlarının ayrılmasını kataliz eden enzimlerdir.

5. İzomerazlar : Molekül içi çevrilmeleri, rasemizasyon, epimerizasyon ve cis – trans izomerizasyon reaksiyonlarını kataliz eden enzimlerdir.

6. Ligazlar : İki molekülün yeni C-O, C-N, C-S, C-C bağları oluşturarak birleşmesini (kondenzasyon reaksiyonlarını) kataliz eden enzimlerdir [7,9].

2.5. Enzimlerin Kalitesinin Değerlendirilmesi

Enzim kalitesi, aktivite, saflık, kararlılık, formülasyon ve ambalajlama ile karakterize edilir. Bu parametreler birbirlerine bağlıdırlar ancak formülasyon ve ambalajlamanın

kontrol edilmesi ve sabit tutulması kolaydır. Diğer parametreler, birbirlerini etkilerler bu yüzden kalite; aktivite, saflık ve kararlılığın bir fonksiyonu olarak düşünülür.

2.5.1. Spesifik Aktivite

Bir enzimin en önemli kalite kıstası onun spesifik aktivitesi, yani, onun protein içeriği ile ilgili olan katalizör aktivitesidir. Spesifik aktivite genel olarak, miligramdaki ünite (ünite/mg) olarak veya daha az saf ürünler için gram başına ünite (ünite/gram) olarak ifade edilir [3]. Preparatın katalitik aktivitesi, substrat konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve benzeri şartlar altında substratın harcanma hızı veya ürünün oluşma hızının belirlendiği uygun bir deney prosedürü ile belirlenir. Aktivite ünitesi μmol cinsinden dakikada harcanan substrat veya oluşan ürün ya da mol cinsinden saniyede harcanan substrat veya oluşan ürün (SI sisteminde Katal) olarak ifade edilir [11].

Spesifik aktivite verileri, aynı kaynaktan yüksek şekilde saflaştırılmış olan bir enziminki ile karşılaştırılarak doğru şekilde değerlendirilebilir. Bu sebepten, katalitik aktivite ve protein tayinleri benzer koşullar altında ölçülmek zorundadır.

2.5.2. Protein Tayinleri

Protein içeriği, bir enzimin spesifik aktivitesinin tayini için en önemli referans noktası olduğundan dolayı, protein tayininin birkaç yönteminden, aşağıdaki paragraflarda kısaca bahsedilmektedir. Tüm bu prosedürlerin tamamı farklı ilkelere dayalıdır ve enzim proteinlerinin aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır.

2.5.2.1. UV Absorpsiyonu Yöntemi

Aromatik aminoasitleri içermeleri nedeniyle proteinler, 270-280 nm'de maksimum bir absorpsiyon gösterirler. Bir çok saf protein için, referans değerleri, 10 mg/ml içeren bir çözeltinin 280 nm'deki absorbansındaki referans değerleri için belirlenmiştir. Daha fazla kesinlik için, absorbans aynı zamanda daha kısa dalga boylarında (235 nm gibi) da ölçülür.

2.5.2.2. Biuret Yöntemi

Bir alkali çözeltisi içinde bakır iyonları ile peptid bağlarının reaksiyonu, fotometrik olarak belirlenebilen mor renkli bir kompleks ortaya çıkarır. Renkteki yoğunluk, protein konsantrasyonun lineer bir fonksiyonudur.

2.5.2.3. Lowry Yöntemi

Bu metod Folin Ciocaltea fenol ajanının (fosfomolibdik-fosfotungistik asit) tirozin ve triptotan tortuları tarafından indirgenmesi ile proteinlerin biuret reaksiyonunun birleşmesinden oluşur. İndirgeme bakır protein kompleksi ile sağlanır. Bu yöntem çok hassastır ve bir çok bileşenden etkilenir. Yöntem, bu sorunların üstesinden gelmek, absorbans ve protein içeriği arasındaki lineer ilişkiyi elde etmek için değiştirilmiştir.

2.5.2.4. Protein Boya Bağlama Yöntemi

Boya kullanımı ile protein konsantrasyonlarını saptamak esasına dayanan bir yöntem olan ve BRADFORD tarafından yayınlanan protein boya bağlama yöntemi, günümüzde öne çıkmıştır. Bu metod, Coomassie Parlak Mavi G 250 boyasının proteini bağlaması ile oluşturduğu maksimum absorbansın 465-595 nm arası değişimine dayalıdır.

2.5.2.5. Kjeldahl Analizi

Renge dayalı teknikler oluşturulmadan önce, ampirik bir etken kullanılmasıyla azot içeriğinden, protein konsantrasyonunun hesaplanmasıyla oluşan bir yöntemdir.

2.5.3. Kirletici Faktörler

Kirletici faktörlerin, yani orijinal malzemenin içinde diğer enzimlerin varlığı, enzimler için çok önemli bir kalite kıstasıdır. Bu genel olarak ana enzimin aktivitesi ile ilişkilidir ve yüzde olarak ifade edilir. Mutlak tutar genel olarak çok küçük olduğu için, protein ağırlığı (mg olarak) halinde ifade edilemez ve böylece enzim preparatının bütünsel spesifik aktivitesini etkilemez. Bir enzimin özel uygulama alanlarında, kesinlikle farklı safsızlıklar tanımlanmalıdır.

2.5.4. Kararlılık

Enzim uygulamalarındaki önemli diğer bir faktör de enzimlerin derişik ya da seyreltik formdaki ve diğer maddelerle karıştıktan sonraki kararlılıklarıdır. Kararlılık, enzimatik analizler ya da gıda kimyası, deterjan sanayi ve farmasotik amaçlar için kullanılan ürünlerin üretilmesi açısından da büyük önem taşır. Çoğu enzim, çeşitli tuzlar ve koruyucular eklenerek daha uzun süre kararlı halde saklanabilirler. Ayrıca analitik amaçlar için kullanılacak enzimler +4°C’de saklanır [3].

2.6. Enzim İzolasyon Kaynakları

Enzimlerin izolasyonu için ham maddeler hayvan organları, bitki malzemeleri ve mikroorganizmalardır. Enzimler, evrensel olarak canlı organizmalar içindedir. Her bir hücre, kendi metabolik reaksiyonlarını sürdürmek üzere bir çok farklı enzim sentezler. Hücre içi enzimlerin izolasyonu genel olarak kompleks biyolojik karışımların ayrılmasını içine alır. Diğer taraftan hücre dışı enzimler genel olarak, diğer bazı bileşenlerle beraber ortama konulurlar.

2.6.1. Hayvansal Kaynaklar

Hayvan organları, enzim aktivitesinin korunması için, düşük ısıli bir ortamda taşınmak ve muhafaza edilmek zorundadır. Organlar dondurulmadan önce, yağdan ve bağlantı dokularından arındırılmış olmalıdır. Donmuş organlar, genel olarak et sanayinde kullanılan makinelerle kıyılabilir ve enzimler bir tampon çözelti ile çıkarılabilir. Ayrıca mekanik öğütme ve enzim sindirimi de kullanılabilir. Organlara bağlı olan yağ, sonraki saflaştırma adımlarında organik çözücüler ile ortadan kaldırılabilir. Ancak, enzim aktivitesi, bu uygulamadan olumsuz olarak etkilenebilir bu yüzden yağlar daha önceden ayrılmalıdır.

2.6.2. Bitkisel Kaynaklar

Bitki malzemesi, çeşitli ezici veya öğütücülerle elde edilebilir ve istenen enzimler tampon çözeltilerle ortaya çıkarılabilir. Hücreler aynı zamanda litik enzimlerle önceden işleme bozulabilir.

2.6.3. Mikroorganizmalar

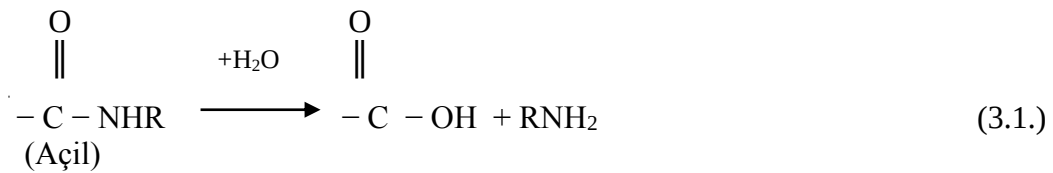
Mikroorganizmalar, enzimlerin önemli bir kaynağıdır. Genetik ve protein mühendisliği kapsamında geliştirilmiş yeni tekniklerin, enzim sanayisine katkısı büyüktür. Bir gen, ilgili organizmanın, doğal olarak onun üretmediği bir proteini üretmesini sağlamak üzere, bir mikroorganizmaya transfer edilebilir. Ya da, bir mikroorganizma geninin modifikasyonu proteinlerin daha kolay izole edilebileceği ve saflaştırılabileceği şekilde proteinlerin özelliklerini değiştirebilir. Bu tür değişiklikler, hücre içi enzimlerin malzemeye karışmasına neden olabilir, net yükü değiştirir ve bundan dolayı, proteinlerin kromatografik özellikleri değişir veya birleştirilmiş proteinlerin oluşumuna neden olabilir [3].

3. PROTEAZ ENZİMİ VE ÖZELLİKLERİ

3.1. Proteazın Yapısı ve İşlevi

Enzim sınıflandırılmasında hidrolaz grubunda yer alan proteazlar, proteinlerin peptid bağlarını uygun koşullar altında özel olarak hidrolize eden enzimlerdir. Proteazlar bunu, polipeptid zincirlerinde bulunan amid bağlarını hidrolizleyerek gerçekleştirirler. Proteazlar aynı zamanda proteinaz ve peptidazlar olarak da bilinirler. Proteazlar alınan besinlerdeki proteini parçalamakta kullanıldıkları için tüm hayvanların sindirim sistemlerinde çok önemli bir role sahiptirler. Aynı zamanda mide ve pankreasta büyük miktarlar halinde üretilmektedirler. Proteazların farklı tipleri, hidrolitik amaçların geniş bir çeşitliliği için vücudun her yerinde üretilmektedir. Önemli olarak, kan sıvılaştırma akışlarını ayarlama ve bağışıklık sisteminin faal hale getirilmesinde de kullanılırlar. Tüm canlılar proteaz enzimine ihtiyaç duyarlar bu yüzden proteaz enzimi bakteri, maya ve bitkiler tarafından da üretilmektedir.

Proteazların reaksiyonlarında bazı ortak özellikler vardır. Bu reaksiyonların hepsinde polipeptid zincirinden bir parça koparılır ve suyun OH grubuna transfer edilir. Bu genellikle bir açıl grubudur. Reaksiyon aşağıdaki gibidir. Proteazlar, polipeptid zincirlerini iki farklı bölgeden koparabilirler. Zinciri ucundan koparma olayına “ekzo ayırma”, ortasından ayırma olayına da “endo ayırma” denir [10].



Diğer enzimler gibi, proteazlar da protein yapısındadırlar. Tüm proteazlar pH, sıcaklık, iyon gereklilikleri, spesiflik, aktivite ve kararlılık yönünden karakteristik özelliklere sahiptirler. Bu özellikler hidroliz edilecek olan peptid bağında bulunan

aminoasitlere bağılıdır. Bu biyokimyasal parametreler, bir proteazın uygulanma alanını belirler [3].

3.2. Proteazların Sınıflandırılması

Proteazlar, kaynaklarına (hayvan organları, bitki, mikroorganizma), katalitik aktivitelerine (endo peptidaz veya ekzo peptidaz) ve aktif sitelerinin yapısına göre (serin, sistein, aspartil, metallo) sınıflandırılırlar. Enzim terminolojisi ile ilgili olarak EC (Avrupa Birliği Komitesi) sisteminde, tüm proteazlar (veya hidrolazlar), ekzo peptidazlar ve endo peptidazlar olarak bölünmüştür.

Endo peptidazların dört ana sınıfı: serin proteazlar, sistein proteazlar, aspartil proteazlar ve metallo proteazlardır. İsimlerinden de anlaşılacağı gibi, serin, sistein ve aspartil proteazlar, katalitik sitenin önemli bir parçası olarak sırasıyla serin, sistein ve aspartil asit yan zincirlerine sahiptir. Bu yan zincirin değişimi veya bloke edilmesi genel olarak enzimin tam olarak inaktif hale gelmesine neden olur ve mikroorganizmaların yeni bir soyu tarafından üretilen bilinmeyen bir proteazın yapısının belirlenmesinin standart bir yoludur.

Ekzo peptidazlar her zaman bulunabilirler ancak ticari ürün olarak daha az mevcuttur. Çünkü bunlardan bir çoğu hücre içidir. Katalitik sitenin yapısına göre karboksi peptidazlar, serin karboksi peptidazlar, metallo karboksi peptidazlar ve sistein karboksi peptidazlar olarak ayrılırlar. Bir çok ticari proteazlar, özellikle de mantarlardan olanlar, karboksi peptidaz faaliyetinin önemli bir miktarını içerirler. Ekzo peptidaz alt grubu, dipeptit substratları için spesifik olan dipeptit hidrolazları içerir. Sonuç olarak bunlar amino veya karboksi peptidazlar olarak sınıflandırılmazlar [12].

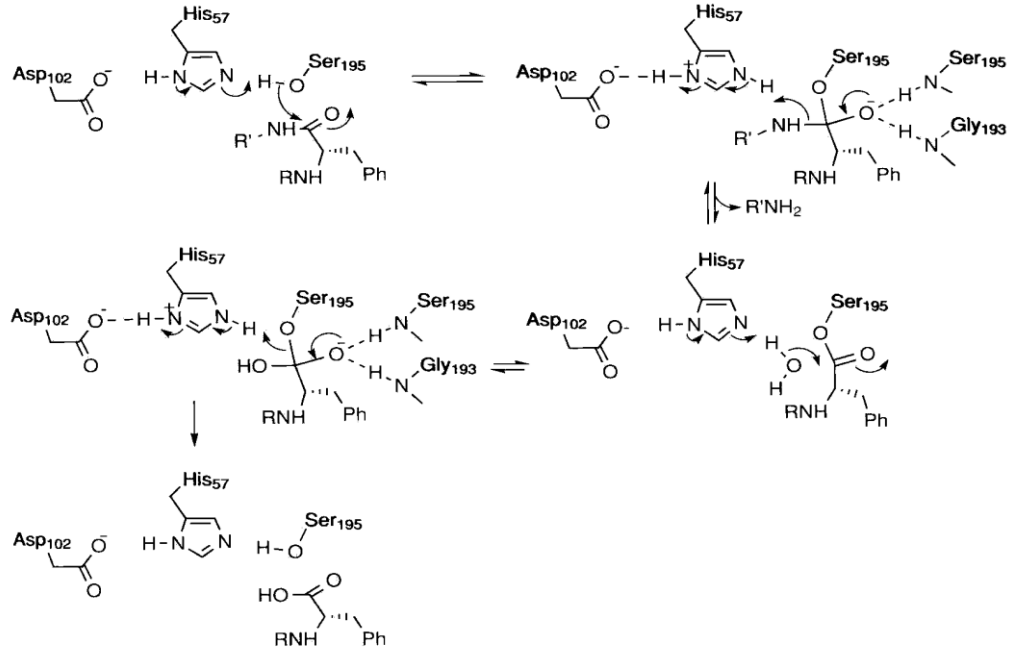
3.2.1. Serin Proteazlar

Serin proteazlar, serin tortusuna ve alkalın pH değerlerinde maksimum aktiviteye sahip olan endo peptidazlardır. Bu enzimler, katalizöre kovalent bağlarla bağlanmış aktif site serin tortusu tarafından karakterize edilmektedir. Bunun en bilinen örnekleri tripsin, kimotripsin ve alkalın koşullarda aktif olan bakteri proteazlardır (Subtilisin, alkalaz v.b). Serin proteazlardaki katalitik alan dört ana elemandan oluşur [3,10].

- Katalitik üç değerli bir atom gibi uyum içinde hareket eden, aktif site serin'e (ser 195), katalizörlükte histidin (His 57) ve aspartat (Asp 102) tortusu, yardım etmektedir.
- Bir oksianyon bağlayıcı site(Asn 155)
- Amid ana zinciri Ser 221
- Özel substat için diğer bağlayıcı sabitleyiciler [13].

Poliipeptid zincirlerinde, aromatik aminoasitler (phe), Tirosin (tyr) veya triptofan (trp) dan sonra spesifiklik gösteren bir 241 aminoasit endo proteazı olan kimotripsin, serin proteazların en iyi karakterini gösterir. Bu seçicilik, substratın aromatik yan zinciri ile katalitik siteye yakın yerleşmiş hidrofobik bağlama grubu arasındaki uygun hidrofobik etkileşimden kaynaklanır. α -Kimotripsin'in katalitik mekanizması Şekil 3.1'de gösterilmektedir. Bu mekanizma, Aktif site Ser 195 in, tetrahedral oksianyon ara ürünü oluşturmak üzere amid karbonile saldırdığı, kovalent katalizinin klasik bir örneğidir [10]. Substrat , N-açıl amino hidrojen bağınının Ser 214 karbonil grubuna bağlaması ile, enzimin spesifiklik paketine bağlanır. N açıl amino zincirindeki diğer tortular mevcut olan alt siteleri bağlar. Tepkisel karbonil grubu, Ser 195 ve Gly 193'un arka NH grupları arasındaki oksijen ile bir arada dururlar. Bununla birlikte, oksijen ve Gly-193 arasındaki hidrojen bağının uzun ve zayıf olması olasıdır. Reaksiyondaki ilk kimyasal adım, tetrahedral ara ürünü oluşumdur. Bu sırada, hidroksildeki proton His 57'nin imidazoluna taşınmaktadır. Ser 195 ile karbonil karbonu arasındaki bağ meydana gelirken, C=O bağı tek bir bağ olmak üzere uzar. Negatif bir yük taşıyan oksijen, daha kısa ve daha kuvvetli hidrojen bağı oluşturacak şekilde Gly 193'ün NH'na daha da yaklaşır [14].

Subtilisin gibi *Bacillus* bakteri türlerinden üreyen alkalın serin proteazlar pH 7-11 aralığında aktiftirler. Bu proteazlar deterjan katkı maddeleri olarak kullanılırlar ve ticari anlamda büyük önem taşırlar [3, 13].

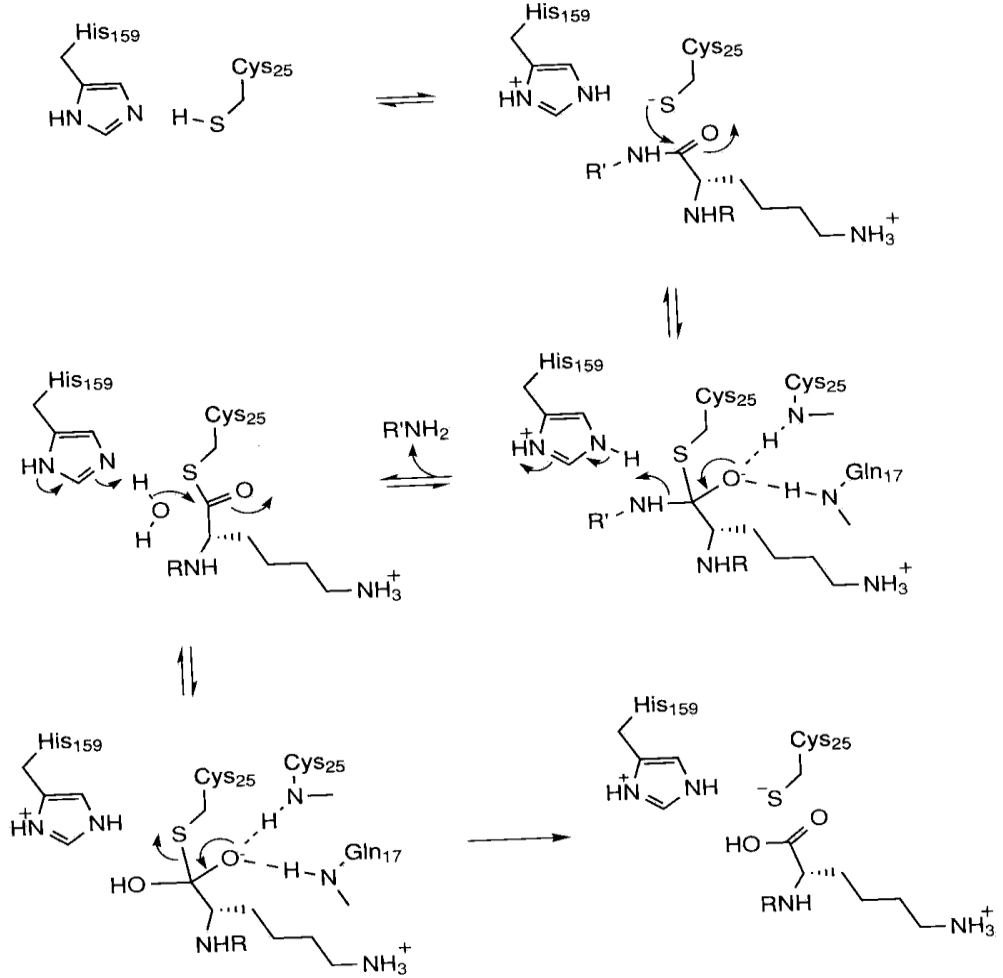


Şekil 3.1. α-Kimotripsin Mekanizması

3.2.2. Sistein Proteazlar

Sistein proteazlar, serin proteazlar gibi tiyol yan zinciri , kovalent bir katalize dahil olmuş olan, bir aktif site sistein tortusu ile karakterize edilmektedir. Sistein proteazları, sindirim amaçları için daha az sıklıkta kullanılan enzimlerin geniş bir ailesi olup, daha sık olarak hücresel proteinlerin dönüşüm süreci için kullanılan hücre içi proteazlar olarak kullanılmaktadırlar. Tiyol proteazları doğada geniş olarak bulunmaktadır. Bitkilerden elde edilmiş en bilinen sistein enzimleri, papain (papaya), fisin (incir), bromelain (ananas) ve aktinidin (kivi) dir. Aktif sitede sistein tortusuna sahip olacak, şekilde evrim geçirmiş olan beş tane üst aile daha vardır. Bunlar kalpain, klostripain, pikornavirus proteaz, streptococcal proteaz ve interkukin 1 B dönüşüm enzimidir. Bunların ortak özelliği, uyum içinde hareket eden bir sistein ve bir histidin tortusunun varlığıdır. Bu enzimlerin mekanizmasının, serin proteazıninki ile önemli ölçüde benzer olduğu başta düşünülmüştü. Bunun nedeni bir deasilasyonu takip eden, bir açıl enzimin oluşturulması için bir histidin genel bazlı katalize sistein atağının olmasıydı. Ancak, tiyol nükleofillerin genel baz kataliz tarafından aktif hale getirildiği yolunda kimyasal modellerden hiçbir kanıt yoktur [14]. Sistein için önerilen mekanizmaya örnek olarak papain'ın mekanizması Şekil 3.2'de verilmiştir.

Bu enzimlerin, hafif azaltıcı maddelerin varlığında saflaştırılması ve işlenmesi gerekmektedir. Çünkü aktif site tiyolu oksidasyona oldukça uygundur. Aktif site sisteini, güçlü bir civa sülfür bağıni oluşturmak suretiyle işlev gösteren bir organo civa bileşeni olan p-kloro civa benzoat gibi sistein yönetimindeki reaktifler tarafından kolaylıkla değişime uğratılır [10].



Şekil 3.2. Papain Mekanizması

3.2.3. Metallo Proteazlar (Çinko Proteazlar)

Bunların grup adından da anlaşıldığı gibi, aktif sitede, pozitif yüklü bir metal iyonu (genellikle Zn^{2+}) bulunur [13]. Çinko bağlama sitesinin yapısına göre sınıflandırılmış olan beş ayrı çinko proteaz ailesi mevcuttur. En bilinen üyesi, tek çinko atomu içeren bir metallo enzim olan, sindirim enzimi büyükbaş hayvan pankreas karboksil peptidazı A'dır. Bu enzim, polipeptit substratlardan aminoasitlerin hidrolizini katalize eden bir ekzopeptidazdır ve bu fenilalanin gibi büyük hidrofobik amino

asitler için spesifiktir. Yakın ilişkili karboksi peptidaz B, lisin ve argin tortularının hidrolizini katalize etmektedir. İki enzim yapısal olarak neredeyse benzerdir fakat B biçimi, substratın pozitif yüklü yan zincirini bağlayan bir aspartat tortusuna sahiptir.

Diğer iyi bilinen çinko proteazlar şunlardır: collagenaz, angiotensin-enzimi (kan basıncının düzenlenmesinde önemlidir), kendi tek polipeptit zincirinde 316 tortu içeren , bakteri endo peptidazı olan, termolisine, ve hücre duvarı metabolizmasında karboksi peptidasyon ve trans peptidasyonu katalize eden bir D-alanil D-karboksi peptidazı olan *Streptomyces* türünden Zn 21 G proteazıdır.

Çinko proteazların kimyasal mekanizmaları tartışmalıdır. Çünkü, ara ürünü için hiçbir doğrudan kanıt yoktur ve Zn^{2+} iyonu bir substratın C=O grubunu polarize edecek bir elektrofil olarak veya metal bağlı nükleofilik OH iyonlarının bir kaynağı olarak hareket edebilir [14].

Metallo proteazlar sanayi sektöründeki mikrobik proteazların önemli bir sınıfıdır. Nötr bakteri proteazlar bu gruba dahildir. *Bacillus thermoproteolyticus* türünden elde edilen termolisine enziminde, Zn^{2+} pozitif yüklü iyon üç atom bağlayıcı ile His 142, His 146 ve Glu 166 ya bağlanır. Aynı şekilde, metallo proteazlar, Glu 143, söz konusu peptid bağının karbonil karbonu üzerinde bir su molekülünün saldırısının başlatılmasıyla katalizöre katılır.

Bacillus subtilis ve *B. amyloliquefaciens*'den nötr proteazlar, dört adet tortu ile, yani Asp 138, Asp 185, Glu 190 ve Asp 191, bağlı olan Ca^{2+} pozitif yüklü iyonlarını gerektirmektedir. Bu sitelerin proteaz enziminin içinde bulunması enzime, ısıya dayanıklılık ve termo kararlılık özelliği kazandırmaktadır [13].

Bu enzimler, metal iyon kofaktörünün ortadan kalkmasına veya inaktifiğe neden olacak şekilde, EDTA gibi metal tepkimesi maddeleri ile işleme tabi tutulma ile diğer sınıflardan kolaylıkla ayrılabilirler [10].

3.2.4. Aspartil (Asit) Proteazlar

Aspartil proteazlarının bu şekilde isimlendirilmesinin nedeni, bunların katalitik olarak önemli aspartat tortularına sahip olmalarıdır. Aspartil (veya asit) proteazlar, karboksilat yan zincirlerinin katalizde bulunduğu iki aktif site aspartat tortusunun varlığı ile karakterize edilmektedir. Bunlar daha önce asit proteazları olarak adlandırılmışlardır, bunun nedeni bu enzimlerin düşük pH değerlerinde aktif

olmalarıdır. Ailenin en iyi bilinen üyesi, isimlendirilme ayrıcalığına sahip ilk enzim olan pepsindir. Pepsin sindirim enzimi olarak midede salgılanır. Diğer üyeler , kathepsin D, rhizopus pepsin, penisilinopepsin ve kan basıncının düzenlenmesinde yer alan renindir. Aspartil proteazları, muhtemelen, proteaz enzimlerinin en küçük sınıfıdır. Ancak, AIDS tedavisi için gerekli HIV-1 virüsünün önemli oranda aspartil proteaz enzimi içerdiğinin keşfedilmesi ile son zamanlarda ön plana çıkmaktadır. Ayrıca aspartil proteazlar, süt endüstrisinde ve peynir mayalama işleminde kullanılırlar. Aspartil proteazların tepkime mekanizması tüm proteazlar içinde en belirsiz olanıdır ve yönlendirme için basit kimyasal modeller yoktur [10,13,14].

3.3. Mikrobiyal Proteaz Enziminin Kullanım Alanları

Sanayi proteazları, bir sınıf olarak, sanayi enzimlerinin en geniş kategorisini temsil etmektedir. Bakteri proteazlar toplam sanayi proteaz cirosunun % 60'ını temsil etmesinden dolayı bu alanın en önemli parçasıdır. Mikrobik peynir mayası ve mantar proteazlar ise sırasıyla % 5 ve % 1 gibi küçük bir rol oynamaktadırlar [13].

Mikrobik proteazlar, genellikle bakteri ve küflerin kültürlerinden izole edilmiş olan enzimlerin değişik tiplerinin karmalarıdır. Bu enzimler, optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri ile birbirlerinden ayrılırlar.

Bakteri proteazlar, enzim aktivitesinin maksimum olduğu pH değerlerine göre asidik, nötr veya alkalın olarak sınıflandırılırlar. Bakteri proteazların nötr ve alkalın olan iki tipi ticari bakımdan önemlidir. Bunlar birbirlerinden pH aralığı, kararlılık ve aktif merkez yapısı bakımından ayrılırlar.

Subtilisin gibi alkalın bakteri proteazlar pH 7-11 aralığında aktiftirler ve özellik olarak sadece az değişimler gösterirler. Bunların katalizör olarak aktif serin tortuları vardır ve geri dönülemez şekilde alkileyici maddeler tarafından inhibe edilirler ve deterjanlarda kullanılırlar. Nötr bakteri proteazlar pH 6-9 aralığında aktif olan metallo enzimlerdir. *Bacillus subtilis*, *B. thermoproteolyticus* ve *Streptomyces grius* türlerinden elde edilen enzimler nötr bakteri proteazlara örnektir. Ticari enzimler, gram başına 0,5-2 Anson birimlerinde nişastalı veya tuzlu olarak standartlaştırılmış tozlu biçimlerde veya dengeli çözeltiler halinde piyasada bulunurlar. Bunlar deri sanayinde, biracılıkta ve protein hidroliz ürünlerini kapsayan çözeltilerin üretiminde kullanılırlar [3].

Toplam mikrobik proteaz kullanımının % 89'undan fazlası deterjan katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. İkinci sırada ise, mikrobik proteaz pazarının % 8'inden daha azına denk gelen mikrobik peynir mayaları vardır. Fırıncılık ve deri sanayileri için mikrobik proteazlar için piyasaların farklı bir özelliği vardır. Yani, fırınlar ve deri işlemeciler genel olarak, sadece bir enzim değil aynı zamanda da işleme yardımı satın almaktadırlar [13].

3.3.1. Deterjan Sanayi

Alkalın serin proteazlar, deterjan katkı maddeleri olarak kullanılırlar ve sanayi sektöründeki mikrobik enzimlerinin en geniş hacmini temsil ederler. Deterjan katkı maddesi olarak kullanılan iki ana enzim, *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Bacillus licheniformis* bakteri türlerinden üretilen, sırasıyla Subtilisin Novo (BPN) ve Subtilisin Carlsberg'dir.

Ev çamaşır deterjanı pazarının yaygınlaşması, tüketicinin, daha düşük ısılarda yıkama istediği ve fosfatlar içeren çevreyi kirleten ürün kullanımından kaçınma isteği ile son yıllarda desteklendi. Proteaz kullanımındaki artış, proteaz enzimi üreticilerinden bir çok şey talep edilmesine neden olmuştur. Yani, deterjan üreticilerinin, yeni yüzey aktif maddeler ve deterjan katkıları ile uyumlu olan ve süpermarket rafında aktif olarak daha uzun süre duran mikrobik proteazlara ihtiyaçları vardır.

Enzimler, düşük fosfatlı deterjanlarda ve ılık ve soğuk su yıkama ısıları için formüle edilmiş olanlarda, deterjanların değerli bir bileşiği olmuştur. Yani, sıcak yıkama için tasarlanmış olan önceki formülasyonlar, sodyum fosfat, üç bazlı ve yüksek ısılarda (60°C üzeri) etkin şekilde aktif hale gelen bir beyazlatma maddesi sodyum perborat içermekteydi. Fosfat kirlenmesini azaltmak için çevresel baskılar ve polyester kumaşların artan kullanımı nedeniyle, bu içerikler deterjanlarda azaltılmış hatta kaldırılmıştır [13].

Deterjan ve yıkama sıvısının kompozisyonu ve aynı zamanda yıkama özellikleri, bir çamaşır deterjanının fonksiyonel enzim özelliklerini belirlemektedir. Ayrıca deterjanlarda kullanılan enzim aktivitesinin deterjanın raf ömrü boyunca kararlı kalması gerekmektedir. Bir enzimin raf ömrü, sıcaklık, pH, su aktivitesi, beyazlatıcı ve anyonik yüzey aktif maddeler gibi yapı bozucu maddelerin varlığına bağlıdır [3].

Bir deterjan içindeki mikrobik proteazın ortamı, önemli derecede zor ve kararlılığını bozucudur. *B. licheniformis* tarafından üretilen Subtilisin Carlsberg, enzimin

deterjanlarda kullanılma sebebi, yüksek pH değerlerinde ve yüksek konsantreli fosfatların varlığında göreceli olarak kararlı olmasıdır. Deterjan proteazların ikinci nesli alkalazlar, sadece sodyum tripolifosfatın varlığında değil aynı zamanda perboratlar (oksitleme beyazlatma içerikleri) ve yapıcı maddeler varlığında daha da yüksek pH ve ısılara dayandığı için kullanılmıştır. Subtilisinlerin hepsi geniş bir pH yelpazesi üzerinde kararlı kalırlar (min. pH 5-6, maks. pH 11-12). Benzer şekilde, hepsi 50°C altındaki sıcaklıklarda kararlı iken, çoğu 60°C ile 70°C arasında yeterli bir aktivite göstermektedir. Bu yüzden deterjan kullanımı için önemli enzimlerdir.

Çevresel amaçlarla deterjanlardan fosfatların çıkarılması ve deterjanlara ilave edilen mikrobik proteazların deterjanın raf ömrü boyunca aktifliğini koruması için gereken şartlar deterjanların genel oluşumunda büyük değişikliğe neden olmuştur. Daha iyi fosfatsız ürünlerde kullanılan yüzey gerilimini azaltan maddeler ve beyazlatıcı maddeler, iyi bilinen serin proteaz inhibitörleridir. Özellikle alkil benzen sülfonatlar gibi anyonik bir sıvının yüzey gerilimini azaltan maddeler, proteazların açılmasına ve yumuşamasına neden olmaktadır. Fakat, yeni “yapıcılar” zeolitler, silikatlar, NTA ve EDTA ciddi destabilizatörler olarak bilinmemektedirler [13].

Şu anda, belli başlı enzim üreticileri, beyazlatıcı ve fosfat olsun veya olmasın, sıvı ve toz deterjanların tüm tiplerinde kullanılmak için farklı formüle edilmiş bir çok proteaz üretmektedirler.

Toz deterjanlarda kullanım için, enzimler, küçük boncuklar veya granüllere doldurucu ve bağlayıcı madde olarak formüle edilmekte bazen de balmumu gibi ağır bir malzemeden bir tabaka ile çevresi sarılmaktadır.

Ulaşım sırasında olduğu gibi toz deterjandaki enzim parçacıklarının ayrılmasının önlenmesi için, enzim boncuklarının parçacık boyutları, deterjan parçacıklarının boyutlarına az veya çok benzerdirler. Dahası, parçacıklar, yıkıma sıvısı hazırlandığında, hızlı şekilde çözünmek zorundadır [3].

3.3.2. Deri Sanayi

Hayvan postlarını deriye dönüştürmede proteaz enziminden faydalanılır. Derinin üretimi için postlar ve hayvan derilerinin işlenmesinde proteazların kullanım nedeni kıl ve derinin başlıca yapım bloğunun protein olmasıdır. Kıl (saç) α -keratinden yani çözünmeyen lifli protein moleküllerinden oluşur. Bu protein molekülleri sistein tortularını içerirler ve α -helis düzenine sahiptirler. Farklı deri tabakaları, kolajen,

α -keratin (epidermis) ve bazı elastinlerden oluşur. Ayrıca, albümin, globulin, glikoproteinler ve diğer küresel proteinleri içerirler. Kolajen, büyük miktarlarda, glicin, alanin, prolin ve hidroksiprolin içerir. Kolajen üçlü helis biçiminde düzenlenmiştir. Farklı özellikli enzimlerin kullanımı, hayvan derisinin kolajen olmayan içeriklerinin hidrolizini de mümkün kılmaktadır. Proteazlar hayvan postlarını deriye dönüştürmede aşağıdaki operasyonlarda, en azından belli bir ölçüde kullanılırlar.

3.3.2.1. Islatma

Tabakhanede, postlar ve hayvan derileri yüzey etkin maddeler ve anti mikrobik içerikler içinde yıkanır ve ıslatılırlar. Albüminler ve globülinler gibi lifli olmayan proteinlerin çıkarılması için alkalın proteazlar kullanılır. Bu bir sonraki adım olan kıldan arındırma işlemi için önemlidir. Deterjan sanayi tarafından kullanılan proteazlar genel olarak bu amaç için uygundur çünkü bunlar, pH'ı 10 kadar çıkarılmış ıslatma banyosuna dayanıklıdır. Ayrıca bu işlem için pankreatik proteaz olan tripsin de kullanılır. Tripsin içindeki, küçük miktardaki amilaz ve lipaz aktivitesi, yağlı et içeren deriler için avantajlıdır [13].

3.3.2.2. Kıldan Arındırma ve Yünden Arındırma

Kıldan arındırma daha önce hayvan derilerinin, %10 kireçli güçlü bir alkalın banyosunda birkaç gün boyunca ıslatılması ile yapılmaktaydı. Şimdi ise, alkalın proteazların kullanımıyla gerekli olan kirecin yarısından fazlası kullanılmaktadır. Sonuç olarak, derinin son kalitesi iyileştirilmekte ve önemli derecede daha az atık su ortaya çıkmaktadır.

Kireçleme, normal olarak % 2 Na₂S ve % 3 kireç kullanılarak gerçekleştirilen 18 saatlik bir süreçtir. Enzimatik ıslatma, ıslatma hızının artırılması ana amacı ile kireç banyosu içinde 24 saatte gerçekleştirilir. Yünden arındırma, derinin etli kısmına yünden arındırma boyasının uygulanmasıyla ve derinin, yün çekilmeden önce 10-20 saat boyunca 20-35°C'de tutulması ile gerçekleştirilmektedir. Yünden arındırma boyası, hidratlı kireç, sodyum klorit, alkalın proteazlar ve sudan oluşmaktadır. İnce yünlü deriler için kullanılan alternatif bir yöntem, etli kısma bir tozun uygulanmasını ve derilerin 24 saat boyunca 25°C'de tutulmasını gerektirir. Uygulanan toz, sodyum sülfat ve klorit, amonyum sülfat ve kloritten ayrıca mikroorganizmalar tarafından

Üretilen nötr proteazlardan oluşmaktadırdır. Islatma ve ynden arındırma adımları bazen bir arada yapılabilir [3].

Postun tüylerden arındırılması için mikrobik serine proteazlar pahalı olmayan kimyasallara karşı rekabet etmektedir. Alkalofilik *Bacilli*'den elde edilen mikrobik proteazların kullanılması teknik olarak kimyasal işleminlerin yerini alabilir ancak bu maliyeti artıran bir unsurdur. Kirliliğin ve işçi güvenliğinin kontrol edilmesinin önemi (hidrojen sülfid dumanları) bazı ülkelerde deri sanayinin süreçlerini değiştirmeye ve daha rahat çevresel kurullara sahip olan ülkelerde iç yapmaya zorlamıştır. İlk sebep, mikrobik proteazların kullanımının artmasına neden olmuştur, ancak ikinci sebep proteaz kullanılması için daha yaygın bir seçimdir [13].

3.3.2.3. Ayırma

Ayırma adımımda, postların ve hayvan derilerinin, yumuşak ve esnek hale getirilmesi ve bunların tabaklamaya hazır hale getirilmesi için enzimler ve kimyasallar kullanılır. Başlıca tripsin, az miktarda alkalın ve nötr proteazlar kullanılmaktadır. pH, sıcaklık, zaman, enzim miktarı ve enzim prepartının oluşumu gibi ayırma koşulları üretilen derinin tipi tarafından belirlenmektedir .

Yakın gelecekte, enzimlerin sistemlerinin uygulaması çoğalacaktır. Sistemler, farklı deri tipleri için uygun hale gelecektir ve yapışkan maddeler ve yağın çıkarılması için proteaz bazlı olanlar dışındaki enzim sistemleri de geliştirilecektir. Hatta, enzim kullanım teknolojisi, basınç uygulamasıyla tüm enzimin deriye işlenmesi ile iyileştirilecektir [3].

3.3.3. Peynir Yapımı

Aspartil proteaz gurubuna dahil olan, sığır kimosin (rennin) uzun zamandır peynir yapımı sırasında sütün kesilmesi veya pıhtılaştırılması için kullanılmaktadır. Kaynağı nedeniyle sığır kimosin yüksek fiyatlıdır.

Alternatif olarak domuzdan elde edilen pepsin, kullanılmaktadır, ancak pepsinin yüksek proteolitik aktivitesi peynir özü için istenmeyen bir şeydir. Bu yüzden, süt kesme enziminin çeşitli mikrobik kaynakları aranmıştır. Sığır kimosin'in iştiva ettiği aktiviteye yakın olan peynir mayalarının mikrobik kaynakları , *Rhizomucor miehei*, *Mucor pusillus lindt* ve *Endothia parasitica* dır. İlk iki organizma, thermophilic mantar, üçüncüsü ise bir mayadır. Mikrobik kaynaklar ile sığır kimosin arasındaki

farklılıkları en aza indirmeye çabalarına rağmen, farklar, peynir yapımı için sığır kimosinin tercih edilmesine sebep olmuştur.

3.3.4. Bira Yapımı

Proteazlar, bira yapılırken fermantasyonda, serbest amino nitrojenin miktarını artırmak için ezilmiş arpa ile su karışımı fiçisine eklenirler. Proteazlar, bira yapmak için ezilmiş arpa ile su karışımı fiçisinde tahıl proteinlerini hidroliz eder ve böylece peptidler ve aminoasitler, fermantasyon sırasında maya tarafından özümselebilir. Burada kullanılan proteaz enzimi *B. amyloliquefaciens*'den elde edilen nötr metallo proteazdır. Bu enzimin ana avantajları, arpa özlerindeki serin proteaz inhibitörlerinden etkilenmez ve optimum pH 'ı bitkininkine yakındır. Yetersiz serbest amino nitrojen içeren bitkiler, fermantasyonda yeterince erken gerekli olan alkol içeriğine ulaşamaz bundan dolayı büyük bir bozulma riski ortaya çıkar.

3.3.5. Fırıncılık (Ekmek Yapımı)

Fırıncılıktaki iki uygulama için, mikrobik proteazlar kullanılmaktadır: yüksek gluten içeren hamurların yumuşatılması ve kraker, bisküvi üretimi için. Her ikisi içinde mantar asit proteazlar bu bölümde önde gelen ürün olmaktadır.

Birinci uygulamada proteaz, hamur içinde elastik bir ağ oluşturan glütenin bir kısmını parçalara ayırır. Az miktarda enzim kullanılarak yapılan küçük bir hidrolizle, sert, lastik gibi olan hamur, daha yoğrulabilir, sıkma ve kalıp vermesi kolay bir şekle dönüştürülür.

Mantarlardan elde edilen asit proteazın kraker ve bisküvi üretimindeki işlevi birinci uygulamaya benzerdir. Fakat bu uygulamada, enzim miktarı arttırılarak glüten yoğun bir şekilde hidroliz edilir. Böylece hamur, mayalandırılması sırasında oluşan hava kabarcıklarını tutmaz. Sonuçta, piştikten sonra çıtır çıtır, gevrek bir yapıda geliştiren mayalanmamış bir hamur elde edilir [13].

3.3.6. Tekstil Sanayi

Tekstil endüstrisi enzim alanındaki gelişmeleri çok yakından takip eder. Proteazlar yün ve ham ipeğin işlenmesi sırasında kullanılırlar.

3.3.7. Klinik Uygulamalar

Proteazlar uyuşturucu maddelerin, kan ve doku örneklerinin tahlilinde kullanılır. Çoğu uyuşturucu maddenin ana bileşenleri vcttaki proteinlere bağlanır. Alınan doku proteazla karşı karşıya bırakıldığında protein çözülürken uyuşturucu madde açığa çıkar. Böylece kolaylıkla ekstrakte edilir ve analizi yapılır.

3.3.8. Kozmetik ve İlaç Sanayi

Kozmetikte proteazlar diş macunlarında, istenmeyen tüylerin yok edilmesini sağlayan ürünlerde ve kontak lens solüsyonlarında kullanılmaktadır. İlaç sanayinde ise sindirim sistemini takviye eden ilaçlarda kullanılırlar.

3.4. Proteaz Enziminin Karakterizasyonu

3.4.1. Proteaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

Formüle edilmiş ticari enzim preparatları, ağırlık olarak az miktarda enzim proteinleri içerirler. Bunlar aktivite temelinde satılırlar. Bu yüzden enzimlerin analitik olarak aktivite ölçümü gerçekleştirilmelidir. Proteaz enziminin aktivite ölçümü, kazein veya hemoglobin gibi yüksek subsrat molekülleri ile belli pH ve sıcaklıkta gerçekleştirilmektedir. Reaksiyon sonunda, büyük parçaların TCA zeltisi ile çökmesi sağlanır. Böylece hidrolize uğrayarak çözülebilir hale gelmiş olan protein miktarı, UV spektrofotometrik yöntemi ile ölçülür.

3.4.2. Proteazın Aktivitesine Etki Eden Faktörler

3.4.2.1. pH Etkisi

Bütün enzimlerin aktif olduğu bir optimum pH aralığı vardır. Bazı enzimler geniş bir pH aralığında etkili iken bazıları da çok dar bir pH aralığında etkilidirler [2].

Farklı proteazlar, farklı pH'larda optimum aktivite gösterirler. Buna bağlı olarak, proteazlar, genel olarak alkalın, nötr veya asit olarak sınıflandırılırlar. Bu sınıflandırmada kesin sınırlar çizilemez. rnek olarak, metallo proteaz Nötraz®, bir nötr proteaz olarak isimlendirilir. Alkalaz enzimi ise maksimum aktivite gösterdiği pH değerlerine göre alkalın olarak görülür ve serin proteaz olarak isimlendirilir. Ancak, bu iki enzimin pH aktivite eğrileri kıyaslandığında, Alkalaz'ın, pH 5'in

altında bile önemli katalitik aktivite gösterdiği görülmektedir. Aynı pH değerlerinde, Nötraz'ın aktivitesi ise hemen hemen sıfırlanmaktadır.

Bu durumda proteazın aktivitesi optimum pH etrafındaki dar bir aralıkla sınırlanamaz. Proteazlar genel olarak, bilinen optimum pH'dan 1-2 ünite farklılık gösteren koşullarda da, kullanılabilirler.

Optimum pH'ı etkileyen diğer bir etken de kullanılan substrattır. Özellikle, deneyde doğal özelliği bozulmuş hemoglobin veya kazeinden başka substrat kullanımı pH aktivite profilini önemli derecede etkilemektedir [10].

Alkalın bakteri proteazlar pH 7-11 arasında aktiftirler. Nötr bakteri proteazlar yani metallo proteazlar ise pH 6-9 arasında aktiftirler [3].

3.4.2.2. Sıcaklık Etkisi

Diğer enzimler gibi proteazlar da artan sıcaklık ile birlikte artan spesifik aktivite gösterirler, yani, substratın hidrolize uğradığı anda bir artış olacaktır. Reaksiyon oranı hız sabiti (k_{cat}) ve $K_m \cdot k_{cat}$ 'a bağlıdır ve Arrhenius eşitliğini ile belirlenir. K_m (Michaelis-Menten sabiti)'in sıcaklıkla değişimi, Gibbs-Helmholtz eşitliğiyle hesaplanır ve K_m , sıcaklığın artışı ile genellikle artar. Sıcaklık ile K_m 'deki değişimlerin etkilerinin ihmal edilebileceği substrat konsantrasyonlarında, Arrhenius eşitliğine göre belirlenen sıcaklık aktivite eğrisi, hidroliz reaksiyonunun aktivasyon enerjisini yaklaşık olarak yansıtır [12].

Çok yüksek sıcaklıklarda, enzimin termal hareketi hızlanır. Bunun sonucunda enzim şekli ile yapısını koruyamaz ve denatürasyona uğrayarak aktivitesini hızla kaybeder. Aynı şekilde, düşük sıcaklıklarda çözeltideki moleküllerin hareketi yavaşladığı için reaksiyon hızı yani aktivite düşer. Böyle bir durum, enzim için maksimum aktiviteyi gösterdiği sıcaklığın ortaya çıkmasına yol açar [2].

3.4.2.3. İnhibitörler

Enzim aktivitesini azaltan maddelere inhibitör denilmektedir. İnhibitörler karşımıza iki şekilde çıkmaktadır. Bunlar tersinir inhibitörler ve tersinmez inhibitörlerdir. Tersinir inhibitörler enzimlere tersinir bir şekilde bağlanırlar ve diyalizle ayrılabilirler. Tersinmez inhibitörler ise enzimlerden diyalizle uzaklaştırılamazlar. Enzim ve inhibitör arasında genellikle kovalent bir bağ oluşur. İnhibitör, substrat bağlanmasını önleyerek veya aktif sitenin bazı bileşiklerini yıkarak etki eder.

Tersinir inhibisyon, inhibitörlerin enzimlerle interaksiyonlarına göre yarışmalı, yarışmasız, yarışmalı olmayan, karışık ve kısmi inhibisyon olarak sınıflandırılırlar [8].

Proteaz aktivitesinin inhibisyonu iki şekilde gerçekleşir. Proteazlar, birkaç katalitik mekanizma ile peptit bağlarının hidrolizine neden olurlar ve bunların aktivitelerinin inhibisyonu, her bir mekanizma sınıfı için farklı olacaktır. Tersinmez inhibitörler, aktif site tortularının kovalent değişimine neden olur ve böylece bunlar geriye döndürülemezler.

Tersinir inhibitörler aralarında kovalent etkileşim olmadan proteaza bağlanırlar. Bu kovalent olmayan inhibitörler, protein olabilirler veya düşük mol ağırlığındaki peptid analoglar olabilirler. Proteaz ve inhibitör arasında oluşan kompleks geriye döndürülebilir ve solüsyondaki inhibitörün konsantrasyonuna bağlıdır. Eğer, inhibitör konsantrasyonu, diyaliz ile azaltılırsa, proteaz tekrar aktivite kazanır [15].

Proteaz enzimini inhibe eden maddelere örnek olarak, EDTA, β -Mercaptol, histidin, Cu^{2+} verilebilir [16].

3.4.2.4. Aktivatörler

Enzimlerin aktivitesini arttıran maddelerdir. İki değerlikli metal iyonları, serin alkalın proteaz enziminin aktivitesini artırır. Yapılan çeşitli çalışmalar da Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} gibi metal iyonları proteaz aktivitesini arttırıcı özellik göstermişlerdir [16,17].

3.5. Bakteriyel Kaynaklı Proteaz Enzimi Eldesi İçin Yapılan Çalışmalar

Proteaz enzimi eldesi için birçok bakteri çeşidi ile çalışma yapılmıştır. Ancak sanayideki kullanım alanı geniş olduğundan *Bacillus* bakteri türleri ile yapılan çalışmalar daha ağırlıktadır.

Qasim Khalil Bag ve Rani Gupta tarafından 2003 yılında yapılan çalışmada, *Bacillus mojavensis* bakteri türünden proteaz enzimi saflaştırılmış ve özellikleri incelenmiştir. Yapılan çalışmada elde edilen enzim, amonyum sülfat çöktürmesi ve Q-Sefaroz iyon değiştirme kromatografisi işlemleri uygulanarak 17.1 kat saflaştırılmıştır. Elde edilen proteaz enziminin molekül ağırlığı 30 kDa olarak bulunmuştur [18].

Basma Gharbel, Alya Sellami-Kamoun tarafından 2003 yılında yapılan çalışma *Bacillus cereus* bakteri türünden elde edilmiş proteaz enziminin özelliklerinin incelenmesi üzerinedir. Yapılan çalışmada enzimin optimum sıcaklığı Ca^{2+} varlığında 60°C , Ca^{2+} yokluğunda ise 50°C 'dir. Enzimin optimum pH'ı 8 olarak bulunmuştur. Ayrıca Cu^{2+} ve Zn^{2+} 'nin enzim üzerinde kuvvetli inhibitör etkisi olduğu tespit edilmiştir [19].

CG Kumar tarafından 2002 yılında yapılan çalışmada, *Bacillus pumilus* bakteri türünden proteaz enzimi saflaştırılmış ve özellikleri incelenmiştir. Yapılan çalışmada elde edilen enzimin süpernantının spesifik aktivitesi 11.6 U/mg'dır. Enzim amonyum sülfat çöktürmesi ve Q-Sefaroz iyon değiştirme kromatografisi ve jel filtrasyon saflaştırma işlemleri sonucunda 36.6 kat saflaştırılmıştır. Elde edilen proteaz enziminin molekül ağırlığı 28 kDa olarak bulunmuştur [20].

B. Johnvesly ve B. R. Manjunant tarafından 2002 yılında yapılan çalışmada *Bacillus* bakteri türlerinden ısıya dayanıklı alkalın proteaz enzimi üretilmiştir. Çalışmada üretilen proteaz enziminin aktivitesine etki eden faktörler incelenmiştir. Buna göre enzim üzerinde, Mn^{2+} 'nin aktivatör, Hg^{2+} 'nin ise inhibitör etkisi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca EDTA'nın enzimi çok fazla inhibe etmediği görülmüştür [21].

Boonyaras Sookkheo, Supachok Sinchaikul ve Shui-Thein Chen tarafından 2000 yılında yapılan çalışmada *Bacillus stearothermophilus* bakteri türünden proteaz enzimi saflaştırılmıştır. Yapılan çalışmada üç tür enzim elde edilmiştir ve enzimlerin süpernantlarının spesifik aktivitesi 10 U/mg'dır. Enzimlere Lisin affinite kromatografisi ve Q-Hiper D iyon değiştirme kromatografisi ve jel filtrasyon saflaştırma işlemleri uygulanarak 1. enzim 19 kat, 2. enzim 2.7 kat, 3. enzim 2.6 kat saflaştırılmıştır. Elde edilen proteaz enzimlerinin molekül ağırlıkları sırasıyla 36, 53, 71 kDa olarak bulunmuştur [22].

Jen-Kuo Yang, Ing-Lung Shih, Yew-Min Tzeng ve San-Lang Wang tarafından 2000 yılında yapılan çalışmada, *Bacillus* bakteri türünden proteaz enzimi saflaştırılmış ve özellikleri incelenmiştir. Yapılan çalışmada elde edilen enzim, Amonyum Sülfat çöktürmesi, DEAE-Sefaroz iyon değiştirme kromatografisi ve jel kromatografisi işlemleri uygulanarak 37 kat saflaştırılmıştır. Elde edilen proteaz enziminin molekül ağırlığı 44 kDa olarak bulunmuştur [17].

Uttam Chand Banerjee ve Rajesh Kumar Sani tarafından 1999 yılında yapılan çalışma, *Bacillus brevis* bakteri türünden proteaz enziminin üretilmesi ve üretilen enzimin çamaşır deterjanı katkı maddesi olarak özelliklerinin incelenmesidir. Çalışmada elde edilen enzim, 25°C’de 288 saat kararlılığını korumuştur. Ayrıca enzim bir kaç deterjan markasına uygulanarak Ca^{2+} ve glisin varlığında 60°C’de kullanım için uygun bulunmuştur [23].

C.G Kumar, M.P. Tiwari ve K.D. Jany tarafından 1999 yılında yapılan çalışma *Bacillus* bakteri türlerinden alkalın serin proteaz enziminin saflaştırılması üzerinedir. Süpernatantın spesifik aktivitesi 10.2 U/mg olarak saptanan çalışmada, aseton çöktürmesi, CM-Sefaroz iyon değiştirme kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sonucunda yaklaşık 15 kat saflaştırma sağlanmıştır. Elde edilen proteaz enziminin molekül ağırlığı 29 kDa olarak bulunmuştur [24].

S. Mehrotra ve P.K. Pandey tarafından 1999 yılında yapılan çalışmada *Bacillus* bakteri türlerinden alkalın proteaz enzimi üretilmiştir. Bakterilerin, glikoz ve amonyum içeren pH’ı 10.5, sıcaklığı 40°C olan besiyerinde, 20 saatlik üreme süresi sonunda en uygun şekilde ürettiği gözlenmiştir [25].

Hittu Matta ve Vasu Punj tarafından 1998 yılında yapılan çalışmada *Bacillus polymxa* bakteri türünden hücre dışı proteaz enzimi saflaştırılmış ve özellikleri incelenmiştir. Yapılan çalışmada elde edilen enzim, amonyum sülfat çöktürmesi, ve Sefadeks G-100 jel kromatografisi işlemleri uygulanarak 40 kat saflaştırılmıştır. Elde edilen proteaz enziminin molekül ağırlığı 30 kDa olarak bulunmuştur [26].

Jadwiga K. Sierecka tarafından 1998 yılında yapılan çalışmada *Bacillus cereus* bakteri türünden nötral proteaz enzimi saflaştırılmış ve özellikleri incelenmiştir. Enzim, amonyum sülfat çöktürmesi, aseton çöktürmesi, bio-jel filtrasyon DEAE-Selüloz iyon değiştirme kromatografisi saflaştırma işlemleri uygulanarak 14.5 kat saflaştırılmıştır. Elde edilen proteaz enziminin molekül ağırlığı 29 kDa olarak bulunmuştur [16].

Kenji Aoki, Kukizo Miyamoto ve Ryu Shinke tarafından 1995 yılında yapılan çalışmada *Bacillus* bakteri türlerinden hücre dışı proteaz enzimi saflaştırılmış ve özellikleri incelenmiştir. İki tür proteaz enzimi elde edilmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Selüloz iyon değiştirme kromatografisi saflaştırma işlemleri sonucunda 1. proteaz çeşidi 7 kat, 2. proteaz çeşidi 13 kat saflaştırılmıştır. Elde

edilen proteaz enzimlerinin molekül ağırlıkları sırasıyla 20 kDa ve 21 kDa olarak bulunmuştur [27].

Mustafa Kamal ve Jan-Olov Höög tarafından 1995 yılında yapılan çalışmada *Bacillus subtilis* bakteri türünden Subtilisin enziminin izolasyonu ve özellikleri incelenmesi üzerinedir. Bu çalışmada serin ve metallo olmak üzere iki tür proteaz enzimi elde edilmiştir. Yapılan çalışmada, amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-Sefaroz iyon değiştirme kromatografisi yapılmıştır. Serin proteaz DEAE-Sefaroz kolonuna bağlanmamış, metallo proteaz ise bağlanmıştır. Bu yöntemin, iki enzimi kromatografik olarak ayırdığı gözlenmiştir [28].

Hisao Shimogaki ve Keiji Takeuchi tarafından 1991 yılında yapılan çalışmada *Bacillus* bakteri türlerinden alkalın proteaz enzimi saflaştırılmış ve özellikleri incelenmiştir. Enzim, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Selüloz iyon değiştirme kromatografisi saflaştırma işlemlerinden sonra 6.2 kat saflaştırılmıştır. Elde edilen proteaz enziminin molekül ağırlığı 42 kDa olarak bulunmuştur [29].

4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

4.1. Malzeme Metot

4.1.1. Malzeme

- Bakto Tripton, Sigma
- Bakto Soyton, Sigma
- Bakto Agar, Sigma
- Pepton, Sigma
- Et Ekstraktı, Sigma
- Mangan Sülfat (MnSO_4), Merck
- Asetik Asit (CH_3COOH), Merck
- Trikloroasetik Asit (CCl_3COOH), Carlo Erba
- Sodyum Asetat (CH_3COONa), Merck
- Borik Asit (CH_3BO_3), Merck
- Sodyum Hidroksit (NaOH), Carlo Erba
- Süt Kazeini ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_3\text{N}_2$), Merck
- Amonyum Sülfat [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], Sigma
- Hidroklorik Asit (HCl), Merck
- Tris-HCl, Merck
- Trosin, Sigma
- BSA, Sigma
- Distile Su
- Sodyum Klorür (NaCl), Merck
- Etil Alkol (CH_3OH), Merck
- DEAE-Selüloz Anyon Değiştirici, Sigma
- Mavi Bant Süzgeç Kağıdı, Filtrax
- Diyaliz Tüpü, Sigma
- Nessler Reaktifi, Fluka
- Mangan Klorür, Sigma

- Demir Klorür, Sigma
- Kalsiyum Klorür, Sigma
- Bakır Klorür, Sigma
- EDTA, Merck
- Akrilamid (C₃H₅NO), BioRad
- Bis-akrilamid, BioRad
- Tris, Merck
- SDS [C₁₂H₂₅O₄SNa], Merck
- APS [(NH₄)₂S₂O₈], Merck
- TEMED, BioRad
- Protein Marker, Fermantas
- Gliserol (C₃H₈O₃), Merck
- β-Merkaptol (C₂H₆OS), Merck
- Glisin (C₂H₅NO₂), BioRad
- Coomassie Blue, BioRad
- (2,2-Bichinoly-4,4-dikarbonik asit)Na₂-tuz (BCA), Merck
- Sodyum Karbonat (Na₂CO₃. H₂O), Sigma
- Sodyum Tartarat (Na₂-Tartarat), Carlo Erba
- Sodyum Bikarbonat (NaHCO₃), Sigma
- Bakır Sülfat (CuSO₄.5H₂O), Merck

4.1.1.1. Cihazlar

- Su Banyosu, Julabo
- Santrifüj, Heraus Christ UJ III (25000 devir/dak)
- Hassas Terazî ,Oerling Na 264
- Manyetik Karıştırıcı, IKA-Schütter-Mas 2
- UV Spektrometre, Hewlett Packard-8452 A
- Etüv, Elektro Mag
- pH Metre, NEL
- SDS-PAGE Cihazı, EC 120
- Çalkalayıcı, Edmund Bühler
- Otoklav, Hirayama

4.1.1.2. Tamponlar ve Çözeltiler

Boraks-Sodyum Hidroksit (NaOH) Tamponu 1 (0.135 mol/lit) : 30.9 g borik asit ve 10.8 g sodyum hidroksit 1000 ml distile suda çözülür.

Boraks-NaOH Tamponu 2 (0.01 mol/lit) (pH 10.5) : 0.135 mol/lit olarak hazırlanmış Boraks-NaOH tamponundan 74 ml alınarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. pH, 0.1 N sodyum hidroksit ile 10.5'e ayarlanmıştır.

Boraks-NaOH Tamponu 3 (0.01 mol/lit) (pH 9.3) : 0.135 mol/lit olarak hazırlanmış Boraks-NaOH tamponundan 74 ml alınarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. pH 0.1 N sodyum hidroksit ile 9.3'e ayarlanmıştır.

Tris-HCl Tamponu (0.5 mol/lit) : 39.4 gr Tris-HCl 500 ml distile suda çözülmüştür. pH 0.1 N sodyum hidroksit ile 7.2'ye ayarlanmıştır.

TCA Karışım Çözeltisi 1 : 3.140 ml asetik asit, 1.797 g TCA ve 2.994 g sodyum asetat 100 ml distile suda çözülmüştür.

TCA Çözeltisi (%50'lik) : 50.5 g %99'luk TCA 100 ml distile suda çözülür.

Sodyum Asetat Çözeltisi (1 mol/lit): 29.937 g sodyum asetat distile su ile 220 ml'ye tamamlanmıştır.

Asetik Asit Çözeltisi (1 mol/lit) : 31.43 ml asetik asit, distile su ile 330 ml'ye tamamlanmıştır.

TCA Karışım Çözeltisi 2 : 36 ml %50'lik TCA çözeltisi, 220 ml 1 mol/lit sodyum asetat çözeltisi ve 330 ml asetik asit çözeltisi karıştırılarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Kazein Substrat Çözeltisi 1 (%0.6'lık) : 0.6 g kazein 100 ml Boraks-NaOH tamponu 3 ile çözülmüştür.

Kazein Substrat Çözeltisi 2 : 50 ml 0.1 N sodyum hidroksit çözeltisi üzerine 3 g kazein konarak çözülmesi sağlanır. Daha sonra 200 ml distile su , 20 ml 0.5 mol/lit Tris-HCl (pH 7.2) ilave edilerek karışımın pH'ı 1 N HCl ile 7.2'ye ayarlanmıştır. Son olarak distile su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.

Sodyum Hidroksit Çözeltisi (0.1 N) : 0.4 g sodyum hidroksit 100 ml distile suda çözülmüştür.

Hidroklorik Asit Çözeltisi (1 N) : 8.28 ml hidroklorik asit distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Sodyum Klorür Çözeltisi (3N) : 175.32 g sodyum klorür tartılarak 1000 ml distile suda çözülmüştür.

Protein Tayini Çözeltileri :

Çözelti A: 1 g BCA, 2 g sodyum karbonat, 0.16 g sodyum tartarat, 0.4 sodyum hidroksit ve 0.95 g sodyum bikarbonat bir miktar suda çözüldükten sonra pH'ı sodyum hidroksitle 11.25'e ayarlanarak distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Çözelti B: 4 g bakır sülfat 100 ml distile su ile çözülmüştür.

Çözelti C: 100 ml Çözelti A ve 2 ml Çözelti B karıştırılmıştır.

SDS-PAGE Çözeltileri :

- **Monomer Çözeltisi :** 58.4 g akrilamid ve 1.6 g bis-akrilamid, 200 ml distile suda çözülmüştür.

- **4xYürütücü Jel Tamponu :** 36.3 g Tris, bir miktar distile suda çözülüp HCl ile pH'ı 8.8'e ayarlanmıştır. Daha sonra distile su ile 200 ml'ye tamamlanmıştır.

- **4xYığın Jel Tamponu :** 3g Tris bir miktar distile suda çözülüp HCl ile pH'ı 6.8'e ayarlanmıştır. Daha sonra distile su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır.

- **SDS Çözeltisi (%10) :** 10 g SDS, 100 ml distile suda çözülmüştür.

- **APS Çözeltisi (%10) :** 0.1 g APS, 1 ml distile suda çözülmüştür.

- **2xÖrnek tampon :** 2.5 ml Yığın jel tamponu, 4 ml SDS (%10) çözeltisi, 2 ml gliserol, 1 ml β -Merkaptol , 0.0025 g Bromfenol mavisi karıştırılarak distile su ile 10 ml'ye tamamlanır.

- **Tank tamponu (Yürütücü Tampon) :** 3 g Tris, 14.4 g glisin, 10 ml SDS çözeltisi (%10) karıştırılarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

- **Coomassie Blue (CBB) Stain :** 1 g CBB, 50 ml metanol, 10 ml asetik asit karıştırılarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

- **Jel Destain :** 5 ml metanol, 10 ml asetik asit distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Yürütücü Jel Karışımı (% 10'luk) : 1.67 ml monomer çözeltisi, 1.25 ml 4x Yürütücü Jel Tamponu, 1.97 ml distile su, 50 µl SDS çözeltisi, 30 µl APS çözeltisi ve 10 µl TEMED karıştırılmıştır. TEMED, jeli dökmeden hemen önce ilave edilmiştir.

Yığın Jel Karışımı (% 3'lük) : 0.2 ml monomer çözeltisi, 0.5 ml 4xYığın Jel Tamponu, 1.26 ml distile su, 20 µl SDS Çözeltisi, 10 µl APS, 5 µl TEMED karıştırılmıştır. TEMED jeli dökmeden hemen önce ilave edilmiştir.

4.1.2. Metot

Ayırma ve Enzim Saflaştırma işlemleri

- Santrifüjleme
- Çöktürme
- Diyaliz
- İyon Değiştirme Kromatografisi

Saflaştırılmış enzimin molekül ağırlığı tayini için yapılan işlem

- SDS-PAGE

4.1.2.1. Santrifüjleme

Enzimler gibi büyük moleküller, bir ultrasantrifüj tarafından yaratılan yüksek santrifüj alanlarında (yerçekiminin 300000 katına kadar) çöktürülebilir. Enzim taneciğinin çökeceği hız, molekülün şekli, büyüklüğü ve çözeltinin viskozitesi gibi birçok faktöre bağlı olsa da, genel olarak molekül ağırlığı arttıkça, çökme hızı da artmaktadır. Bu metot, bir enzimi ayırmak için saflaştırma işlemlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Çünkü sadece küçük hacimler ultrasantrifüj için uygundur. Bununla beraber santrifüjleme, çökeltileri veya izolasyon sırasında çözünmeyen maddeleri uzaklaştırmak için yaygın olarak kullanılır [30].

0.5 mm yarıçaplı bir bakterinin çökme oranı 1mm/saat'den daha azdır. Bu yüzden sıvı besiyerinden bakterilerin ayrılması için en ekonomik yol santrifüj işlemidir [3].

Bu çalışmada santrifüj işlemi 12000 ve 20000 devir/dakika hızında gerçekleştirilmiştir.

4.1.2.2. Çöktürme

Yüksek tuz konsantrasyonları proteini çevreleyen su molekülleri üzerinde etkili olur ve çözünürlüğü sağlayan elektrostatik kuvvetleri değiştirirler [3]. Yüklü ve büyük moleküller saf suda çok az çözünürlüğe sahiptir. İyon ilavesi ile büyük molekül tarafından taşınan yük dağıtılarak çözünürlük artırılır. Eğer iyonik şiddet belirli bir değeri aşarsa yüklü molekül çökecektir. Çöktürme işlemi için enzimleri konsantre eden etkili bir ajan olduğundan dolayı genelde amonyum sülfat kullanılmaktadır. Amonyum sülfat, ucuzluk, daha yüksek çözünürlük ve bir çok enzim için zararsız olma gibi avantajlara sahiptir. Amonyum sülfat bazen çözeltideki istenmeyen proteinleri çöktürerek uzaklaştırmaya, bazen de istenilen proteinleri çöktürmeye yarar [3].

Genelde, amonyum sülfat çöktürmesi ile ulaşılan saflık derecesi 10 kattan daha azdır ama bu metot saflaştırma aşamalarının başlangıcında çözelti hacmini azaltmak için kullanılır. Çünkü çöktürülmüş enzim küçük hacimdeki bir tamponda tekrar çözülür [30].

Bu çalışmada, amonyum sülfat kullanılarak yapılan çöktürme işlemi sonrası, proteinler çöktürülerek çözeltiden ayrılmıştır.

4.1.2.3. Diyaliz

Bir diyaliz membranı, delikli bir elek gibi rol oynayarak, 20000 molekül ağırlığına kadar olan küresel proteinlerin geçmesine izin vermekte ama daha büyük molekülleri tutmaktadır. Diyaliz işlemi, enzimleri birbirinden ayırmak için çok sık kullanılmamakla birlikte, saflaştırma işlemleri sırasında çöktürme işleminden gelen tuzları, organik çözücülerini ya da düşük molekül ağırlıklı inhibitörleri enzim çözeltisinden uzaklaştırmada sıklıkla kullanılmaktadır [30].

Bu çalışmada 16 mm çapında 60 ml/ft kapasiteli bir diyaliz membranı kullanılarak tuzlar uzaklaştırılmıştır.

4.1.2.4. İyon Değiştirme Kromatografisi

İyon değiştirme kromatografisi zıt yüklerin elektrostatik çekimine bağlıdır ve protein moleküllerinin yüküne dayanan bir yöntemdir. Enzim molekülleri pozitif veya negatif yüklü olabilir. Net yük pH'tan etkilenir ve bu özellik proteinleri anyon ya da katyon değiştiricilerden ayırmak için kullanılır. İyon değiştiriciler genellikle,

Selüloz, Sefaroz, Sefadeks v.b malzemelerden oluşur [9,30]. En çok kullanılanlar bir anyon değiştirici olan DEAE-Selüloz ve katyon değiştirici Karboksimetil (CM) Selülozdur. DEAE grubu $[OC_2H_5NH(C_2H_5)_2]$, pH 6-8'de yüksek pozitif yüklüdür. Sonuç olarak DEAE-Selüloz bu sınırlar içindeki negatif yüklü proteinlerin kromatografisinde çok yararlıdır [8].

Saflaştırma prosedürü boyunca enzim, uygun etkileşmenin meydana geleceği (örneğin, enzim ve iyon değiştirici farklı yüklere sahiptir) düşük iyonik şiddetteki ve pH'daki bir çözeltideki iyon değiştiriciye uygulanır. İyon değiştiriciye bağlanan maddelerin serbest bırakılması, pH değişimi ile yapılabilir [9,30]. Proteinlerin kolondan elüsyonu tuz konsantrasyonu değişimi ile de sağlanabilir. NaCl konsantrasyonu yükseldikçe DEAE-Selüloza bağlanan protein, anyon (Cl^-) ile yer değiştirir [8].

Bu çalışmada DEAE-Selüloz anyon değiştiricisi kullanılarak saflaştırma yapılmıştır.

4.1.2.5. SDS-PAGE

SDS-PAGE, proteinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. SDS, hidrokarbon zinciri yuvarlak proteinlerin iç kısmındaki hidrofobik bölgelere bağlı hale gelebilen ve iyonize sülfat grubunu çevredeki maddeye çıkıntı yapar halde bırakan bir anyonik deterjandır. Bir çok SDS molekülü, bu şekilde tek bir protein molekülüne bağlanır, onun doğal şeklini değiştirir ve proteinin başlangıçtaki net yüküne bakmaksızın ona büyük bir negatif yük verir. Büyük ve küçük protein molekülleri SDS ile birleşerek hemen hemen aynı yük/kütle oranına ve aynı biçime sahip olur. Böylece farklı proteinlerin molekülleri SDS ile karıştırılıp sınırlayıcı gözenek boyutuna sahip bir destek maddesi olan poliakramid jel içinde elektroforeze tabi tutulursa farklı her bir proteindeki kompleksler boyutlarına göre ayrılacaktır. Ayrılma işlemi proteinlerin sürtünme değerlerine bağlıdır. Molekül ağırlığı, büyük proteinlerin sürtünme kuvvetleri daha büyük olacağından jelde daha fazla ilerleyemezler. Her Protein-SDS kompleksinin boyutu protein molekülünün orijinal boyutuna bağlı olduğundan molekül ağırlığı bilinen marker proteinler kullanılarak ölçeklendirilebilir böylece bir proteinin molekül ağırlığı belirlenir [8].

4.2. *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* Bakterilerinin Özellikleri

Bacillus subtilis spor halinde toz, toprak, gübre, bitki, hayvanlar, süt ve sularda bulunan bir bakteri türüdür. *Bacillus cereus* ise toprak, su, süt ve süt tozunda yaygın olarak bulunur.

Bakteriler renksiz ve şeffaf oldukları için, şekilleri ve bazı yapı özellikleri çeşitli boyama metotları ile incelenebilir. Bu yapı özelliklerinin tanınması ile bakteriler teşhis edilebilir ve sınıflandırılabilir. Boyama metotlarının en önemlisi 1884 yılında GRAM tarafından bulunan Gram Metodu'dur. Bu metoda göre bakteriler, gram pozitif ve gram negatif olmak üzere 2 büyük gruba ayrılırlar. Gram pozitif türleri saydam zeminle kontrast oluşturacak şekilde mor veya mavi rengi alırken, gram negatif türleri ise kırmızı rengi alırlar. *Bacillus* türleri gram pozitiflerdir. *Bacillus subtilis* türünün gram boyama metodu ile yapılan incelemesinde çomak şeklinde kısa ve ince olduğu gözlenmiştir.

Bakterilerin üremesi için besin maddelerine ihtiyaçları vardır. Besiyeri, bakterinin gelişmesi ve çoğalması için gerekli maddeleri içerirler. Besiyerleri katı, sıvı ve özel besiyerleri gibi çeşitlere sahiptir. Bakteriler özelliklerine göre besiyerlerinde çeşitli şekillerde üremektedirler. *Bacillus subtilis* petri kabında yuvarlak, kuru ve belirgin halde, *Bacillus cereus* ise dağınık halde üremektedir. Bakteriler sıvı besiyerinde homojen bir bulanıklık oluşturacak şekilde üreyebildiği gibi dipte çöküntü veya yüzeyde zar oluşturarak da üreyebilirler. *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* türleri yüzeyde zar oluşturacak şekilde üremektedirler.

Bakterilerin sıvı besiyerlerinde üremeleri ise çeşitli aşamalardan meydana gelmektedir. Bakteri sıvı besiyerine girdiğinde ortama uyum sağlaması için geçen kısa bir gizli aşamadan sonra ikiye bölünerek çoğalmaya başlar. Bu aşamadan sonra üreme hızının arttığı aşama başlar. Bunu, çoğalmanın sabit bir hızla devam ettiği logaritmik aşama takip eder. Daha sonra ortamdaki besinler bittiğinden bölünme hızının azaldığı aşama başlar. Bu sırada bazı bakteri hücreleri ölür. Canlı ve ölü bakterileri hücreleri arasında bir denge oluşur. Çoğalan ve ölen bakterilerin sayısı aynı olduğundan canlı bakteri sayısının sabit aşaması ortaya çıkar. Bu aşamada üreme durur. Bu aşamadan sonra ölü bakteriler fazla olduğundan canlı bakteri sayısının azalma aşaması ortaya çıkar. Bundan sonraki son aşamada sayıları azalmış olmakla birlikte bakteri hücrelerinin bir kısmı bakterinin yapısına bağlı olarak

uzunca bir süre ölmeden kalırlar. Bakterinin ölmeden kalması türün sporlu veya sporsuz olmasına bağlıdır. Sporlu bakteriler, son aşamada ölmek için spor şekillerini alırlar. Sporlanma sırasında besiyerine çeşitli metabolizma ürünleri bırakırlar. *Bacillus* türlerinin sporlanma sırasında ortama bıraktığı ürün proteaz enzimidir [31].

Bacillus subtilis'in kültür sıvılarında yüksek konsantrasyonda bulunan iki hücre dışı proteaz; nötr veya metallo proteaz ve alkalın serin proteaz veya subtilisindir. *Bacillus subtilis*'ten elde edilen proteaz enziminin 7–9 aralığında bir optimum pH'ı vardır. *Bacillus subtilis*'in alkalın proteazı en iyi pH 7–8'de üretilmektedir. Ancak pH 9.5–10.5'de kazein üzerinde optimum olarak aktiftir. *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* grubu, tıbbi ve sanayi kullanımı açısından önemlidir [13,32].

Enzim üretilmesi için *Bacillus subtilis*'in avantajlarını şu şekilde sıralayabiliriz:

- 1) Patojen değildir.
- 2) Mevcut genetik mühendisliği teknikleri ile yönlendirilebilir.
- 3) Çok kolay yetiştirilebilir.
- 4) Geniş protein türlerini salgılama yeteneği mevcuttur [5].

4.3. *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* Bakterilerinden Proteazın Kısmi Saflaştırılması

4.3.1. Besiyeri Hazırlanması ve Bakterilerin Üretilmesi

4.3.1.1. Besiyeri Hazırlanması

Yapılan çalışmada katı ve sıvı olmak üzere iki tane besiyeri hazırlanmıştır.

Katı besiyeri : 15 g bakto pepton, 5 g bakto soyton, 5 g sodyum klorür, 15 g bakto agar karışımı 1 litre distile suda çözülerek pH 7.3'e ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyeri petri kaplarına ve tüplere dökülerek katılaşması sağlanmıştır.

Sıvı besiyeri : 5 g pepton ve 3 g et ekstraktı, 1 litre suda çözülerek pH'ı 7 ye ayarlanmıştır. Ayrıca sporlandırmayı kolaylaştırması için 10 mg MnSO₄. H₂O ilave edilmiştir. Daha sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

4.3.1.2. Bakterilerin Üretilmesi

Topraktan izole edildikten sonra liyofilize edilmiş halde saklanan *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* bakterilerini içeren ampuller, elmasla çizildikten sonra çizilen yere bek alevinde ısıtılmış bir cam çubuk dokundurularak kırılmıştır. Kırılma işleminden sonra pipetle alınan çok az miktarda sıvı besiyeri ile çözülüp, süspansiyon haline geldikten sonra tamamı pipetle çekilerek sıvı besiyerine ilave edilmiştir. Daha sonra petri kaplarına hazırlanmış olan katı besiyerine azaltma metodu ile ekim yapılmıştır. Azaltma metodu için önce petri kabı tersten kalemle 4'e bölünüp sonra 1. bölgeye süspansiyon halindeki bakteri pipetle damlatılıp öze ile zigzag çizerek dağıtılmıştır. Daha sonra 1. bölgeden az miktar sıvı 2. bölgeye dağıtılmış 2. bölgeden alınan 3. bölgeye dağıtılmış ve son olarak da 3. bölgeden alınan 4. bölgeye dağıtılmıştır. Petri kapları bir gece boyunca sıcaklığı 37°C olan etüvde bekletilmiştir. Petri kaplarında üreyen kolonilerden saf kültür eldesi işlemi yapılmıştır. Bunun için tek koloniden alınan bakteri eğri katı besiyerine ekilip bir gece boyunca sıcaklığı 37°C olan etüvde bekletilmiştir. Daha sonra eğri katı besiyerinden sıvı besiyerine ekim yapılmış ve 2 gün boyunca sıcaklığı 37°C olan etüvde üremesi sağlanmıştır. Daha sonra sıvı besiyerinde üreyen bakteriler çeşitli şartlarda tutularak sporlanması sağlanmıştır.

4.3.2. Santrifüjleme

Bakterilerin üremesi ve sporlanması sona erdiğinde sıvı besiyerinden bakterilerin uzaklaştırılması için santrifüjleme işlemi yapılır. Sıvı, santrifüj tüplerine konarak 12000 devir/dakika'da 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası çöken kısım atılmıştır. Kalan sıvı kısım, süpernatantır ve aktivite tayini ve diğer saflaştırma işlemleri için buzdolabına kaldırılmıştır.

4.3.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Santrifüj işleminden sonra elde edilmiş olan süpernatant, amonyum sülfat çöktürmesine tabi tutularak içindeki proteinlerin çökerek ayrılması sağlanmıştır. Çöktürme işleminde Boraks-NaOH Tamponu 3 ve Tris-HCl tamponu kullanılmıştır. Çöktürme işlemi üç kademede gerçekleştirilmiştir. İlk kademede % 40'lık çöktürme işlemi yapılmıştır. 100 ml çözelti için 25 g amonyum sülfat ilave edilmiştir. Amonyum sülfat ilavesinden önce çözelti sıcaklığı 4°C'nin altına indirilmiştir ve ilave edildikten sonra karışım 1 saat boyunca soğuk ortamda karıştırılmıştır. Daha

sonra çözelti 20000 devir/dakika'da 20 dakika santrifüjlenerek süzüntü ve çökelti kısmı ayrılmıştır. Süzüntü kısmı S1, çökelti kısmı tampon ile çözülerek Ç1 olarak adlandırılmıştır. Aktivite ve protein tayinleri yapılarak S1 ve Ç1 çözeltileri buzluğa kaldırılmıştır. Çöktürme işlemine S1 üzerinden devam edilmiştir.

Çöktürme işleminin ikinci adımında S1 çözeltisi içindeki amonyum sülfat konsantrasyonu %70'e çıkarılmıştır. Amonyum sülfat konsantrasyonunun % 70 olması için 100 ml çözeltiye 44.2 g amonyum sülfat ilave edilmesi gerekmektedir. Daha önce % 40'lık çöktürme için ilave edilen amonyum sülfat miktarı çıkarılarak % 70'lik çöktürme için S1 çözeltisi üzerine ilave edilmesi gereken miktar bulunmuştur. Karışım soğuk ortamda 1 saat karıştırıldıktan sonra 20000 devir/dakika'da 20 dakika santrifüjlenmiştir. Süzüntü S2, çökelti tampon ile çözülerek Ç2 olarak adlandırılmıştır.

S2 ve Ç2 çözeltilerinin aktivite ve protein tayini yapıldıktan sonra çözeltiler buzluğa kaldırılmıştır. Çöktürme işlemine S2 üzerinden devam edilmiştir.

Çöktürme işleminin üçüncü adımında S2 çözeltisi içindeki amonyum sülfat konsantrasyonu %80'e çıkarılmıştır. Amonyum sülfat konsantrasyonunun % 80 olması için 100 ml çözeltiye 52.3 g amonyum sülfat ilave edilmesi gerekmektedir, daha önce % 40'lık ve % 70'lik çöktürme için ilave edilen amonyum sülfat miktarı çıkarılarak % 80'lik çöktürme için S2 çözeltisi üzerine ilave edilmesi gereken miktar bulunmuştur. Karışım soğuk ortamda 1 saat karıştırıldıktan sonra, 20000 devir/dakika'da 20 dakika santrifüjlenmiştir. Süzüntü S3, çökelti tampon ile çözülerek Ç3 olarak adlandırılmıştır. S3 ve Ç3 çözeltilerinin aktivite ve protein tayini yapıldıktan sonra çözeltiler buzluğa kaldırılmıştır.

Tüm numunelerin aktivite ve protein tayini yapıldıktan sonra istenilen aktivitenin çökeltilerde olduğu görülmüştür. Bu nedenle saflaştırma işlemlerine çökeltiler üzerinden devam edilmiştir.

4.3.4. Diyaliz

Diyaliz işlemi *Bacillus subtilis* bakteri türü için uygulanmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi yapıldıktan sonra toplanan Ç1, Ç2, Ç3 çözeltileri karıştırılarak çözelti Ç4 olarak adlandırılmıştır. Ç4 çözeltisi ve S3 çözeltisi amonyum sülfatın uzaklaştırılması amacıyla diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Diyaliz işleminden önce diyaliz tüpleri şartlandırılmıştır. Tüpler, 3-4 saat boyunca su ile yıkanarak

gliserin, tüplerden uzaklaştırılmıştır. Kükürt bileşenlerini uzaklaştırmak için 80°C’de % 0.3’lük (ağırlık/hacim) sodyum sülfid çözeltisinde 1 dakika kaynatılmıştır. 60°C’de 2 dakika sıcak distile su ile yıkandıktan sonra % 0.2’lik (hacim/hacim) sülfirik asit çözeltisi ile bir süre temas ettirilmiştir. Son olarak sıcak distile su ile yıkanarak asit uzaklaştırılmıştır. Şartlanmış olan tüplere Ç4 ve S4 çözeltileri konularak Boraks-NaOH Tamponu 3’e karşı diyalize tabi tutulmuşlardır. 1 saat sonra diyaliz tamponu değiştirilmiştir. Saatte bir tampon Nessler reaktifi ile kontrol edilerek diyaliz işleminin süresi belirlenmiştir. Diyaliz sonrası her iki numune santrifüj edilmiştir. Diyaliz öncesi ve sonrasında aktivite ile protein değerleri ölçülmüştür.

4.3.5. İyon Değiştirme Kromatografisi

İyon değiştirme kromatografisi, *Bacillus subtilis* türü bakteri ile yapılan çalışma için uygulanmıştır. Kolon dolgu maddesi olarak DEAE-Selüloz iyon değiştiricisi kullanılmıştır. Bu dolgu maddesi literatürde proteaz enziminin saflaştırılmasında en çok kullanılan dolgu maddesidir bu yüzden tercih edilmiştir. Kolonun yüksekliği 60 cm, çapı 2 cm’dir. Kolon işlem öncesi Boraks-NaOH Tamponu 3 ile şartlandırılmıştır. Şartlandırma işlemine üstten beslenen tampon ile alttan toplanan tamponun pH’ı aynı olana kadar devam edilmiştir. Daha sonra kolon hızı, 30 dakikada 5 ml fraksiyon toplanacak şekilde ayarlanıp numune kolono beslenmiştir. Numune beslendikten sonra aynı seviyeyi koruyacak şekilde kolon işleminin sonuna kadar kolona Boraks-NaOH Tamponu 3 ilave edilmiştir. Bütün işlemler +4°C’de gerçekleştirilmiştir. Son fraksiyondaki protein miktarı sıfır oluncaya kadar fraksiyon toplama işine devam edilmiştir. Fraksiyonların aktivite ve protein değerleri ölçülerek buzdolabına kaldırılmıştır.

Şekil 4.1’de bu çalışmada uygulanmış olan saflaştırma işlemlerinin adımları görülmektedir.

4.4. Aktivite ve Protein Tayini

4.4.1 Aktivite Tayini

Tüm saflaştırma işlemlerinde aktivite tayini yapılmıştır. Aktivite tayini için iki yöntem denenmiştir. Aktivite değerleri için trosin standardı kullanılarak standart eğri çizilmiştir.

Aktivite Tayini 1: Aktivite tayini 35°C’de gerçekleştirilmiştir. Tüplere 6’şar ml Kazein Substrat Çözeltisi 1’den konularak 5 dakika boyunca 35°C’lik su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra 1 ml enzim çözeltisi ilave edilerek 10 dakika boyunca reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu sürenin sonunda 6.2 ml TCA Karışım Çözeltisi 1, ilave edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır ve 10 dakika su banyosunda bekletilerek mavi bantlı süzgeç kağıdından süzölmüştür. Şahit numune aynı şartlar altında enzim numunesi konmayarak hazırlanmıştır. Absorbans değeri spektrofotometrede 275 nm’de ölçölmüştür. Ölçölen aktivite değeri aşağıdaki formülle hesaplanmıştır [29].

Aktivite tayini 2 : Aktivite tayini 30°C’de gerçekleştirilmiştir. Tüplere 2.5’er ml substrat çözeltisi 2’den konularak 5 dakika boyunca 30°C’lik su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra 0.5 ml enzim çözeltisi ilave edilerek 10 dakika boyunca reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu sürenin sonunda reaksiyon 2.5 ml TCA Karışım Çözeltisi 2 ilave edilerek sonlandırılmıştır ve 20 dakika su banyosunun içinde bekletilerek mavi bantlı süzgeç kağıdından süzölmüştür. Şahit numune aynı şartlar altında enzim numunesi konmayarak hazırlanmıştır. Absorbans değeri spektrofotometrede 275 nm’de ölçölmüştür. Ölçölen aktivite değeri aşağıdaki formülle hesaplanmıştır [33].

Aktivite değeri için trosin standardı kullanılarak standart eğri çizilmiştir. Bunun için çözelti konsantrasyonu 0.2 M olacak şekilde, 21 mg trosin 100 ml TCA çözeltisinde çözüldükten sonra belirli oranlarda seyreltilerek standartlar elde edilmiştir. Trosin standart eğrisi Şekil A.1’de verilmiştir.

$$\text{Aktivite (U/ml)}[(\mu\text{mol} / \text{dak}) / \text{ml}] = (A_{275\text{Numune}}/A_{275\text{Şahit}} 1\mu\text{mol Trosin})*(1/t)*(V_1 / V_2)*(Sey.Or.)$$

t = Reaksiyon zamanı (dakika)

V₁ = Reaksiyon hacmi (ml)

V₂ = Enzim hacmi (ml)

A_{275 Numune} = Aktivite tayininden elde edilen absorbans değeri

A_{275Şahit} 1µmol trosin = Trosin standart eğrisinden elde edilen eğim (Abs/ µmol/ml)

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mg)} = [\text{Aktivite (U/ml)}] / [\text{Protein (mg/ml)}]$$

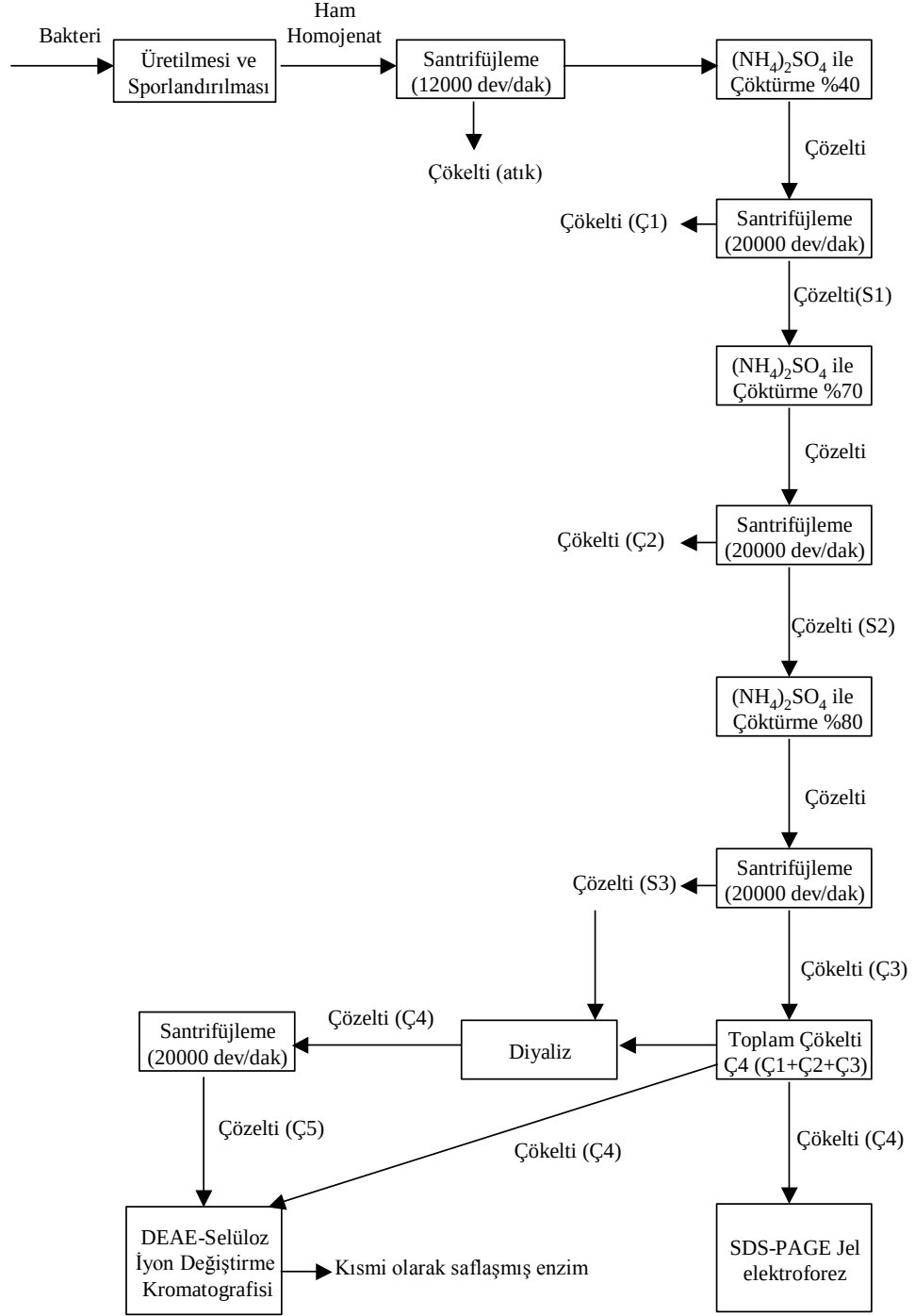
4.4.2. Protein Tayini

Protein tayini için çalışmanın ilk başında BCA ve UV absorbsiyon (280 nm) yöntemleri denenmiştir. Elde edilen sonuçlar aynı olduğu için UV absorbsiyon (280 nm) yöntemi ile işlemlere devam edilmiştir.

UV absorbsiyon yöntemi ile protein tayini, bütün numunelere hiçbir işlem uygulamadan yapılmıştır. Numunelerin protein (absorbans) değerleri spektrofotometrede 280 nm’de ölçülmüştür. Şahit olarak, çalışma için seçilen tampon (Boraks-NaOH Tamponu 3 veya Tris-HCl Tamponu) kullanılmıştır. Numunelerin protein değerleri ölçülürken absorbans değerleri 1’den büyük çıktığında çalışılan tamponla seyreltme yapılmıştır.

Protein değerlerinin hesabı için BSA standardı kullanılarak standart eğri çizilmiştir. İlk olarak çalışılan tamponun ml’sinde 0.2-1 mg BSA olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan standart çözeltilerin absorbans değerleri kullanılan tampona karşı spektrofotometrede 280 nm’de ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri ile standart eğri çizilmiştir. Elde edilen standart eğri Şekil A.2’de verilmiştir.

BCA yöntemi ile protein tayini yapılırken 100 µl örnek ve 2 ml Çözelti C karıştırılarak 37°C’de 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 562 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Protein değerlerinin hesabı için BSA standardı kullanılarak standart eğri çizilmiştir. Bunun için 1ml distile suda 0.2-1 mg BSA olacak şekilde hazırlanan BSA standartları ve 2 ml Çözelti C karıştırılarak 37°C’de 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 562 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Şahit olarak 100 µl su ve 2 ml Çözelti C, 37°C’de 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 562 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen değerlerle çizilmiş standart eğri Şekil A.3’de verilmiştir [34].



Şekil 4.1. *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* Bakterilerinden Proteazın Saflaştırma İşlemleri

4.5. *Bacillus subtilis* Bakteri Türü İle Yapılan Çalışma

Bacillus subtilis bakteri türü ile dört farklı çalışma yapılmıştır.

4.5.1. Çalışma 1

Bu çalışmada *Bacillus subtilis* bakteri türü Bölüm 4.3.1.2’de anlatıldığı gibi sırası ile petri kabı ve eğri katı besiyerine ekildikten sonra içlerinde 100’er ml sıvı besiyeri bulunan dört tane 250 ml’lik erlene ekim yapılmıştır. Bakteri ekilmiş sıvı besiyerleri sıcaklığı 37°C olan etüve kaldırılmıştır. 48 saatten sonra çeşitli saat aralıklarında 5’er ml numune alınmıştır. Alınan numuneler santrifüjlenerek çökelti kısmı atılmış ve süzüntü kısmına aktivite ve protein tayini yapılmıştır. Daha sonra süzüntüler buzdolabına kaldırılmıştır. 174. saatte son numune alınarak erlenlerde kalan sıvı etüvden çıkarılarak buzdolabına kaldırılmıştır. Dolaba kaldırılan erlenlerdeki sıvı, 2 gün sonra santrifüjlenerek aktivite ve protein tayini yapılmıştır. Bu çalışmada bütün aktivite tayinleri bölüm 4.4.1’de anlatıldığı gibi Aktivite Tayini 1 yöntemi ile yapılmıştır. Çalışma 1’den elde edilen sonuçlara ait değerler, Tablo 4.1 ve Şekil 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Spesifik Aktivite-Zaman Değerleri (Çalışma 1)

<i>Bacillus subtilis</i>	Hacim (ml)	Protein (1/20) (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Saat						
48	100	0.544	124.685	1087	12468	11.467
54	100	0.554	138.307	1108	13831	12.486
72	100	0.636	149.063	1273	14906	11.714
78	100	0.646	139.808	1291	13981	10.829
96	100	0.714	143.369	1429	14337	10.035
102	100	0.744	151.754	1488	15175	10.197
120	100	0.821	177.850	1641	17785	10.837
126	100	0.878	177.086	1757	17709	10.081
168	100	0.933	206.193	1867	20619	11.046
174	100	0.910	224.079	1820	22408	12.313
222	100	0.933	135.086	1865	13509	7.243

NOT: (1/20) seyreltme oranıdır.

Tabloda görülen değerler ekim yapılan 4 erlenin ortalama değerleridir. Bu değerlere göre 54 saat sonra elde edilen enzim maksimum spesifik aktiviteye ulaşmıştır. Bu yüzden 54. saatten sonra bakterileri besiyerinde bekletmeye gerek yoktur. Bu süre sonunda bakteriler santrifüjle uzaklaştırılabilir.



Şekil 4.2 Spesifik Aktivite-Zaman Eğrisi (*Bacillus subtilis*)

4.5.2. Çalışma 2

Bu çalışmada *Bacillus subtilis* bakteri türü Bölüm 4.3.1.2’de anlatıldığı gibi sırasıyla petri kabı ve eğri katı besiyerine ekildikten sonra içlerinde 100’er ml sıvı besiyeri bulunan iki tane 500’lik erlene ekilmiştir. Erlenler çalkalayıcıya konarak sıcaklığı 37°C olan odada 168 saat bekletilmiştir. 30. saatten itibaren çeşitli zaman aralıklarında 4’er ml numune alınarak santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası çöken kısım atılmış süzöntü kısmı aktivite ve protein tayinleri yapıldıktan sonra dolaba kaldırılmıştır. Bu çalışmada bütün aktivite tayinleri bölüm 4.4.1’de anlatıldığı gibi Aktivite Tayini 1 yöntemi ile yapılmıştır. 168. saatte son numune alınarak erlenlerde kalan sıvı çalkalayıcıdan çıkarılarak buzdolabına kaldırılmıştır. Dolaba kaldırılan erlenlerdeki sıvı, 2 gün sonra santrifüjlenerek aktivite ve protein tayini yapılmıştır. Çeşitli saatlerde alınan numunelerden elde edilen sonuçlara ait değerler Tablo 4.2 ve Şekil 4.3’de verilmiştir.

Dolaba kaldırılan bütün numuneler ve erlendeki numune birleştirilip süpernatant olarak adlandırılmıştır ve aktivite ve protein değerleri ölçülmüştür. Bu çalışmada bütün aktivite tayinleri bölüm 4.4.1’de anlatıldığı gibi Aktivite Tayini 1 yöntemi ile yapılmıştır. Elde edilen süpernatant üzerinden saflaştırma işlemlerine devam

edilmiştir. Elde edilen süpernatanta bölüm 4.3.3’de anlatıldığı gibi kademeli olarak %40, %70, %80’lik amonyum sülfat çöktürmesi işlemi uygulanmıştır. Bu çalışmada Boraks-NaOH Tamponu 3 kullanılmıştır. Çöktürme işlemi sonucu elde edilen S1, S2, S3 ve Ç1, Ç2, Ç3 çözeltilerine aktivite ve protein tayini yapılmıştır. Ç1, Ç2, Ç3 çözeltileri birleştirilerek Ç4 olarak adlandırılmıştır. Ç4 çözeltisine tekrar aktivite ve protein tayini yapılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sonunda elde edilen S3 ve Ç4 çözeltileri diyaliz işlemine tabi tutulmuştur.

Diyaliz işlemi iki defa uygulanmıştır. İlk önce diyaliz tüpleri Bölüm 4.3.4’de anlatıldığı gibi şartlandırılarak kullanıma uygun hale getirilmiştir.

Diyaliz 1: Hazırlanan diyaliz tüplerinin birine 30 ml S3, diğerine 5 ml Ç4 çözeltisi konularak sırasıyla, 3 litre ve 500 ml Boraks-NaOH Tamponu 2’ye karşı 1 gece boyunca diyaliz edilmişlerdir. Diyaliz tamponu 1 saat sonra değiştirilmiştir. 1 gece sonunda diyaliz tamponu Nessler reaktifi ile kontrol edilerek diyaliz işlemine son verilmiştir. Diyaliz işleminden sonra her iki numune santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden önce ve sonra aktivite ve protein değerleri ölçülmüştür. Santrifüj sonrası elde edilen çözeltiler S4 ve Ç5 (1) olarak adlandırılmıştır. Santrifüj işleminden sonra çöken kısım, aktivitesi sıfır olduğu için atılmıştır. S4 ve Ç5 (1) çözeltileri, S3 ve Ç4 çözeltilerinin diyaliz sonrası santrifüj sonrası süzüntüleridir.

Diyaliz 2: Hazırlanan diyaliz tüpüne 2 ml Ç4 çözeltisi konarak 200 ml Boraks-NaOH Tamponu 3’e karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz tamponu 1 saat sonra değiştirilmiştir. Tampon saatte bir Nessler reaktifi ile kontrol edilerek diyaliz 2 saat sürdürülmüştür. Ele geçen çözelti santrifüjlenmiştir. Santrifüj öncesi ve sonrasında aktivite ve protein değerleri ölçülmüştür. Santrifüj sonrası elde edilen çözelti Ç5 (2) olarak adlandırılmıştır. Ç5 (2) çözeltisi Ç4 çözeltisinin diyaliz sonrası santrifüj sonrası süzüntü kısmıdır. Çökelti kısmı, aktivitesi sıfır olduğu için atılmıştır.

Bu çalışmada yapılan saflaştırma işlemlerinde elde edilen değerler Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Spesifik Aktivite-Zaman Değerleri (Çalışma 2)

<i>Bacillus subtilis</i>	Hacim (ml)	Protein (1/20) (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Saat						
30	100	0.578	131.783	1156	13178	11.400
48	100	0.632	142.495	1265	14250	11.266
54	100	0.625	142.150	1250	14215	11.369
72	100	0.623	137.141	1246	13714	11.004
78	100	0.617	134.052	1235	13405	10.856
96	100	0.607	135.149	1215	13515	11.125
144	100	0.592	143.484	1184	14348	12.119
150	100	0.601	138.287	1203	13829	11.498
168	100	0.630	140.528	1259	14053	11.159
216	100	0.614	140.373	1229	14037	11.426

NOT: (1/20) seyreltme oranıdır.

Tablo 4.2’de görülen değerler ekim yapılan 2 erlenin ortalama değerleridir. 2 erlene de aynı şartlar altında ekim yapılmıştır ve her iki erlen de 144. saatte, maksimum spesifik aktiviteye ulaşmıştır. Bu yüzden 144. saatten sonra bakterileri besiyerinde bekletmeye gerek yoktur. Bu süre sonunda bakteriler santrifüjle uzaklaştırılabilir.

Tablo 4.3. *Bacillus subtilis* Bakteri Türünden Proteazın Kısmi Saflaştırılması

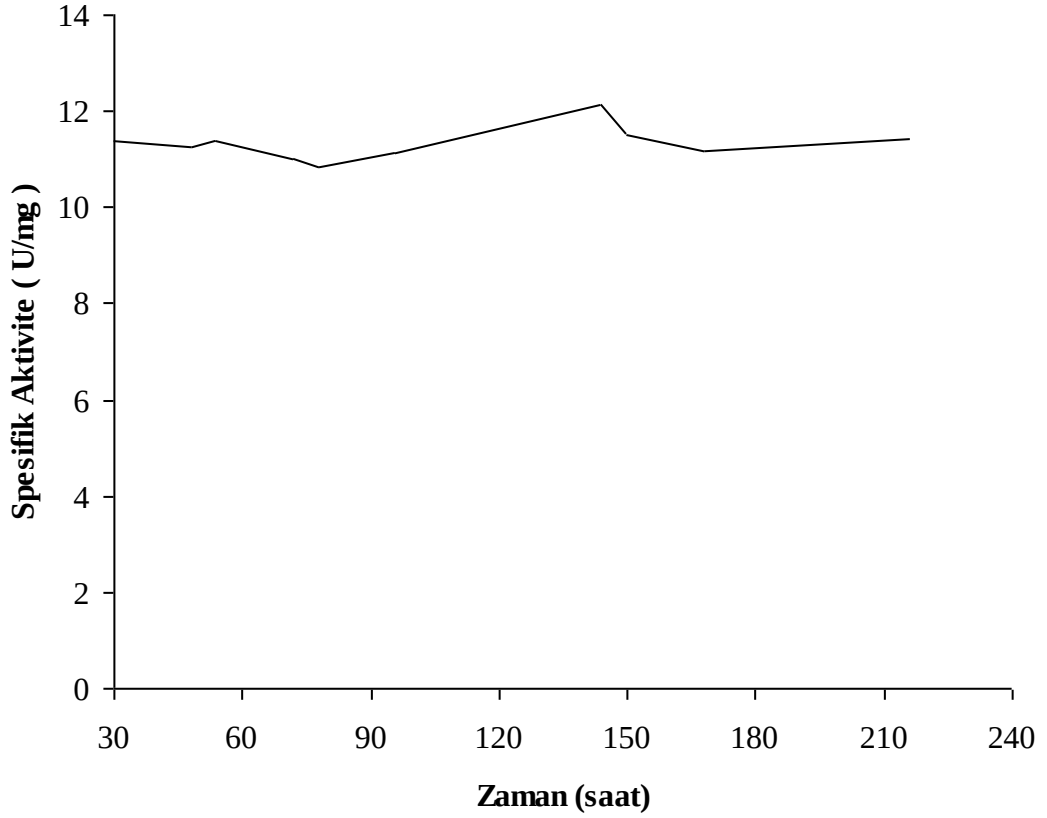
2. Çalışma Tampon: NaOH-Boraks	Hacim (ml)	Protein (1/20) (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Süpernatant	133	0.643	142	1710	18886	11
% 40 çöktürme Ç1	10	0.441	84	88	840	10
%40 Çöktürme S1	135	0.524	135	1415	18225	13
% 70 Çöktürme Ç2	12	0.693	93	166	1116	7
% 70 Çöktürme S2	137	0.484	117	1326	16029	12
% 80 Çöktürme Ç3	13	0.888	132	231	1716	7
% 80 Çöktürme S3	132	0.392	103	1035	13596	13
1. Diyaliz Öncesi (Ç4)	5	0.58	75	58	375	6
Diyaliz Sonrası Santrifüj Öncesi Ç4	8	0.229	16	37	128	3

Tablo 4.3 *Bacillus subtilis* Bakteri Türünden Proteazın Kısmi Saflaştırılması
(Devamı)

2. Çalışma Tampon NaOH-Boraks	Hacim (ml)	Protein (1/20) (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Diyaliz Sonrası Santrifüj Sonrası Ç5 (1)	7	0.118	10	17	70	4
Diyaliz Öncesi S3	30	0.379	98	227	2940	13
Diyaliz Sonrası Santrifüj Öncesi S3	69	0.027	3	37	207	6
Diyaliz Sonrası Santrifüj Sonrası S4	65	-	-	-	-	-
2. Diyaliz Öncesi Ç4	2	0.580	75	23	150	6
Diyaliz Sonrası Santrifüj Öncesi Ç4	3.8	0.232	23	18	86	5
Diyaliz Sonrası Santrifüj Sonrası Ç5 (2)	2.8	0.139	22	8	60	8

NOT: (1/20) seyreltme oranıdır.

Elde edilen değerlere göre süpernatantın spesifik aktivitesi 11 U/mg ve % 40'lık çöktürme sonrası çökeltinin spesifik aktivitesi 10 U/mg olarak bulunmuştur. % 40'lık ve % 80'lik çöktürme sonrası süzöntünün spesifik aktivitesi ise 13 U/mg olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre çöktürme işleminde enzimin bir kısmı süzöntüde kalmıştır ve süzöntüye göre yaklaşık 1.2 kat saflaşma sağlanmıştır. Diyaliz öncesi spesifik aktivitesi 6 U/mg iken 1. diyaliz sonrası 4 U/mg olmuştur. Yani 1. diyalizde aktivite kaybedilmiştir. Yapılan 2. diyaliz sonrası çökeltinin spesifik aktivitesi 8 U/mg olarak bulunmuştur. Sonuçta çökeltiye göre 2. diyalizde 1.5 kat saflaşma sağlanmıştır.



Şekil 4.3 Spesifik Aktivite-Zaman Eğrisi (*Bacillus subtilis*)

4.5.3. Çalışma 3

Bu çalışmada *Bacillus subtilis* bakteri türü Bölüm 4.3.1.2.'de anlatıldığı gibi sırasıyla petri kabı ve eğri katı besiyerine ekildikten sonra içlerinde 400'er ml sıvı besiyeri bulunan iki tane 500'lik erlene ekilmiştir. Erlenler sıcaklığı 37°C olan etüvde 66 saat bekletildikten sonra etüvden çıkarılmış ve 100 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra numuneler santrifüjlenerek çökelti kısmı (bakteri kısmı) atılır. Süzüntüler birleştirilerek süpernatant olarak adlandırılmıştır. Elde edilen süpernatantın aktivite ve protein değerleri ölçüldükten sonra buzdolabına kaldırılmıştır. Bu çalışmada bütün aktivite tayinleri, Bölüm 4.4.1'de anlatıldığı gibi Aktivite Tayini 1 yöntemi ile yapılmıştır. Daha sonra süpernatant üzerinden saflaştırma işlemine devam edilmiştir. Bu çalışmada süpernatant 2. çalışmada elde edilen değerlere dayanarak sadece % 70'lik amonyum sülfat çöktürmesine tabi tutulmuştur. Çöktürme işlemi, Bölüm 4.3.3'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesinde tampon olarak Boraks-NaOH tamponu 3 kullanılmıştır. Çöktürme sonrası elde edilen S1 ve Ç1 çözeltilerinin aktivite ve protein değerleri ölçüldükten sonra buzluga kaldırılmıştır.

Çöktürme işleminden sonra S1 ve Ç1 çözeltileri diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. İlk önce diyaliz tüpleri Bölüm 4.3.4’de anlatıldığı gibi şartlandırılarak kullanıma uygun hale getirilmiştir. Hazırlanan tüplere 10 ml S1 ve 10 ml Ç1 çözeltilerinden konularak 1000 ml Boraks-NaOH Tamponu 3’e karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz işlemi 2 saat sürdürülmüştür. Diyaliz sonrası her iki numune santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen çözeltiler S2 ve Ç2 olarak adlandırılmıştır. Santrifüj öncesi ve sonrası numunelerin aktivite ve protein değerleri ölçülerek numuneler buzluğa kaldırılmıştır.

Elde edilen değerler Tablo 4.4’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre çöktürme öncesi süpernatantın spesifik aktivitesi 11 U/mg’dır. % 70’lik çöktürme sonrası süzüntünün spesifik aktivitesi 12 U/mg, çökeltinin ki ise 6 U/mg olarak bulunmuştur. Diyaliz sonrası ise süzüntünün spesifik aktivitesi 13 U/mg ve çökeltinin ki ise 10 U/mg olarak bulunmuştur. Buna göre spesifik aktivite, süzüntüye göre çöktürme sonrası 1.1 ve diyaliz sonrası 1.2 kat artmıştır.

Diyaliz işleminden sonra iyon değiştirme kromatografisi işlemine devam edilmiştir. İyon değiştirme kromatografisi üç defa yapılmıştır. Kolonda dolgu maddesi olarak DEAE-Selüloz kullanılmıştır. İyon değiştirme kromatografisi işlemi Bölüm 4.3.5’de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Kolon Çalışması 1: Bu çalışmada kolona çöktürme sonrası elde edilen Ç1 çözeltilisinden 10 ml’e beslenmiştir. Kolon hızı, ortalama 30 dakikada 5 ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Kolona numune beslendikten sonra seviyeyi koruyacak şekilde Boraks-NaOH Tamponu 3 beslenmiştir. Çalışma sonunda toplam 32 numune alındıktan sonra aktivite ve protein değerleri ölçülmüştür. Kolon çalışması 1’in sonuçları Tablo 4.5 ve Şekil 4.4’de verilmiştir. Kolon çalışmasında toplanan fraksiyonlardan yüksek aktiviteye sahip olanlar birleştirilerek aktivite ve protein değerleri tekrar ölçülmüştür.

Kolon Çalışması 2 : Bu çalışmada şartlanmış olan kolona diyaliz sonrası elde edilen S2 çözeltilisinden 10 ml beslenmiştir. Kolon hızı ortalama 30 dakikada 5 ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Kolona numune beslendikten sonra seviyeyi koruyacak şekilde Boraks-NaOH Tamponu 3 ve 3 M NaCl Çözeltisi karışımı beslenmiştir. Çalışma sonunda 14 numune alındıktan sonra aktivite ve protein değerleri ölçülmüştür. Kolon Çalışması 2’nin sonuçları Tablo 4.6 ve Şekil 4.5’de verilmiştir.

Kolon çalışmasında, toplanan fraksiyonlardan yüksek aktiviteye sahip olanlar birleştirilerek aktivite ve protein değerleri tekrar ölçölmüştür.

Kolon alışması 3: Bu çalışmada kolona çöktürme sonrası elde edilen 1 çözeltisinden 10 ml'e beslenmiştir. Kolon hızı, ortalama 30 dakikada 5 ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Kolona numune beslendikten sonra seviyeyi koruyacak şekilde Boraks-NaOH Tamponu 3 ve 3 M NaCl özeltisi karışımı beslenmiştir. Çalışma sonunda toplam 24 numune alındıktan sonra aktivite ve protein değerleri ölçölmüştür.

Kolon alışması 3'ün sonuçları Tablo 4.7 ve Şekil 4.6'da verilmiştir. Kolon çalışmasında, toplanan fraksiyonlardan yüksek aktiviteye sahip olanlar birleştirilerek aktivite ve protein değerleri tekrar ölçölmüştür.

Tablo 4.4. *Bacillus subtilis* Bakteri Türünden Proteazın Kısmi Saflaştırılması

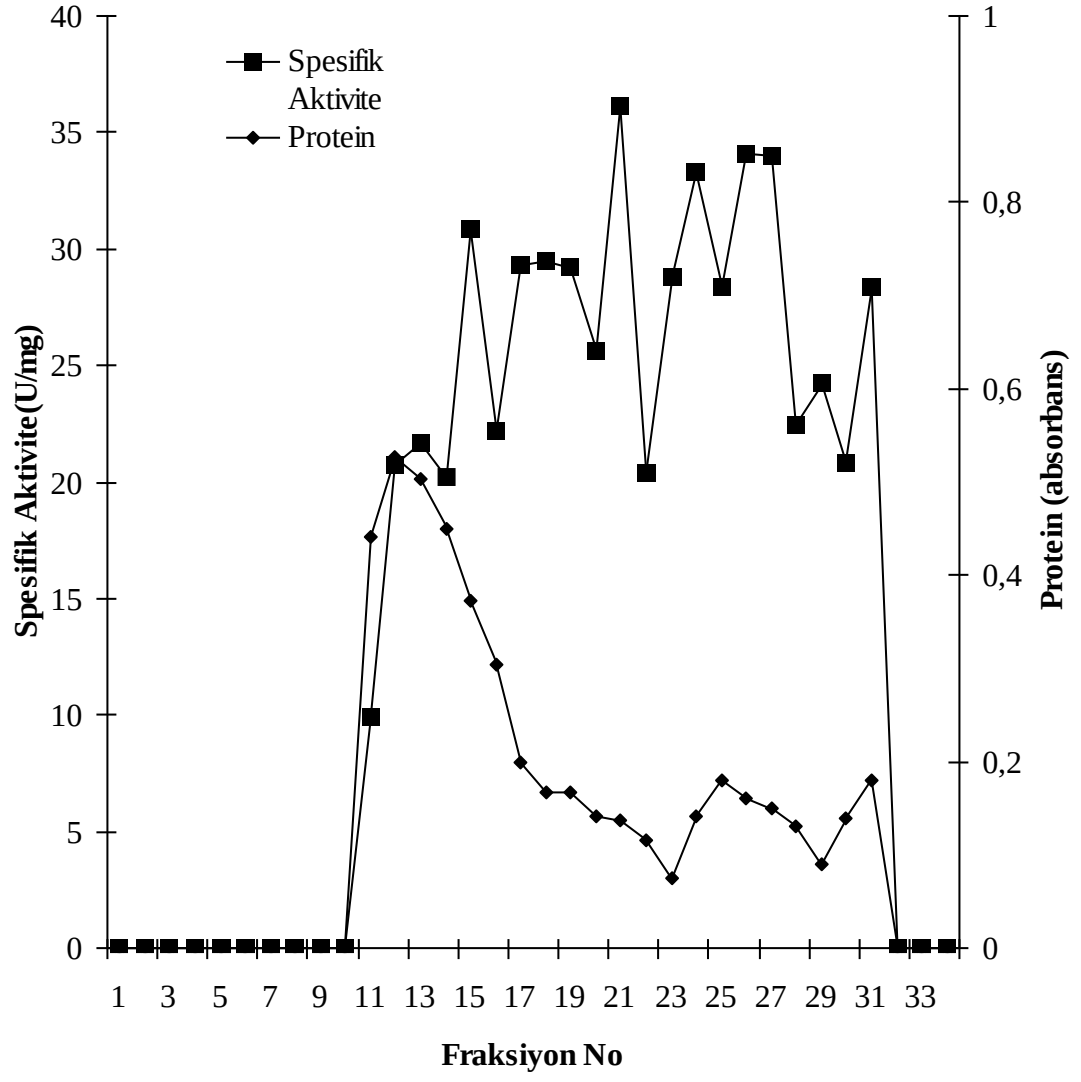
3. Çalışma Tampon NaOH-Boraks	Hacim (ml)	Protein (1/20) (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Süpernatant	582	0.881 (1/25)	243	12818	141426	11
% 70 çöktürme Ç1	42	0.692	81	581	3402	6
%70 Çöktürme S1	663	0.840	198	11138	131274	12
Diyaliz Sonrası Santrifüj Öncesi Ç1	12	0.527	68	126	816	6
Diyaliz Sonrası Santrifüj Öncesi S1	15	0.370	84	111	1260	11
Diyaliz Sonrası Santrifüj Sonrası Ç2	10	0.351	68	70	680	10
Diyaliz Sonrası Santrifüj Sonrası S2	13	0.338	90	88	1170	13

NOT: (1/20) ve (1/25) seyreltme oranlarıdır.

Tablo 4.5. İyon Değişirme Kromatografisi Değerleri (Kolon 1 Değerleri)

Fraksiyon No	Protein (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Fraksiyon No	Protein (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)
1	0	0	0	18	0.167	4.914	29
2	0	0	0	19	0.168	4.914	29
3	0	0	0	20	0.142	3.640	26
4	0	0	0	21	0.136	4.914	36
5	0	0	0	22	0.116	2.366	20
6	0	0	0	23	0.076	2.184	29
7	0	0	0	24	0.142	4.732	33
8	0	0	0	25	0.180	5.096	28
9	0	0	0	26	0.160	5.460	34
10	0	0	0	27	0.150	5.096	34
11	0.441	4.368	10	28	0.130	2.912	22
12	0.527	10.920	21	29	0.090	2.184	24
13	0.503	10.920	22	30	0.140	2.912	21
14	0.450	9.100	20	31	0.180	5.096	28
15	0.372	11.466	31	32	0	0	0
16	0.303	6.734	22	33	0	0	0
17	0.199	5.824	29	34	0	0	0

Toplanan fraksiyonlardan en yüksek spesifik aktiviteye sahip olan 9 tanesi karıştırılarak elde edilen karışımın spesifik aktivitesi yaklaşık 32 U/mg olarak ölçülmüştür. Kolon 1 sonrası yaklaşık 3 kat saflaşma sağlanmıştır. Çalışmada 11-31 arası fraksiyonlar proteaz aktivitesi göstermiştir. Grafikte proteinlerin, tam olarak spesifik aktivite pikinin altında pik vermemesi enzimin tam olarak saf olmamasındandır.

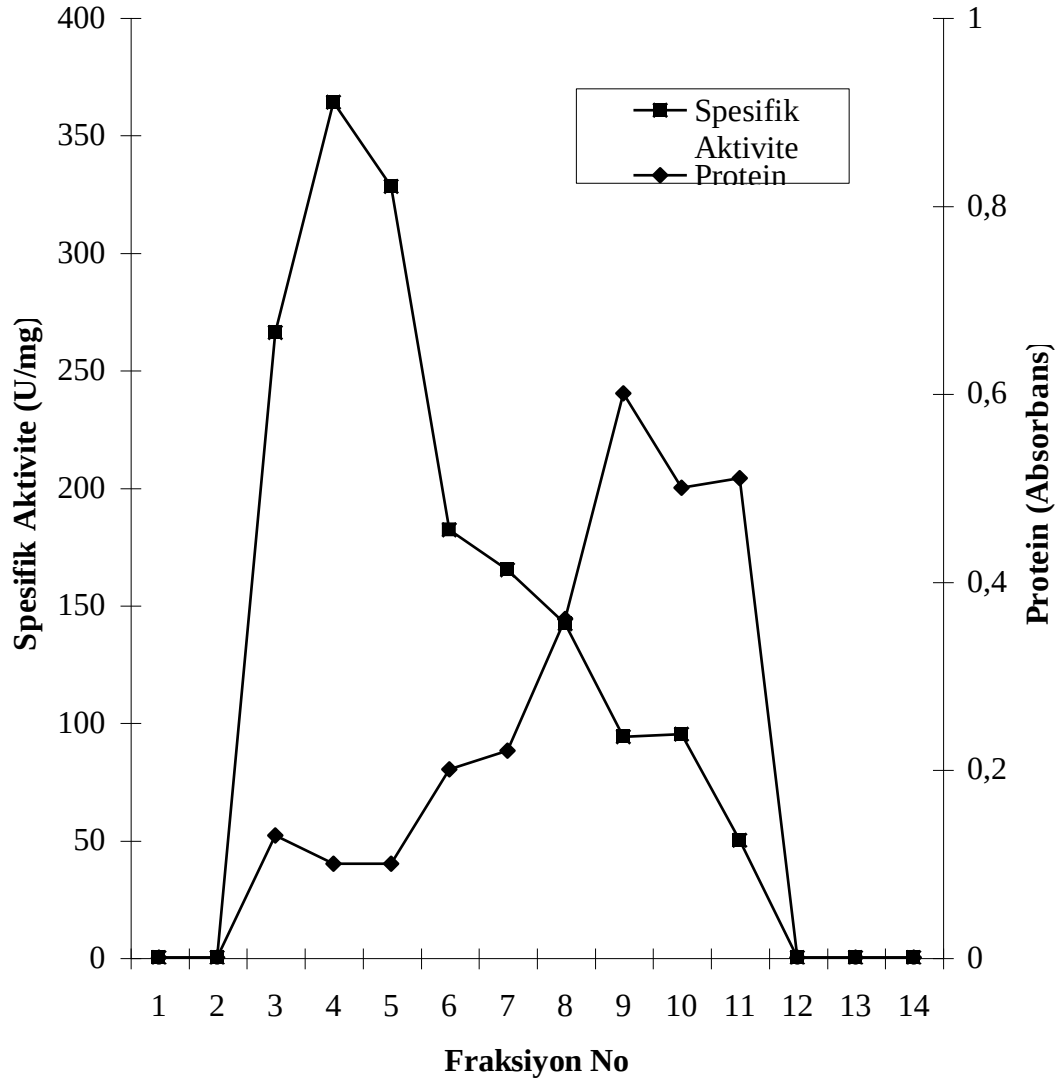


Şekil 4.4 İyon Değişirme Kromatografisi (Kolon 1)

Tablo 4.6. İyon Değişirme Kromatografisi Değerleri (Kolon 2 Değerleri)

Fraksiyon No	Protein (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)
1	0	0	0
2	0	1.820	0
3	0.013	3.458	266
4	0.010	3.640	364
5	0.010	3.276	328
6	0.020	3.640	182
7	0.022	3.640	165
8	0.036	5.096	142
9	0.060	5.642	94
10	0.050	4.732	95
11	0.051	2.548	50
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0

Toplanan enzim fraksiyonlarından en yüksek spesifik aktiviteye sahip olan 3 tanesi karıştırılarak elde edilen karışımın spesifik aktivitesi yaklaşık 319 U/mg'dır. Kolon 2 sonrası süpernatanta göre yaklaşık 29 kat saflaştırma sağlanmıştır. Çalışmada 3-8 arası fraksiyonlar proteaz aktivitesi göstermiştir. Grafikte proteinlerin, tam olarak spesifik aktivite pikinin altında pik vermemesi enzimin tam olarak saf olmamasındandır.

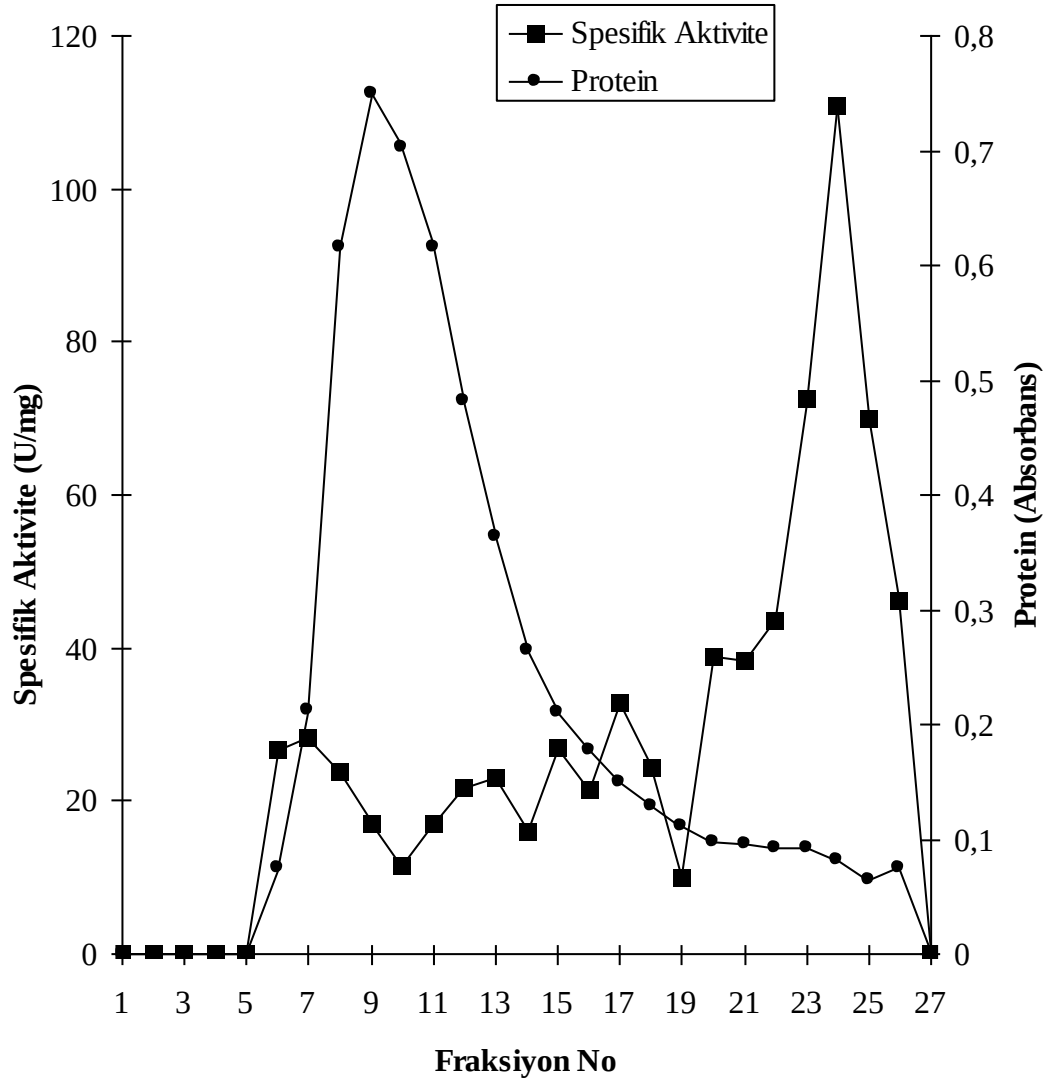


Şekil 4.5 İyon Değişirme Kromatografisi (Kolon 2)

Tablo 4.7. İyon Değişirme Kromatografisi Değerleri (Kolon 3 Değerleri)

Fraksiyon No	Protein (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Fraksiyon No	Protein (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)
1	0	0	0	15	0.211	5.642	27
2	0	0	0	16	0.178	3.822	21
3	0	0	0	17	0.15	4.914	33
4	0	0	0	18	0.128	3.094	24
5	0	0	0	19	0.111	1.092	10
6	0.075	2.002	27	20	0.098	3.822	39
7	0.213	6.006	28	21	0.095	3.640	38
8	0.616	14.560	24	22	0.092	4.004	44
9	0.749	12.740	17	23	0.093	6.734	72
10	0.702	8.008	11	24	0.082	9.100	111
11	0.615	10.374	17	25	0.065	4.550	70
12	0.482	10.374	22	26	0.075	3.458	46
13	0.363	8.372	23	27	0	0	0
14	0.265	4.186	16				

Toplanan enzim fraksiyonlarından en yüksek spesifik aktiviteye sahip 3 tanesi karıştırılarak elde edilen enzimin spesifik aktivitesi yaklaşık 84 U/mg olarak ölçülmüştür. Bu değer süpernatantın spesifik aktivitesi ile karşılaştırılırsa, Kolon 3 sonrası yaklaşık 8 kat saflaştırma sağlanmıştır. Çalışmada, 17-26 arası fraksiyonlar proteaz aktivitesi göstermiştir. Grafikte proteinlerin, tam olarak spesifik aktivite pikinin altında pik vermemesi enzimin tam olarak saf olmamasındandır.



Şekil 4.6 İyon Değiştirme Kromatografisi (Kolon 3)

4.5.4. Çalışma 4

Bu çalışmada *Bacillus subtilis* bakteri türü Bölüm 4.3.1’de anlatıldığı gibi sırasıyla petri kabı ve eğri katı besiyerine ekildikten sonra içinde 800 ml sıvı besiyeri bulunan 1000 ml’lik erlene ekilmiştir. Erlen sıcaklığı 37°C olan etüvde 66 saat bekletildikten sonra etüvden çıkarılmış ve 100 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra numuneler santrifüjlenerek çökelti kısmı (bakteri kısmı) atılmıştır. Süzüntü süpernatant olarak adlandırılmıştır. Elde edilen süpernatantın aktivite ve protein değerleri ölçüldükten sonra buzdolabına kaldırılmıştır. Aktivite ölçümü Bölüm 4.4.1’de anlatıldığı gibi iki şekilde de (Aktivite Tayini 1 ve Aktivite Tayini 2) yapılarak iki yöntem karşılaştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlar Tablo 4.8’de gösterilmiştir. Buna göre Aktivite Tayini 1 ile spesifik aktivite 15 U/mg Aktivite Tayini 2 ile spesifik aktivite 13 U/mg olarak bulunmuş ve iki yöntem arasında çok büyük bir fark olmadığı gözlenmiştir. Çalışmada daha sonra bütün aktivite tayinleri Aktivite Tayini 2 ile yapılmıştır. Süpernatant üzerinden saflaştırma işlemine devam edilmiştir.

Elde edilen süpernatanta Bölüm 4.3.3’de anlatıldığı gibi kademeli olarak % 40, % 70, % 80’lik amonyum sülfat çöktürmesi işlemi uygulanmıştır. Bu çalışmada Tris-HCl Tamponu kullanılmıştır. Çöktürme işlemi sonucu elde edilen S1, S2, S3 ve Ç1, Ç2, Ç3 çözeltilerine aktivite ve protein tayini yapılmıştır. Ç1, Ç2, Ç3 çözeltileri birleştirilerek Ç4 olarak adlandırılmıştır. Ç4 çözeltisine tekrar aktivite ve protein tayini yapılmıştır. Bütün numuneler buzluğa kaldırılmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Tablo 4.9’da verilmiştir.

Tablo 4.8. Tris-HCl ve NaOH-Boraks Tamponları ile Yapılan Aktivite Tayinlerinin Karşılaştırılması

4. Çalışma <i>Bacillus subtilis</i>	Hacim (ml)	Protein (1/20) (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Tampon Tris-HCl Reaksiyon 30°C	756	0.553	144	8361	108864	13
Tampon NaOH-Boraks Reaksiyon 35°C	756	0.592	177	8951	133812	15

NOT: (1/20) seyreltme oranıdır.

Tablo 4.9. *Bacillus subtilis* Bakteri Türünden Proteazın Kısmi Saflaştırılması

4. Çalışma Tampon: Tris-HCl	Hacim (ml)	Protein (1/20) (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Süpernatant	756	0.553	144	8361	108864	13
% 40 çöktürme Ç1	56	0.293 (1/30)	44	492	2464	5
% 40 Çöktürme S1	747	0.535	141	7993	105327	13
% 70 Çöktürme Ç2	35	0.402	81	281	2835	10
% 70 Çöktürme S2	625	0.489	140	6113	87500	14
% 80 Çöktürme Ç3	30	0.481	106	289	3180	11
% 80 Çöktürme S3	610	0.49	130	5978	79300	13
Karışım (Ç1+Ç2+Ç3) Ç4	121	0.415	60	1004	7260	7

NOT: (1/20) ve (1/30) seyreltme oranıdır.

Elde edilen sonuçlara göre süpernatantın spesifik aktivitesi 13 U/mg'dır. % 70 amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında süzüntünün spesifik aktivitesi 14 U/mg, çökeltinin aktivitesi ise 10 U/mg'dır. Bu durumda enzimin bir kısmı süzüntüde kalmıştır ve süzüntüye göre 1.1 kat saflaşıma sağlanmıştır.

4.6 *Bacillus cereus* Bakteri Türü İle Yapılan Çalışma

Bu çalışmada *Bacillus cereus* bakteri türü Bölüm 4.3.1'de anlatıldığı gibi sırasıyla, petri kabı ve eğri katı besiyerine ekildikten sonra içinde 800 ml sıvı besiyeri bulunan 1000 ml'lik erlene ekilmiştir. Erlen sıcaklığı 37°C olan etüvde 66 saat bekletildikten sonra etüvden çıkarılmış ve 100 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra numuneler santrifüjlenerek çökelti kısmı (bakteri kısmı) atılmıştır. Süzüntü,

süpernatant olarak adlandırılmıştır. Elde edilen süpernatantın aktivite ve protein değerleri ölçüldükten sonra buzdolabına kaldırılmıştır. Aktivite ölçümü Bölüm 4.4.1’de anlatıldığı gibi iki şekilde de (Aktivite Tayini 1 ve Aktivite Tayini 2) yapılarak iki yöntem karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.10’da gösterilmiştir. Sonuçlara göre spesifik aktivite, 1. yöntemle 11 U/mg, ikinci yöntemle ise 12 U/mg olarak bulunmuştur. İki yöntem arasında çok az fark olduğu gözlenmiştir. Çalışmada daha sonra bütün aktivite tayinleri Aktivite Tayini 2 ile yapılmıştır. Süpernatant üzerinden saflaştırma işlemine devam edilmiştir.

Elde edilen süpernatanta Bölüm 4.3.3’de anlatıldığı gibi kademeli olarak % 40, % 70, % 80’lik amonyum sülfat çöktürmesi işlemi uygulanmıştır. Çalışmada Tris-HCl Tamponu kullanılmıştır. Çöktürme işlemi sonucu elde edilen S1, S2, S3 ve Ç1, Ç2, Ç3 çözeltilerine aktivite ve protein tayini yapılmıştır. Ç1, Ç2, Ç3 çözeltileri birleştirilerek Ç4 olarak adlandırılmıştır. Ç4 çözeltisine tekrar aktivite ve protein tayini yapılmıştır. Bütün numuneler buzuğa kaldırılmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Tablo 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4.10. Tris-HCl ve NaOH-Boraks Tamponları ile Yapılan Aktivite Tayinlerinin Karşılaştırılması

1. Çalışma <i>Bacillus cereus</i>	Hacim (ml)	Protein (1/20) (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Tampon Tris-HCl Reaksiyon 30°C	692	0.784	185	10851	128020	12
Tampon NaOH-Boraks Reaksiyon 35°C	692	0.827	190	11446	131480	11

NOT: (1/20) seyreltme oranıdır.

Tablo 4.11. *Bacillus cereus* Bakteri Türünden Proteazın Kısmi Saflaştırılması

1. Çalışma Tampon: Tris - HCl	Hacim (ml)	Protein (1/20) (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Süpernatant	692	0.784	185	10851	128020	12
% 40 çöktürme Ç1	26	0.220	51	114	1326	12
%40 Çöktürme S1	624	0.737	203	9198	126672	14
% 70 Çöktürme Ç2	30	0.245	55	147	1650	11
% 70 Çöktürme S2	620	0.731	174	9064	107880	12
% 80 Çöktürme Ç3	25	0.359	72	180	1800	10
% 80 Çöktürme S3	615	0.723	173	8893	106395	12
Karışım (Ç1+Ç2+Ç3) Ç4	81	0.250	69	405	5589	14

NOT: (1/20) seyreltme oranıdır.

Elde edilen değerler sonucunda süpernatantın spesifik aktivitesi 12 U/mg'dır. % 40, % 70 ve % 80'lik çöktürme sonrası elde edilen çökeltinin spesifik aktivite ise 14 U/mg'dır. Buna göre yaklaşık 1.2 kat saflaştırma sağlanmıştır. % 40'lik çöktürme sonrası ise süzütünün spesifik aktivitesi 1.2 kat artmıştır.

4.7. *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* Bakteri Türlerinden Elde Edilen Proteaz Enziminin Bazı Özelliklerinin İncelenmesi

Bu çalışmada *Bacillus subtilis* türünün 4. Çalışmasından elde edilen Ç4 ve *Bacillus cereus* çalışmasından elde edilen Ç4 numunelerindeki proteaz enziminin bazı özellikleri incelenmiştir.

4.7.1. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığın enzim üzerindeki etkisinin belirlenmesi enzimin hangi sıcaklıkta en yüksek aktivite gösterdiğini ve enzim aktivitesinin kararlı olduğu sıcaklık aralığını saptamak açısından önemlidir. Sıcaklığın enzim üzerindeki etkisi iki şekilde incelenmiştir.

- Optimum sıcaklık
- Sıcaklık kararlılığı

4.7.1.1. Optimum Sıcaklık

Optimum sıcaklık, enzimin farklı sıcaklıklarda (10-70°C) aktivite tayini ile tespit edilmiştir. Aktivite tayini için 10-70°C sıcaklık aralığında su banyosunda 2.5 ml Kazein Substrat Çözeltisi 2, üzerine 0.5 ml enzim numunesinden konarak 10 dakika reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 2.5 ml TCA Karışım Çözeltisi 2'den ilave edilerek reaksiyon durdurulmuş ve 20 dakika sonra süzülerek numunelerin aktiviteleri UV spektrofotometresinde 275 nm'de ölçülmüştür. Şahit numune, aynı miktarda Kazein Substrat Çözeltisi 2, TCA Karışım Çözeltisi 2 ve enzim yerine çalışılan sıcaklıktaki Tris-HCl tamponu eklenerek hazırlanmıştır.

Belli bir sıcaklık aralığında enzimin bozunarak aminoasitlere parçalanması ve bunun sonucunda da aktivite değerlerine etki etmesini kontrol etmek amacı ile aktivite tayini Kazein Substrat Çözeltisi 2 yerine distile su kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen değerler sonucunda enzimin 70°C'de bozunduğu ve aktivite değerinin etkilendiği görülmüştür.

Bacillus subtilis 4. Çalışmasından elde edilen Ç4 numunesinin sonuçları Tablo 4.12 ve Şekil 4.7'de verilmiştir.

Bacillus cereus 1. Çalışmasından elde edilen Ç4 numunesinin sonuçları ise Tablo 4.13 ve Şekil 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.12. Optimum Sıcaklık (*Bacillus subtilis* Çalışması)

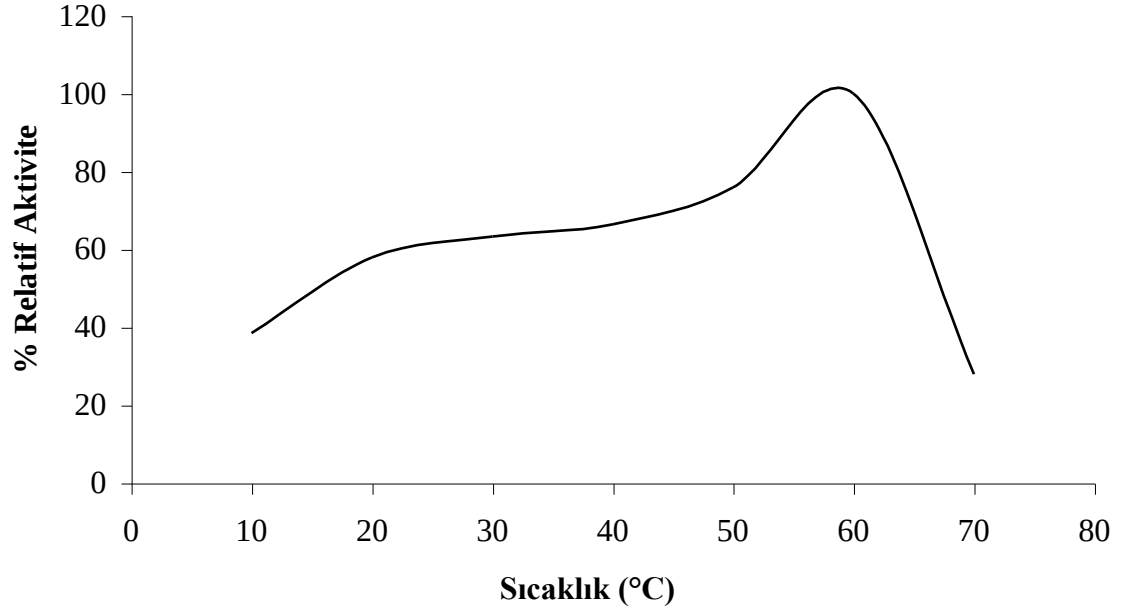
Sıcaklık (°C)	Aktivite (U/ml)	% Relatif Aktivite
10	30.483	39
20	45.813	58
30	50.101	63
40	52.517	66
50	60.059	76
60	79.134	100
70	22.200	28

Elde edilen sonuçlara göre, *Bacillus subtilis* bakteri türünün 4. Çalışmasından elde edilen proteaz enziminin (Ç4 numunesinin) optimum sıcaklığı 60°C civarındadır.

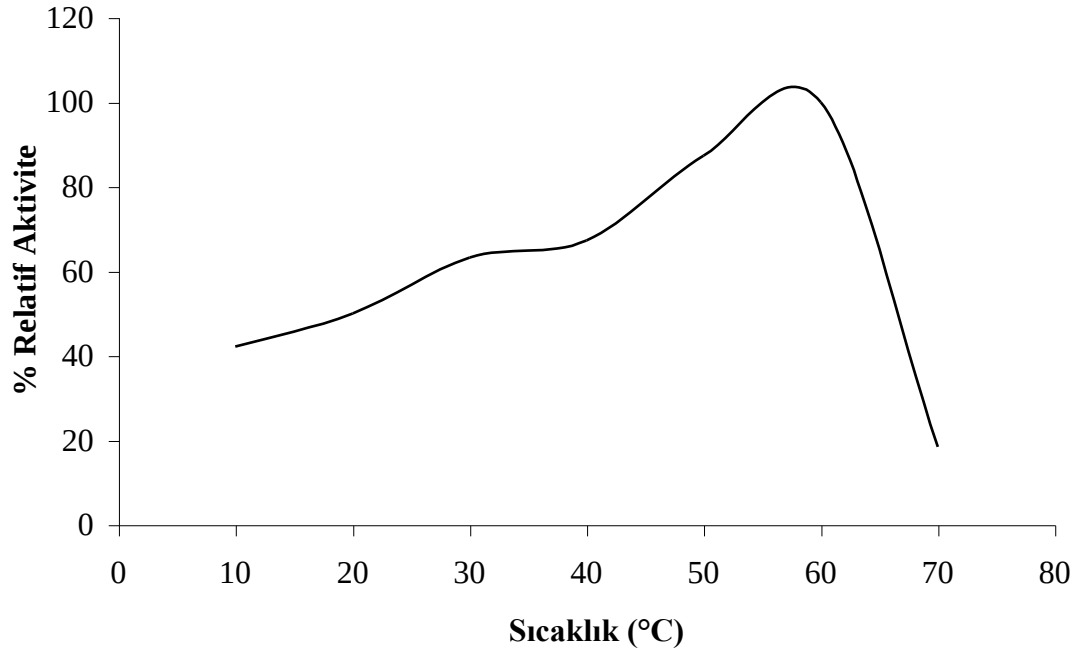
Tablo 4.13 Optimum Sıcaklık (*Bacillus cereus* Çalışması)

Sıcaklık (°C)	Aktivite (U/ml)	% Relatif Aktivite
10	30.721	42
20	36.474	50
30	46.114	63
40	49.043	67
50	63.793	87
60	73.040	100
70	13.450	18

Elde edilen sonuçlara göre, *Bacillus cereus* bakteri türünün 1. Çalışmasından elde edilen proteaz enziminin (Ç4 numunesinin) optimum sıcaklığı 60°C civarındadır.



Şekil 4.7. Optimum Sıcaklık (*Bacillus subtilis*)



Şekil 4.8 Optimum Sıcaklık (*Bacillus cereus*)

4.7.1.2. Sıcaklık Kararlılığı

Sıcaklık kararlılığını belirlemek için her bir tüpe 0.5 ml enzim numunesinden konulmuştur. Tüpler 0-70°C'lere ayarlanmış etüvlerde 15 dakika bekledikten sonra alınarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra aktivite tayini bölüm 4.4.1'de anlatıldığı gibi Aktivite Tayini 2'ye göre yapılmıştır. Şahit numune

hazırlanırken aynı miktarda Kazein Substrat Çözeltisi 2, TCA Karışım Çözeltisi 2 ve enzim yerine de o sıcaklıktaki Tris-HCl tamponu kullanılmıştır.

Belli bir sıcaklık aralığında enzimin bozunarak aminoasitlere parçalanması ve bunun sonucunda da aktivite değerlerine etki etmesini kontrol etmek amacı ile aktivite tayini Kazein Substrat Çözeltisi 2 yerine distile su kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen değerler sonucunda enzimin 70°C’de bozunduğu ve aktivite değerinin etkilendiği görülmüştür.

Bacillus subtilis bakteri türünün 4. Çalışmasından elde edilen Ç4 numunesine ait sonuçlar Tablo 4.14 ve Şekil 4.9’da verilmiştir.

Bacillus cereus bakteri türünün 1. Çalışmasından elde edilen Ç4 numunesine ait sonuçlar da Tablo 4.15 ve Şekil 4.10’da verilmiştir.

Tablo 4.14. Sıcaklık Kararlılığı (*Bacillus subtilis* Çalışması)

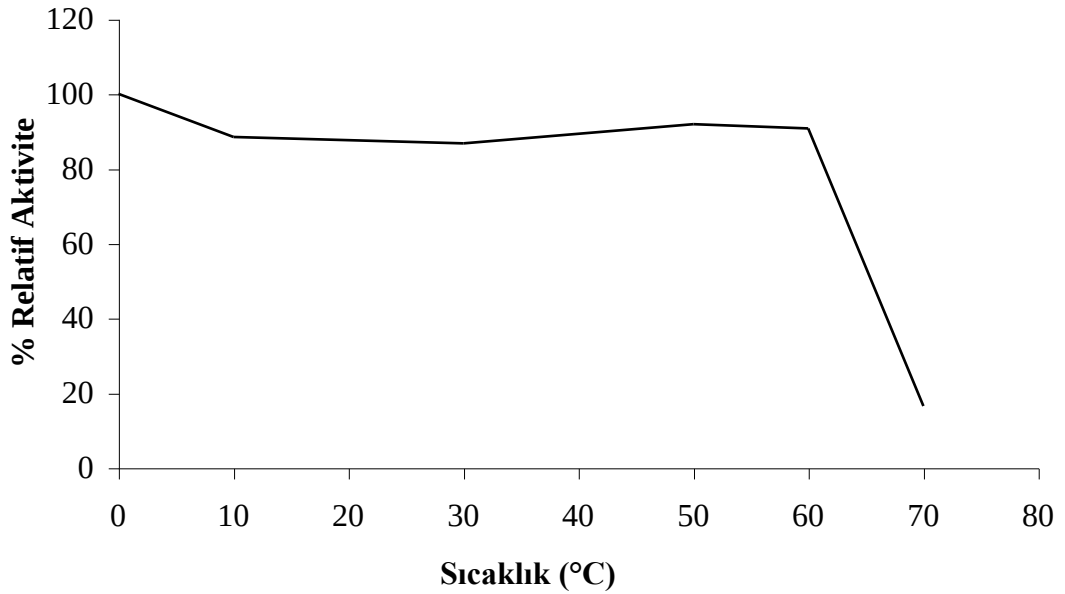
Sıcaklık (°C)	Aktivite (U/ml)	% Relatif Aktivite
0	46.625	100
10	41.243	89
30	40.473	87
50	42.830	92
60	42.297	91
70	7.724	17

Elde edilen sonuçlara göre, *Bacillus subtilis* bakteri türünün 4. Çalışmasından elde edilen proteaz enziminin (Ç4 numunesinin) aktivitesinin 50-60°C sıcaklık aralığında kararlı kaldığı tespit edilmiştir.

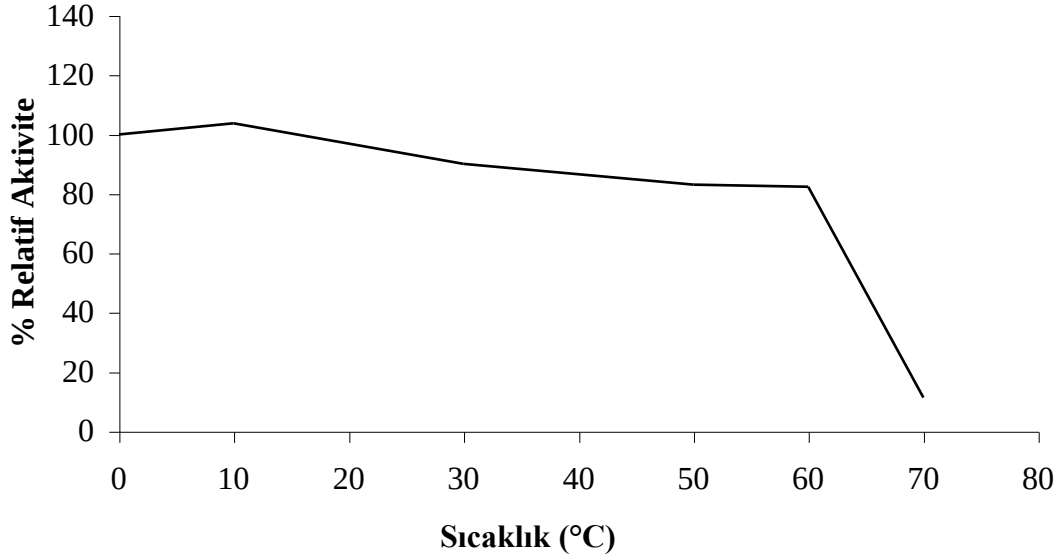
Tablo 4.15. Sıcaklık Kararlılığı (*Bacillus cereus* Çalışması)

Sıcaklık (°C)	Aktivite (U/ml)	% Relatif Aktivite
0	46.342	100
10	48.053	104
30	41.708	90
50	38.494	83
60	38.125	82
70	5.25	11

Ölçümler sonucunda *Bacillus cereus* bakteri türünün 1. Çalışmasından elde edilen proteaz enziminin (Ç4 numunesinin) aktivitesinin 50-60°C sıcaklık aralığında kararlı kaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. Sıcaklık Kararlılığı (*Bacillus subtilis*)



Şekil 4.10. Sıcaklık Kararlılığı (*Bacillus cereus*)

4.7.2. Enzim Aktivitesi Üzerine pH Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine pH etkisinin incelenmesi, enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değerinin ve enzimin aktivitesinin kararlı olduğu pH aralığının saptanması açısından önemlidir. Çalışmada pH etkisi iki şekilde incelenmiştir.

- Optimum pH
- pH Kararlılığı

4.7.2.1. Optimum pH

Optimum pH çalışmasında, Kazein Substrat Çözeltisi 2'nin pH değerleri değiştirilerek aktivite tayini yapılmıştır. Substratın pH değerleri 4 ile 10 arasında ayarlanmıştır. Herbir numune için o pH daki substrat kullanılmıştır. Aktivite tayini 30°C'deki su banyosunda, pH'ı ayarlanmış 2.5 ml substrat çözeltisi üzerine 0.5 ml enzim numunesi ilave edilerek 10 dakika reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon TCA Karışım Çözeltisi 2 ile durdurularak 20 dakika sonra süzölmüştür. Şahit numune hazırlanırken Kazein Substrat Çözeltisi 2, TCA Karışım Çözeltisi 2 ve enzim yerine de çalışılan substratla aynı pH'daki tampon eklenmiştir.

Enzimin bozularak aminoasitlere parçalanması ve bunun sonucunda da aktivite değerlerine etki etmesini kontrol etmek amacı ile aktivite tayini Kazein Substrat Çözeltisi 2 yerine distile su kullanılarak yapılmıştır. Fakat daha önce elde edilen aktivite değerlerine etkisi olmadığı gözlenmiştir.

Bacillus subtilis 4. Çalışmasından elde edilen Ç4 numunesine ait sonuçlar Tablo 4.16 ve Şekil 4.11’de verilmiştir.

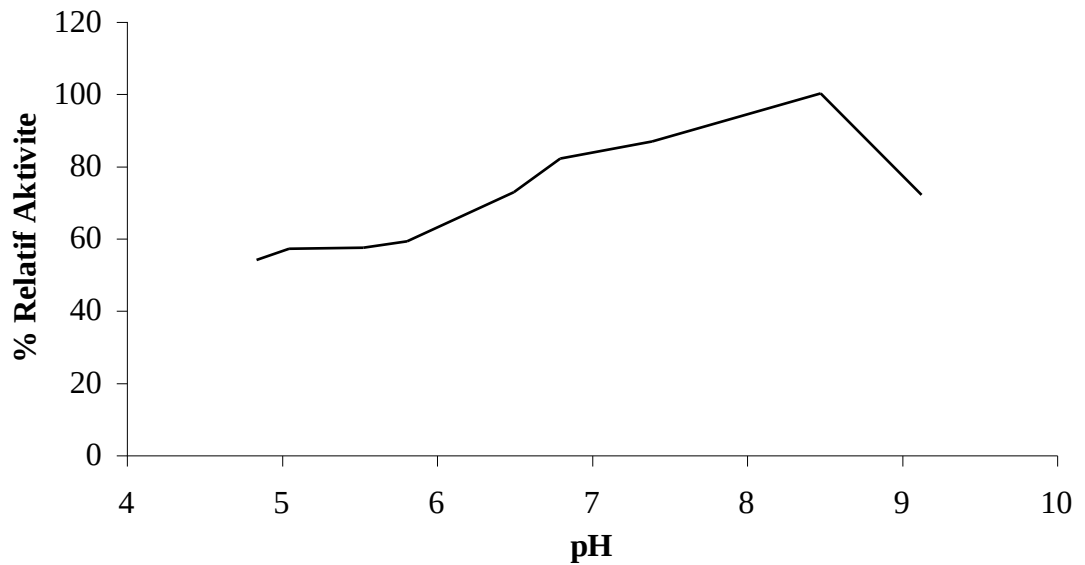
Bacillus cereus 1. Çalışmasından elde edilen Ç4 numunesinin çalışma sonuçları da Tablo 4.17 ve Şekil 4.12’de verilmiştir.

Tablo 4.16. Optimum pH (*Bacillus subtilis* Çalışması)

pH	Aktivite (U/ml)	% Relatif Aktivite
4.84	35.744	54
5.05	37.766	57
5.37	41.470	63
5.53	38.031	57
5.81	39.163	59
6.5	48.133	73
6.8	54.287	82
7.39	57.405	87
8.48	66.223	100
9.13	47.592	72

Elde edilen sonuçlara göre *Bacillus subtilis* türü ile yapılan 4. Çalışmasından elde üretilen proteaz enziminin optimum pH’ı 8.48 olarak saptanmıştır.

.

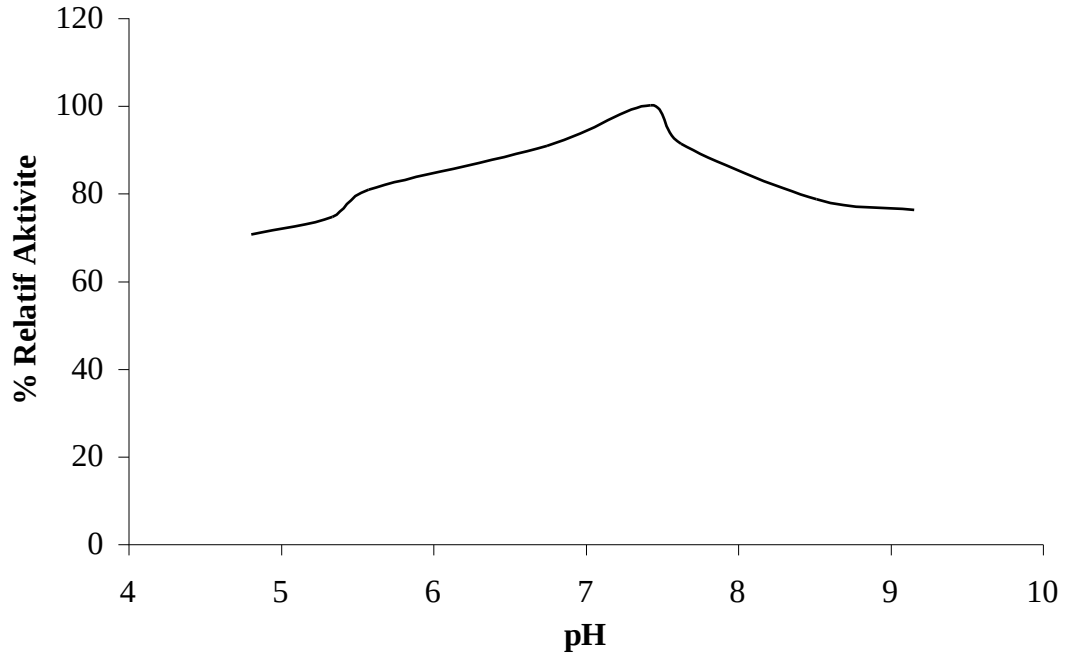


Şekil 4.11. Optimum pH (*Bacillus subtilis*)

Tablo 4.17. Optimum pH (*Bacillus cereus* Çalışması)

pH	Aktivite (U/ml)	% Relatif Aktivite
4.81	33.972	71
5.34	35.913	75
5.58	38.889	81
6.75	43.657	91
7.43	48.127	100
7.63	44.018	91
8.52	37.846	79
9.16	36.654	76

Elde edilen sonuçlara göre *Bacillus cereus* türü ile yapılan 1. Çalışmadan elde edilen proteaz enziminin optimum pH'ı 7.43 olarak saptanmıştır.



Şekil 4.12. Optimum pH (*Bacillus cereus*)

4.7.2.2. pH Kararlılığı

Bu çalışmada Tris-HCl Tamponunun pH değeri 2.5 ile 10 arasında ayarlanmıştır. Her bir tüpe 1:1 (hacim/hacim) oranında tampon çözeltisi ve elde edilen proteaz çözeltilerinden konmuştur. Tüpler, sıcaklığı 30°C olan etüvde 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonra numunelere Aktivite Tayini 2 yöntemi uygulanarak aktivite değerleri ölçülmüştür. Şahit numune hazırlanırken aynı miktarda Kazein Substrat Çözeltisi 2, TCA Karışım Çözeltisi 2 ve enzim yerine de distile su kullanılmıştır.

Relatif aktivite hesabı için referans numune hazırlanmıştır. Bunun için enzim numunesi ve Tris-HCl (pH 7.2) çözeltisi 1:1 (hacim/hacim) oranında karıştırılarak 24 saat buzdolabında bekletilmiştir. Daha sonra Aktivite Tayini 2 yöntemi uygulanarak aktivite değerleri ölçülmüştür.

Çalışılan pH değerleri aralığında enzimin bozularak aminoasitlere parçalanması ve bunun sonucunda da aktivite değerlerine etki etmesini kontrol etmek amacı ile aktivite tayini Kazein Substrat Çözeltisi 2 yerine distile su kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen değerler sonucunda *Bacillus subtilis* bakteri türü ile yapılan 4. Çalışmadan elde edilen enzimin pH 9.5 civarında ve *Bacillus cereus* bakteri türü ile yapılan çalışmadan elde edilen enzimin pH 9 civarında bozunduğu ve aktivite değerini etkilediği görülmüştür.

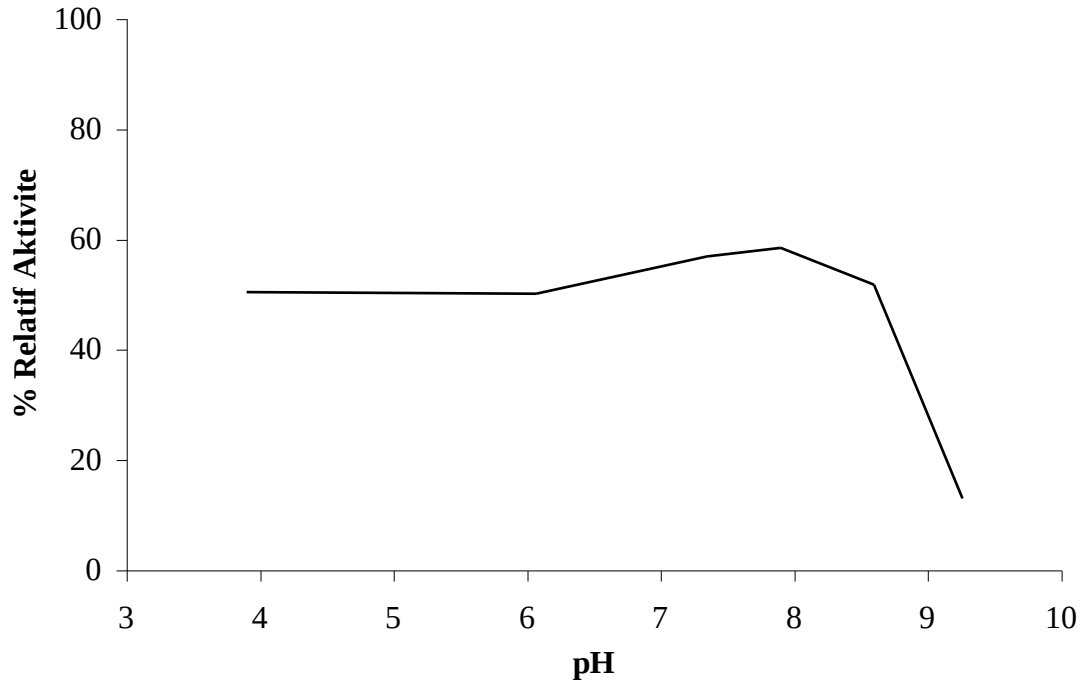
Bacillus subtilis bakteri türü ile yapılan 4. Çalışmadan elde edilen proteaz enzimine (Ç4 numunesine) ait pH Kararlılığı sonuçları Tablo 4.18 ve Şekil 4.13'de verilmiştir.

Bacillus cereus bakteri türü ile yapılan çalışmadan elde edilen proteaz enziminin (Ç4 numunesinin) pH Kararlılığı sonuçları da Tablo 4.19 ve Şekil 4.14'de verilmiştir.

Tablo 4.18. pH Kararlılığı (*Bacillus subtilis* Çalışması)

pH	Aktivite (U/ml)	% Relatif Aktivite
Referans	60.196	100
3.90	30.345	50
6.07	30.138	50
7.35	34.245	57
7.90	35.158	58
8.60	31.151	52
9.26	7.578	13

Elde edilen sonuçlara göre *Bacillus subtilis* türünden elde edilen proteaz enziminin (Ç4 numunesinin) 4-7 pH aralığında kararlı olduğu görülmüştür.

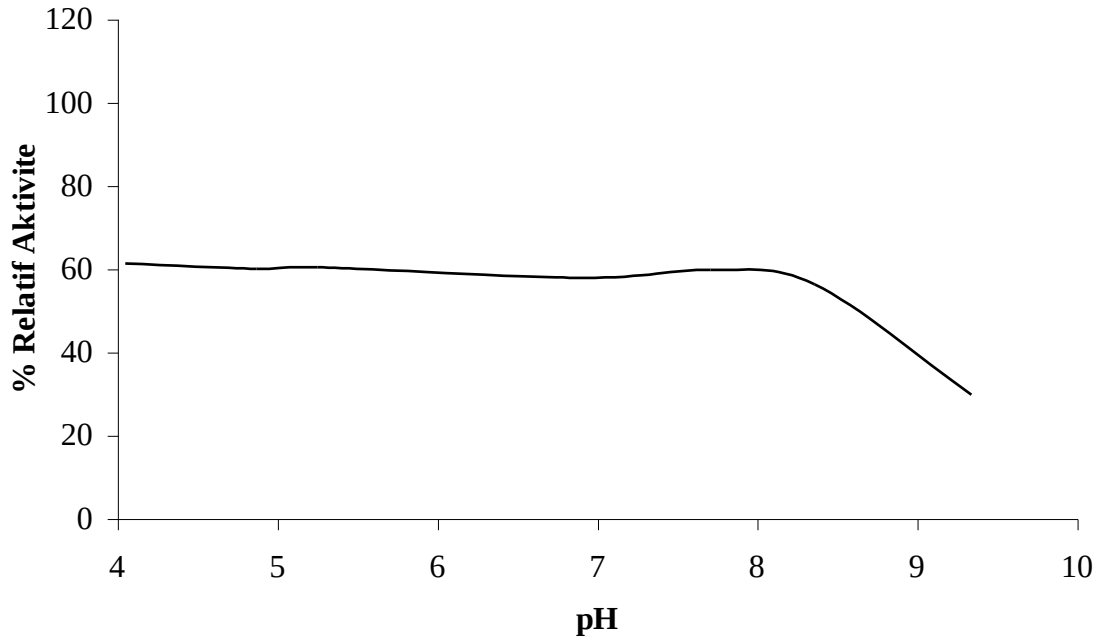


Şekil 4.13. pH Kararlılığı (*Bacillus subtilis*)

Tablo 4.19. pH Kararlılığı (*Bacillus cereus* Çalışması)

pH	Aktivite (U/ml)	% Relatif Aktivite
Referans	69.06	100
4.05	42.31	61
4.87	41.68	60
5.25	41.66	60
6.91	39.96	58
7.71	41.23	60
8.36	38.87	56
9.34	20.58	30

Elde edilen sonuçlara göre *Bacillus cereus* türünden elde edilen proteaz enziminin 4–7.7 pH aralığında kararlı kaldığı saptanmıştır.



Şekil 4.14. pH Kararlılığı (*Bacillus cereus*)

4.7.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonu ve Reaksiyon Zamanının Etkisi

Bu çalışmada Kazein Substrat Çözeltisi 2'nin konsantrasyonu % 1.2, % 0.6, % 0.3, % 0.15, % 0.075 olarak hazırlanmıştır. Aktivite tayini yapılırken 30°C'deki su banyosuna, içerisinde 2.5 ml farklı konsantrasyonlardaki substrat çözeltisi bulunan tüpler konulup 5 dakika bekletildikten sonra üzerine 0.5 ml enzim numunesi ilave edilmiştir ve 10 dakika reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon 2.5 ml TCA Karışım Çözeltisi 2 ile durdurularak 20 dakika sonra süzölmüştür. Şahit numune hazırlanırken aynı miktarda Kazein Substrat Çözeltisi 2 ve TCA Karışım Çözeltisi 2 kullanılmıştır.

Reaksiyon süresi her substrat konsantrasyonu için 10, 30, 50, 70 dakika olacak şekilde aktivite ölçölmüştür. Numunelerin aktivite değeri Aktivite Tayini 2 yöntemi ile belirlenmiştir.

Bacillus subtilis türü ile yapılan çalışmada elde edilen değeri Tablo 4.20 ve Şekil 4.15'de verilmiştir.

Bacillus cereus türü ile yapılan çalışma için elde edilen değeri ise Tablo 4.21 ve Şekil 4.16'de verilmiştir.

Tablo 4.20. Substrat Konsantrasyonu ve Reaksiyon Zamanı Etkisi (*Bacillus subtilis*)

	Substrat Konsantrasyonu (%)				
	1.2	0.6	0.3	0.15	0.075
Zaman (dakika)					
10	61.835	62.580	65.262	56.471	81.205
30	70.328	62.729	70.775	68.391	61.537
50	31.439	83.44	85.824	83.291	32.78
70	95.807	98.787	104.896	97.893	85.675

NOT : Tablodaki değeri U/ml cinsinden aktivite değeriidir.

Bacillus subtilis türü ile yapılan çalışmada ölçömler sonucunda reaksiyon zamanı ve substrat konsantrasyonu arttıkça aktivite artmaktadır.

Tablo 4.21. Substrat Konsantrasyonu ve Reaksiyon Zamanı Etkisi (*Bacillus cereus*)

	Substrat Konsantrasyonu (%)				
	1.2	0.6	0.3	0.15	0.075
Zaman (dakika)					
10	40.379	37.548	44.849	39.783	47.084
30	45.445	35.313	38.591	46.935	36.654
50	26.224	58.408	54.385	54.385	26.224
70	73.01	69.434	63.921	58.557	50.958

NOT : Tablodaki değerler U/ml cinsinden aktivite değerleridir.

Bacillus cereus türü ile yapılan çalışmada ölçümler sonucunda reaksiyon zamanı ve substrat konsantrasyonu arttıkça aktivitenin arttığı gözlenmiştir.

4.7.4. İlk Hız Deneyi

Substrat konsantrasyonu enzim reaksiyon derecesinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Enzim konsantrasyonu sabit tutulup substrat konsantrasyonu değiştirilerek aktivite tayini yapılırsa elde edilen değerlerle ilk hıza karşı substrat konsantrasyonu grafiğini çizersek Michaelis-Menten eğrisi elde etmiş oluruz. Bu eğriden K_m ve V_m (maksimum hız) değerleri hakkında bilgi edinebiliriz.

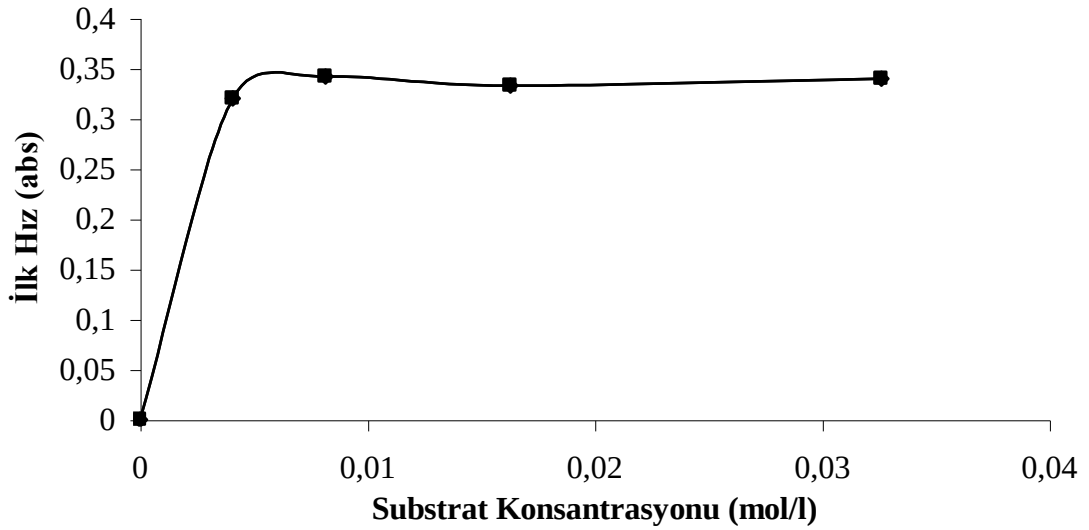
İlk hız deneyi için, Kazein Substrat Çözeltisi 2'nin konsantrasyonu 0.004, 0.008, 0.016, 0.033 mol/l olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra sıcaklığı 30°C olan su banyosunda, tüplere farklı konsantrasyonlarda hazırlanan substrat çözeltilerinden 2.5 ml konarak 5 dakika bekletilmiştir. 5 dakika sonunda substratların üzerine 0.5 ml enzim çözeltisi ilave edilerek 1 dakika reaksiyon gerçekleştirilmiştir. 1 dakika sonra 2.5 ml TCA Karışım Çözeltisi 2 ile reaksiyon durdurulur. Daha sonra numuneler süzülerek aktivite değerleri ölçülmüştür.

Bacillus subtilis bakteri türü ile yapılan çalışma için elde edilen değerler Tablo 4.22'de verilmiştir.

Bacillus cereus bakteri türü ile yapılan çalışma için elde edilen değerler ise Tablo 4.23’de verilmiştir.

Tablo 4.22. Substrat Konsantrasyonu Değişimi ile İlk Hız değerleri (*Bacillus subtilis*)

Substrat Konsantrasyonu (mol/l)	İlk Hız (Absorbans)
0.004	0.344
0.008	0.333
0.016	0.342
0.033	0.320

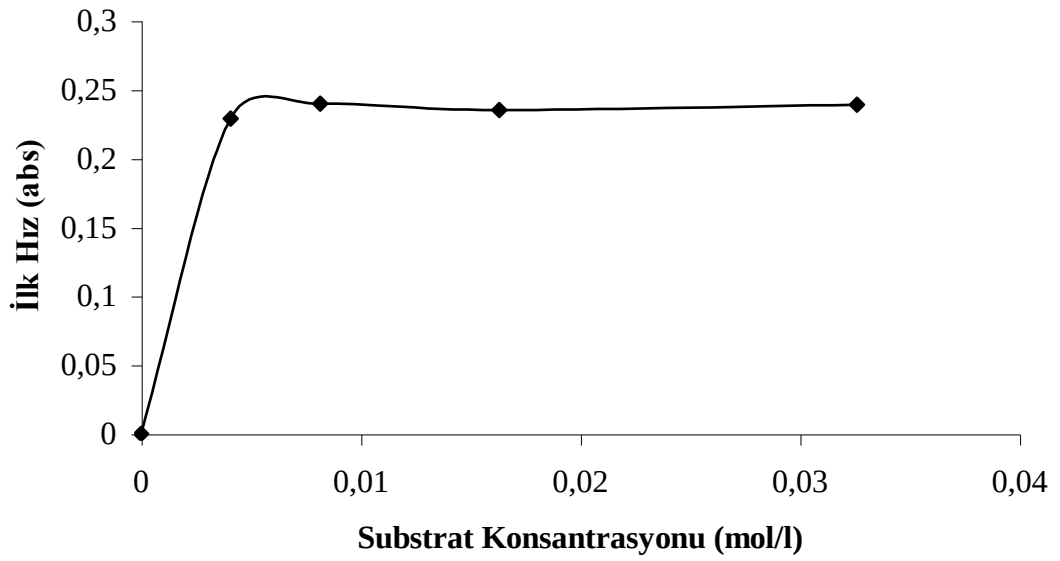


Şekil 4.15. Substrat Konsantrasyonu Değişimi ile İlk Hız Grafiği (*Bacillus subtilis*)

Bacillus subtilis bakteri türünden elde edilen proteaz enzimi için, V_{max} değeri Şekil 4.15.’den 0.343 olarak okunmuştur. $(1/2 \times V_{max})$ hız değerine karşılık gelen konsantrasyon değeri 0.002 mol/l olarak bulunmuştur. Bu değer Michaelis-Menten sabitinin (K_m) değeridir.

Tablo 4.23. Substrat Konsantrasyonu Değişimi ile İlk Hız değerleri (*Bacillus cereus*)

Substrat Konsantrasyonu (mol/l)	İlk Hız (Absorbans)
0.004	0.239
0.008	0.235
0.016	0.240
0.033	0.229



Şekil 4.16. Substrat Konsantrasyonu Değişimi ile İlk Hız Grafiği (*Bacillus cereus*)

Bacillus cereus bakteri türünden elde edilen proteaz enzimi için, V_{max} değeri Şekil 4.16.'den 0.238 olarak okunmuştur. $(1/2 \times V_{max})$ hız değerine karşılık gelen konsantrasyon değeri 0.002 mol/l olarak bulunmuştur. Bu değer Michaelis-Menten sabitinin (K_m) değeridir.

4.7.5. Proteaz Enziminin İnhibisyonu ve Aktivasyonu

Enzim aktivitesi birçok kimyasal tarafından aktive ya da inhibe edilebilir. Proteaz enzimi üzerine kimyasalların etkisi iki şekilde incelenmiştir.

- Aktivatör Etkisinin İncelenmesi
- İnhibitör Etkisinin İncelenmesi

4.7.5.1. Aktivatör Etkisinin İncelenmesi

Bu çalışmada proteaz enzimini aktive eden kimyasal maddelerden Mn^{2+} , Fe^{2+} ve Ca^{2+} 'nın etkisi incelenmiştir. Bunun için konsantrasyonları 10^{-3} M olacak şekilde hazırlanan $MnCl_2$, $FeCl_2$, $CaCl_2$ aktivatör çözeltilerinden tüplere 100 mikrolitre konarak üzeri Kazein Substrat Çözeltisi 2 ile 2.5 ml'ye tamamlanmıştır. Tüpler sıcaklığı $30^{\circ}C$ olan su banyosunda 5 dakika bekletilmiştir. 5 dakika sonunda substratların üzerine 0.5 ml enzim çözeltisi ilave edilerek 1 dakika reaksiyon gerçekleştirilmiştir. 1 dakika sonra 2.5 ml TCA Karışım Çözeltisi 2 ile reaksiyon durdurulmuştur. Daha sonra numuneler süzülerek aktivite değerleri ölçülmüştür.

Bacillus subtilis bakteri türünün 4. Çalışmasından elde edilen proteaz enzime (Ç4 numunesine) ait sonuçlar Tablo 4.24'de verilmiştir.

Bacillus cereus bakteri türü ile yapılan çalışmadan elde edilen proteaz enziminin (Ç4 numunesinin) sonuçları ise Tablo 4.25'de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* bakteri türünden elde edilen proteaz enzimi için $MnCl_2$ nin, $FeCl_2$ ve $CaCl_2$ 'ye göre daha etkili bir aktivatör olduğu görülmüştür.

Tablo 4.24. Aktivatör Etkisi (*Bacillus subtilis* Çalışması)

Substrat Konsantrasyonu (%)	Relatif Aktivite $MnCl_2$ 10^{-3} (mol/l)	Relatif Aktivite $FeCl_2$ 10^{-3} (mol/l)	Relatif Aktivite $CaCl_2$ 10^{-3} (mol/l)	Relatif Aktivite Aktivatör Yokken
0.6	119.547	101.637	105	100
0.3	117.447	95.141	106.925	100
0.15	118.103	99.947	95.614	100
0.075	130.742	118.345	100.041	100

Tablo 4.25 Aktivatör Etkisi (*Bacillus cereus* Çalışması)

Substrat Konsantrasyonu (%)	Relatif Aktivite MnCl ₂ 10 ⁻³ (mol/l)	Relatif Aktivite FeCl ₂ 10 ⁻³ (mol/l)	Relatif Aktivite Ca Cl ₂ 10 ⁻³ (mol/l)	Relatif Aktivite Aktivatör Yokken
0.6	124.572	124.728	105.055	100
0.3	131.183	105.86	116.413	100
0.15	123.777	116.298	106.311	100
0.075	117.139	108.775	107.920	100

4.7.5.2. İnhibitör Etkisinin İncelenmesi

Çalışmada proteaz enzimini inhibe eden kimyasal maddelerden CuCl₂ ve EDTA'nın etkisi incelenmiştir. Bunun için konsantrasyonları 10⁻³ M olacak şekilde hazırlanan CuCl₂ ve EDTA inhibitör çözeltilerinden tüplere 100 mikrolitre konarak üzeri Kazein Substrat Çözeltisi 2 ile 2.5 ml ye tamamlanmıştır. Tüpler sıcaklığı 30°C olan su banyosunda 5 dakika bekletilmiştir. 5 dakika sonunda substratların üzerine 0.5 ml enzim çözeltisi ilave edilerek 1 dakika reaksiyon gerçekleştirilmiştir. 1 dakika sonra 2.5 ml TCA Karışım Çözeltisi 2 ile reaksiyon durdurulur. Daha sonra numuneler süzülerek aktivite değerleri ölçülmüştür.

Bacillus subtilis çalışmasına ait sonuçlar Tablo 4.26'da verilmiştir. *Bacillus cereus* çalışmasından elde edilen sonuçlar ise Tablo 4.27'de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre *Bacillus subtilis* bakteri türünden elde edilen proteaz enzimi için, EDTA daha etkili bir inhibitördür. CuCl₂ ise, elde edilen proteaz enzimi üzerinde daha az inhibe edici olmuştur.

Elde edilen sonuçlara göre *Bacillus cereus* bakteri türünden elde edilen proteaz enzimi için CuCl₂ daha etkili bir inhibitördür. EDTA ise elde edilen proteaz enzimi üzerinde daha az inhibe edici olmuştur.

Tablo 4.26. İnhibitör Etkisi (*Bacillus subtilis* Çalışması)

Substrat Konsantrasyonu (%)	Relatif Aktivite CuCl ₂ 10 ⁻³ (mol/l)	Relatif Aktivite EDTA 10 ⁻³ (mol/l)	Relatif Aktivite İnhibitör Yokken
0.6	81.436	75.945	100
0.3	106.225	71.883	100
0.15	99.047	95.688	100
0.075	90.591	91.482	100

Tablo 4.27. İnhibitör Etkisi (*Bacillus cereus* Çalışması)

Substrat Konsantrasyonu (%)	Relatif Aktivite CuCl ₂ 10 ⁻³ (mol/l)	Relatif Aktivite EDTA 10 ⁻³ (mol/l)	Relatif Aktivite İnhibitör Yokken
0.6	96.441	103.337	100
0.3	78.048	92.902	100
0.15	95.044	113.689	100
0.075	99.254	96.452	100

4.7.6. SDS-PAGE ile Molekül Ağırlığı Tayini

Bacillus subtilis ve *Bacillus cereus* bakterilerinden elde edilen kısmen saflaştırılmış proteaz enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile bulunmuştur. Burada *Bacillus subtilis*'in 4. Çalışmasından ve *Bacillus cereus*'un 1. Çalışmasından elde edilmiş olan Ç4 numuneleri kullanılmıştır. İlk olarak 10 µl numune ile 10 µl 2xÖrnek Tamponu karıştırılıp tüplere konularak ve 100°C'de 5 dakika kaynatılmıştır. Kaynatılan numuneler soğutulup buzdolabına kaldırılmıştır. Daha sonra çözelti hazırlama aşamasına geçilmiştir.

İlk önce % 10'luk Yürütücü Jel çözeltisi hazırlanarak vakit kaybetmeden sıkıştırılmış iki cam arasına hava kabarcığı oluşmayacak ve cam plaka yüksekliğinin 3/4'ünü kaplayacak şekilde dökülmüştür. Jel tamamen kuruyana kadar beklendikten sonra %3'lük Yığın Jel çözeltisi hazırlanarak yine vakit kaybetmeden donmuş olan Yürütücü Jelin üzerine dökülmüş ve Yığın Jelin olduğu cam plakalar arasına tarak

yerleştirilmiştir. Yığın Jel tamamen donduktan sonra tarak yavaşça çıkarılmıştır. Saplanan tarak çıkarıldığında Yığın Jel kısmında kuyular açılmıştır. Bu kuyular tank tamponu ile yıkandıktan sonra kuyulara numune ve marker belli bir sıra ile enjekte edilmiştir. Daha sonra numune yüklenmiş birleşik iki cam plaka, elektroforez hücreğine yerleştirilmiştir ve elektroforez tankı tank tamponu ile doldurularak elektroforez işlemi başlatılmıştır. Yaklaşık 2 saat sonra işlem tamamlanmış ve Yürütücü Jel kısmı iki cam arasından çıkarılarak boyama işlemi için Coomassie Blue Stain çözeltisinde bir gece bekletilmiştir. Boyama işleminden sonra, Jel Destain çözeltisine alınarak 1 gece daha bekletilmiştir ve bekleme süresi sonunda çözeltiden çıkarılarak 20 dakika kurutucuda kurutulmuştur. Elde edilen jelde numuneler marker ile karşılaştırılarak molekül ağırlığı bulunmuştur. Elde edilen SDS-PAGE sonuçları, Şekil 4.17’de gösterilmiştir.

Protein marker olarak aşağıdaki maddeleri içeren standart kullanılmıştır.

β -Galaktosidaz : 116 kDa

Bovin serum albumin : 66.2 kDa

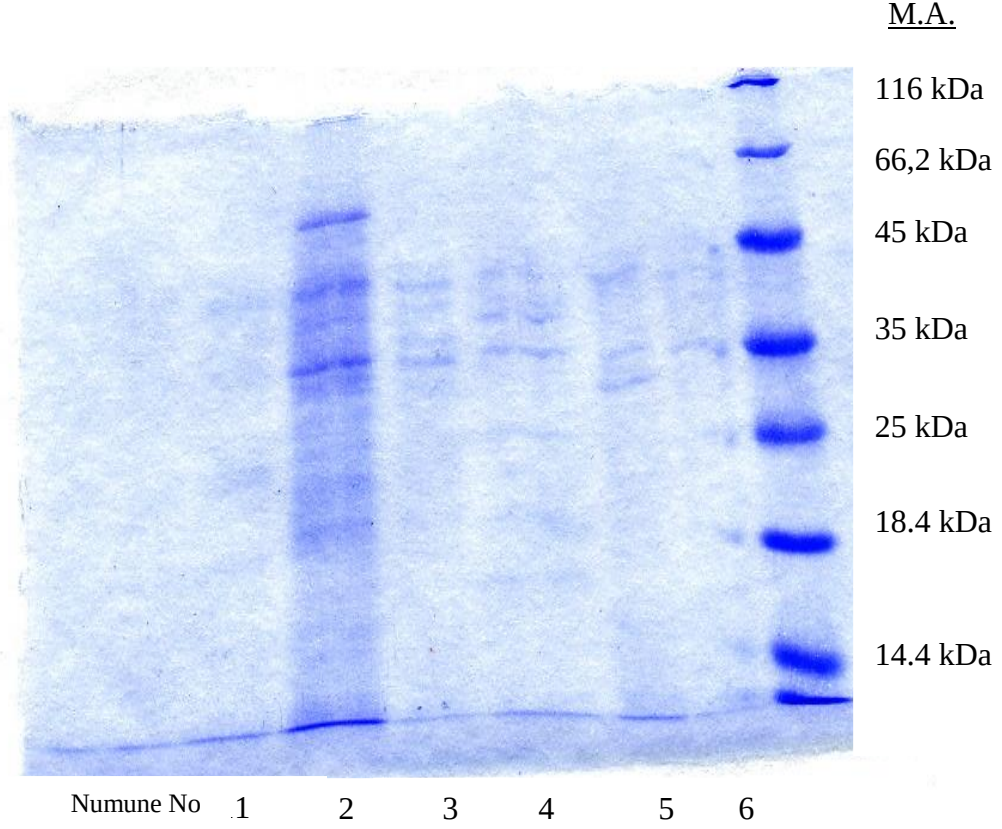
Ovalbumin : 45 kDa

Laktat dehidrogenaz : 35 kDa

Endonükleaz Bsp 981 : 25 kDa

β - Laktolobülin : 18.4 kDa

Lisozim : 14.4 kDa



Şekil 4.17. SDS-PAGE ile Molekül Ağırlığı Tayini

Şekil 4.17’de *Bacillus subtilis* bakteri türünden elde edilen proteaz enziminin amonyum sülfat çöktürme işleminden sonraki çökeltisi, numune no.1’dir ve molekül ağırlığı 45 kDa olarak görülmektedir. *Bacillus cereus* bakterisinden elde edilen enzimin amonyum sülfat çöktürme işleminden sonraki çökeltisi, numune no. 3’ dir ve molekül ağırlığı 37 kDa olarak görülmektedir. Ayrıca *Bacillus cereus* bakterisinden elde edilen enzimin süpernatantı, numune no. 5’dir ve molekül ağırlığı 35-40 kDa olarak görülmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Laboratuvar ölçeğinde *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* bakterilerinden proteaz enziminin kısmi saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi amacıyla yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçlar ve gözlemler ışığında aşağıda verilen genel sonuçlara varılmıştır.

1) Bakterilerin üretilmesi için üç farklı yöntem denenmiştir. *Bacillus subtilis* bakterisinin üretilmesi için yapılan 1. Çalışmada bakteriler sıvı besiyerine ekilerek 174 saat boyunca 37°C'lik etüvde bekletilmiştir. Buna göre süpernatantın spesifik aktivitesi 12 U/mg çıkmıştır. 2. Çalışmada ise bakteriler sıvı besiyerine ekilerek 37°C'lik etüvde 168 saat boyunca çalkanarak bekletilmiştir. Buna göre süpernatantın spesifik aktivitesi 11 U/mg olarak bulunmuştur. Yapılan 3. ve 4. Çalışmada bakteriler sıvı besiyerine ekilerek 37°C'lik etüvde 66 saat boyunca bekletildikten sonra 100 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Buna göre süpernatantın spesifik aktivitesi 13 U/mg olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda bakteriler üredikten sona sıvı besiyerinin ortam şartlarının kötüleşmesi sporlanmayı ve dolayısıyla enzim üretimini arttırmaktadır. Bu çalışmada sıcaklık değiştirilerek ortam şartları kötüleştirilmiştir, şartları kötüleştirmek için başka yöntemler denenebilir. Ayrıca üreme sırasında besiyerlerinin çalkalanması sonuçları çok fazla değiştirmemiştir.

2) Çalışmada iki farklı aktivite tayini yapılmıştır. Aktivite tayini 1 yönteminde tampon olarak NaOH-Boraks, Aktivite tayini 2'de ise Tris-HCl tamponu kullanılmıştır. *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* bakterilerinin 4. çalışmasında iki aktivite tayini karşılaştırıldığında, *Bacillus subtilis* türü için Aktivite Tayini 1 ile spesifik aktivite 15 U/mg, Aktivite Tayini 2 ile spesifik aktivite 13 U/mg olarak bulunmuştur. *Bacillus cereus* türü için spesifik aktivite, 1. yöntemle 11 U/mg, ikinci yöntemle ise 12 U/mg olarak bulunmuştur. Buna sonuçlara göre *Bacillus subtilis* türünden elde edilen enzim için Aktivite Tayini 1 yöntemi kısmen daha iyidir. *Bacillus cereus* türünden elde edilen enzim için ise her iki yöntem de yaklaşık aynı sonucu vermiştir. Bu yüzden iki yöntem de tercih edilebilir.

3) *Bacillus subtilis* türünden elde edilen proteazın saflaştırılması için yapılan 2. ve 4. Çalışmalarda % 40, % 70, % 80'lik amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. 3. Çalışmasında ise sadece % 70'lik çöktürme yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda kademeli olarak çöktürme yapıldığında spesifik aktivite daha fazla çıkmaktadır. Bu yüzden amonyum sülfat çöktürmesi kademeli yapılmalıdır.

5) *Bacillus subtilis* türü ile yapılan 2. Çalışmada elde edilen değerlere göre süpernatantın spesifik aktivitesi 11 U/mg ve % 40, % 70 ve % 80'lik çöktürme sonrası süzöntünün spesifik aktivitesi 13 U/mg'dır. Sonuç olarak süzöntüye göre yaklaşık 1.2 kat saflaşma sağlanmıştır. Yapılan 3. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre çöktürme öncesi süpernatantın spesifik aktivitesi 11 U/mg'dır. % 70'lik çöktürme sonrası süzöntünün spesifik aktivitesi 12 U/mg'dır. Buna göre çöktürme sonrası süzöntüye göre 1.1 kat saflaşma sağlanmıştır. 4. Çalışmasında ise süpernatantın spesifik aktivitesi 13 U/mg, % 40 ve % 70'lik amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında süzöntünün spesifik aktivitesi 14 U/mg'dır. Sonuç olarak süzöntüye göre 1.1 kat saflaşma sağlanmıştır.

6) *Bacillus cereus* bakteri türünden elde edilen proteaz enzimine % 40, % 70, % 80'lik amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Elde edilen değerler sonucunda süpernatantın spesifik aktivitesi 12 U/mg'dır. % 40, % 70, % 80'lik çöktürme sonrası elde edilen çökeltinin spesifik aktivite ise 14 U/mg'dır. Buna göre yaklaşık 1.2 kat saflaşma sağlanmıştır.

7) Amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında *Bacillus subtilis* türünden elde edilen proteaz enziminin tamamı çökeltiye geçirilememiş, bir kısmı süzöntüde kalmıştır. *Bacillus cereus* türünden elde edilen proteaz enziminin ise çökeltiye geçirilmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda çok fazla saflaşma sağlanamamıştır ama hacmin küçültülmesi açısından önemli olmuştur.

8) *Bacillus subtilis* türünden elde edilen proteaz enzimine, amonyum sülfat çöktürmesi işleminden sonra DEAE-Selüloz iyon değiştirme kromatografisi yapılmıştır. 3 farklı kolon çalışması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda sırasıyla, 3, 29 ve 8 kat saflaşma sağlanmıştır. 1. kolon çalışmasında 11-31 fraksiyonları, 2. kolon çalışmasında 3-8 fraksiyonları, 3. kolon çalışmasında 17-26 fraksiyonları proteaz aktivitesi göstermiştir. Grafiklerde proteinlerin tam olarak

spesifik aktivite pikinin altında pik vermemesi enzimin tam olarak saflaşmamış olmasındandır.

9) Yapılan iyon değiştirme kromatografisinin 2. ve 3. kolon çalışmasında 3 M NaCl kullanılmıştır. Bu nedenle 1. kolon çalışmasına göre daha fazla saflaşma sağlanmıştır.

10) Yapılan iyon değiştirme kromatografisinin 3. alışmasında spesifik aktivite 84 U/mg olarak bulunmuştur. Bu sonuç da endüstride deterjan katkı maddesi olarak kullanılan, *Bacillus subtilis* türünden üretilen serin alkalın proteazın spesifik aktivitesi ile aynıdır.

11) alışmada yapılan diyaliz işlemlerinde genelde aktivite kaybedilmiştir. Bunun nedeni, kullanılan diyaliz bandının elde edilen proteaz enzimleri için uygun olmaması olabilir.

12) Bütün saflaştırma işlemlerinde, aktivite kaybını önlemek için 4°C'nin altındaki sıcaklıklarda çalışmak gereklidir. Bu çalışmada özellikle soğutmalı santrifüj kullanılmadığından yüksek devirlerde aktivite kaybı olmuştur.

13) *Bacillus* türlerinden elde edilen kısmi olarak saflaşmış proteaz enzimlerinin aktivitesi ve kararlılığı üzerine bazı parametrelerin etkisini incelemek amacı ile gerçekleştirilen çalışmalarda aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur.

Bacillus subtilis bakteri türünde elde edilen proteaz enzimi için;

- Proteaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık 60°C'dir.
- Proteaz enziminin 50-60°C sıcaklık aralığında stabil kaldığı tespit edilmiştir.
- Proteaz enziminin aktivitesi pH 8.48'de en yüksek değere ulaşmıştır.
- Proteaz enziminin 4-7 pH aralığında karalı olduğu görülmüştür.
- Reaksiyon zamanı ve substrat konsantrasyonunun aktivite üzerindeki etkisi incelendiğinde, reaksiyon süresi ve substrat konsantrasyonu arttıkça aktivite artmaktadır.
- *Bacillus subtilis* bakteri türünden elde edilen proteaz enzimi için, V_{max} değeri substrat konsantrasyonu-ilk hız grafiğinden 0.343 olarak okunmuştur. $(1/2 \times V_{max})$ hız değerine karşılık gelen konsantrasyon değeri 0.002 mol/l olarak bulunmuştur. Bu değer Michaelis-Menten sabitinin (K_m) değeridir.

- *Bacillus subtilis* bakteri türünden elde edilen proteaz enzimi için $MnCl_2$ 'nin, $FeCl_2$ ve $CaCl_2$ 'ye göre daha etkili bir aktivatör olduğu görülmüştür.
- *Bacillus subtilis* bakteri türünden elde edilen proteaz enzimi için, EDTA daha etkili bir inhibitördür. $CuCl_2$ ise, elde edilen proteaz enzimi üzerinde daha az inhibe edici olmuştur.

Bacillus cereus bakteri türünde elde edilen proteaz enzimi için;

- Proteaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık $60^{\circ}C$ 'dir.
- Proteaz enziminin $50-60^{\circ}C$ sıcaklık aralığında kararlı kaldığı tespit edilmiştir.
- Proteaz enziminin aktivitesi pH 7.43'de en yüksek değere ulaşmıştır.
- Proteaz enziminin 4–7.7 pH aralığında kararlı olduğu görülmüştür.
- Reaksiyon zamanı ve substrat konsantrasyonunun aktivite üzerindeki etkisi incelendiğinde reaksiyon zamanı ve substrat konsantrasyonu arttıkça aktivitenin arttığı gözlenmiştir.
- *Bacillus cereus* bakteri türünden elde edilen proteaz enzimi için, V_{max} değeri substrat konsantrasyonu-ilk hız grafiğinden 0.238 olarak okunmuştur. $(1/2 \times V_{max})$ hız değerine karşılık gelen konsantrasyon değeri 0.002 mol/l olarak bulunmuştur. Bu değer Michaelis-Menten sabitinin (K_m) değeridir.
- *Bacillus cereus* bakteri türünden elde edilen proteaz enzimi için $MnCl_2$ 'nin, $FeCl_2$ ve $CaCl_2$ 'ye göre daha etkili bir aktivatör olduğu görülmüştür.
- *Bacillus cereus* bakteri türünden elde edilen proteaz enzimi için $CuCl_2$ daha etkili bir inhibitördür. EDTA ise elde edilen proteaz enzimi üzerinde daha az inhibe edici olmuştur.

Yukarıdaki sonuçlara göre, *Bacillus subtilis*'den elde edilen proteaz enziminin en yüksek aktiviteyi pH 8.48'de göstermesi bu enzimin alkalın pH'larda etkili olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla bu enzimin serin alkalın proteaz olması olasıdır.

Bacillus cereus' dan elde edilen proteaz enzimi ise en yüksek aktiviteyi pH 7.43'de göstermesi bu enzimin nötr pH'larda etkili olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla bu enzimin metallo proteaz olması olasıdır.

Aktivite üzerine sıcaklığın etkisi incelendiğinde, optimum sıcaklık ve sıcaklık kararlılığı için yapılan deney sonuçları aynı grafikte çizildiğinde optimum sıcaklık

grafığı, sıcaklık kararlılığı grafığının dışına çıktığından, elde edilen enzimin sıcaklığa dayanıklı olduğu ve kullanılan substratın aktif olmadığı görülmüştür.

İki bakteri türünden de elde edilen proteaz enzimlerinin, uzun çalışma süresi boyunca aktivitelerini kaybetmemeleri bu enzimlerin kararlı olduklarını göstermiştir.

14) SDS-PAGE ile molekül ağırlığı tayini yapıldığında, *Bacillus subtilis* bakteri türünde elde edilen proteaz enziminin molekül ağırlığı, yaklaşık 45 kDa olarak bulunmuştur. *Bacillus cereus* bakteri türünden elde edilen proteaz enziminin molekül ağırlığı, yaklaşık 37 kDa olarak bulunmuştur. SDS-PAGE çalışmasında bantların net olmaması enzimlerin, sadece amonyum sülfat çöktürmesinden sonra jele beslenmiş olmalarındandır. Daha net bantların elde edilebilmesi için iyon değiştirme kromatografisi (DEAE-Selüloz) ve daha başka saflaştırma işlemleri yapılarak enzimler daha çok saflaştırılmalıdırlar.

15) Bu çalışmada *Bacillus* türleri ile yapılan çalışma sonucunda, seri alkalın proteaz ve metallo (nötr) proteaz türleri elde edilmiştir. *Bacillus subtilis* türünden elde edilen proteaz enzimi, alkalın pH'larda aktif olması nedeniyle deterjan katkı maddesi olarak kullanıma uygundur. 3. Çalışmada elde edilen proteaz 84 U/mg spesifik aktiviteye sahiptir bu da endüstride deterjan katkı maddesi olarak kullanılan, *Bacillus subtilis* türünden üretilen serin alkalın proteazın spesifik aktivitesi ile aynıdır. Bu çalışma daha uygun şartlarda denenerek daha ileri kademelere götürülebilir.

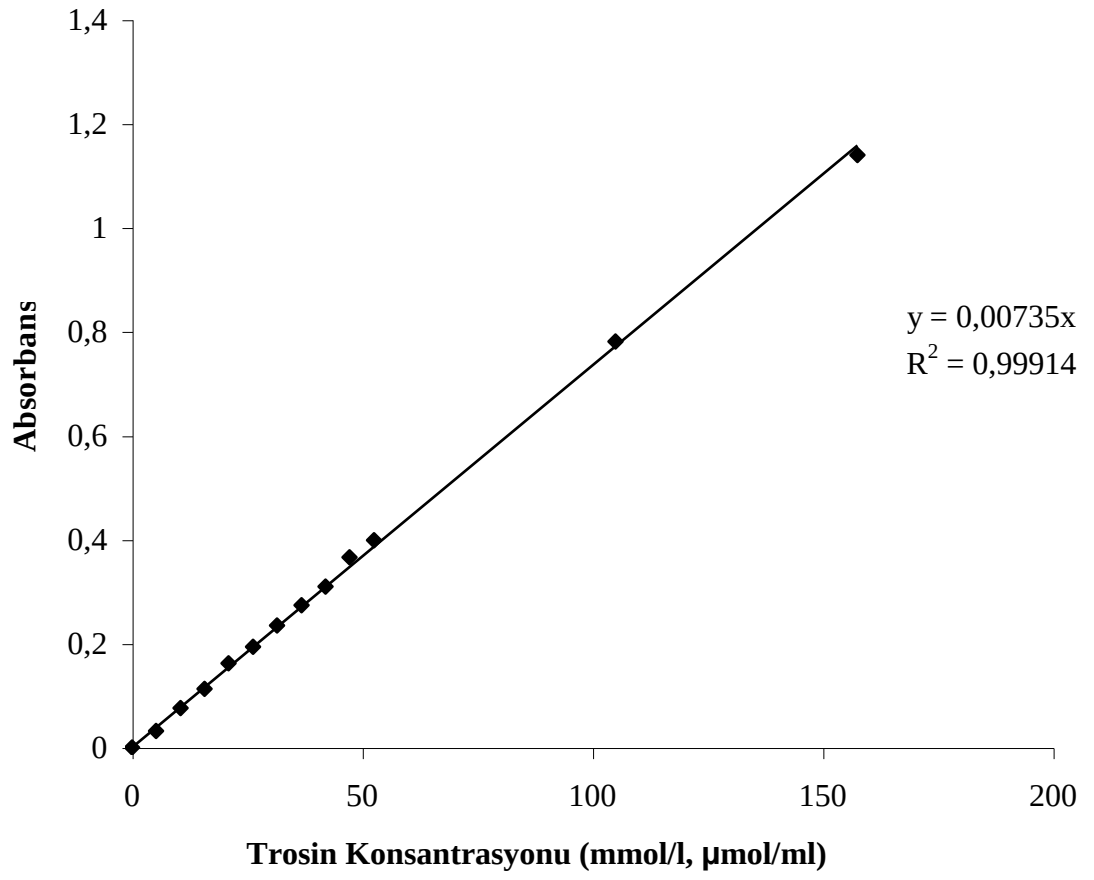
KAYNAKLAR

- [1] **Halgas, J.**, 1992. Biocatalysts in Organic Synthesis, New York-Tokyo.
- [2] **Özikara, E.**, 1999. Biyokimya, Ankara Ün. Yayınları
- [3] **Gerhartz, W.**, 1990. Enzymes in Industry, VCH., Weinheim, Germany
- [4] **Stryer, L.**, 1981. Biochemistry, Freeman, Sanfrancisco, USA.
- [5] **Rainbow, C.**, 1963. Biochemistry of Industrial Microorganisms, London, UK.
- [6] **James, H.**, 2000. Biotechnol. Applied Biochemistry, **31**, 85-89.
- [7] **Özeriş, S.**, 1993. Temel Organik Kimya, İstanbul.
- [8] **Trevor, P.**, 1994. Enzim Bilgisi, Bilim ve Teknoloji Yayınları Çeviri Vakfı
- [9] **Brown, H., W.**, 1987. Introduction to Organic and Biochemistry, 4th Ed., Brooks/Cole Publishing Company, Belmont, California.
- [10] **Bugg, T.**, 1996. An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry, Blackwell Science, Oxford, U.K.
- [11] **Fox, P. F.**, 1991. Food Enzymology, University College Cork Cork, Ireland.
- [12] **Reed, G.**, 1993. Enzymes In Food Processing, Milwaukee, Wisconsin.
- [13] **Fogarty, W. M.**, 1990. Microbial Enzymes and Biotechnology, Elsevier Applied Science, London.
- [14] **Fersht, A.**, 1998. Structure and Mechanism in Protein Science, Freeman and Company, USA.
- [15] **Doonan, S.**, 1996. Protein Purification Protocols, Humana Press, New Jersey.
- [16] **Jadwiga, K. S.**, 1998. Purification and Partial Characterization of a Neutral Protease from a Virulent Strain of *Bacillus cereus*, J. of Biochemistry and Cell Biology, **30**, 579 - 595.
- [17] **Jen-Kuo, Y.**, 2000. Production and Purification of Protease from a *Bacillus subtilis* that can Deproteinize Crustacean Wastes, Enzyme and Mic.Technology, **26**, 406 – 413.
- [18] **Qasim, K.**, 2003. Purification and Characterization of an Oxidation-Stable, Thiol-Dependent Serine Alkaline Protease from *Bacillus mojavensis*, Enzyme and Microbial Technology, **32**, 294-304.
- [19] **Basma G., Alya S. K.**, 2003 Stability Studies of Protease from *Bacillus cereus* BG1, Enzyme and Microbial Technology, **6261**, 1-6
- [20] **Kumar, C. G.**, 2002. Purification and Characterization of a Thermostable Alkaline Protease from Alkalophilic *Bacillus pumilus*, Letters in Apl. Microbiology, **34**, 13-17.

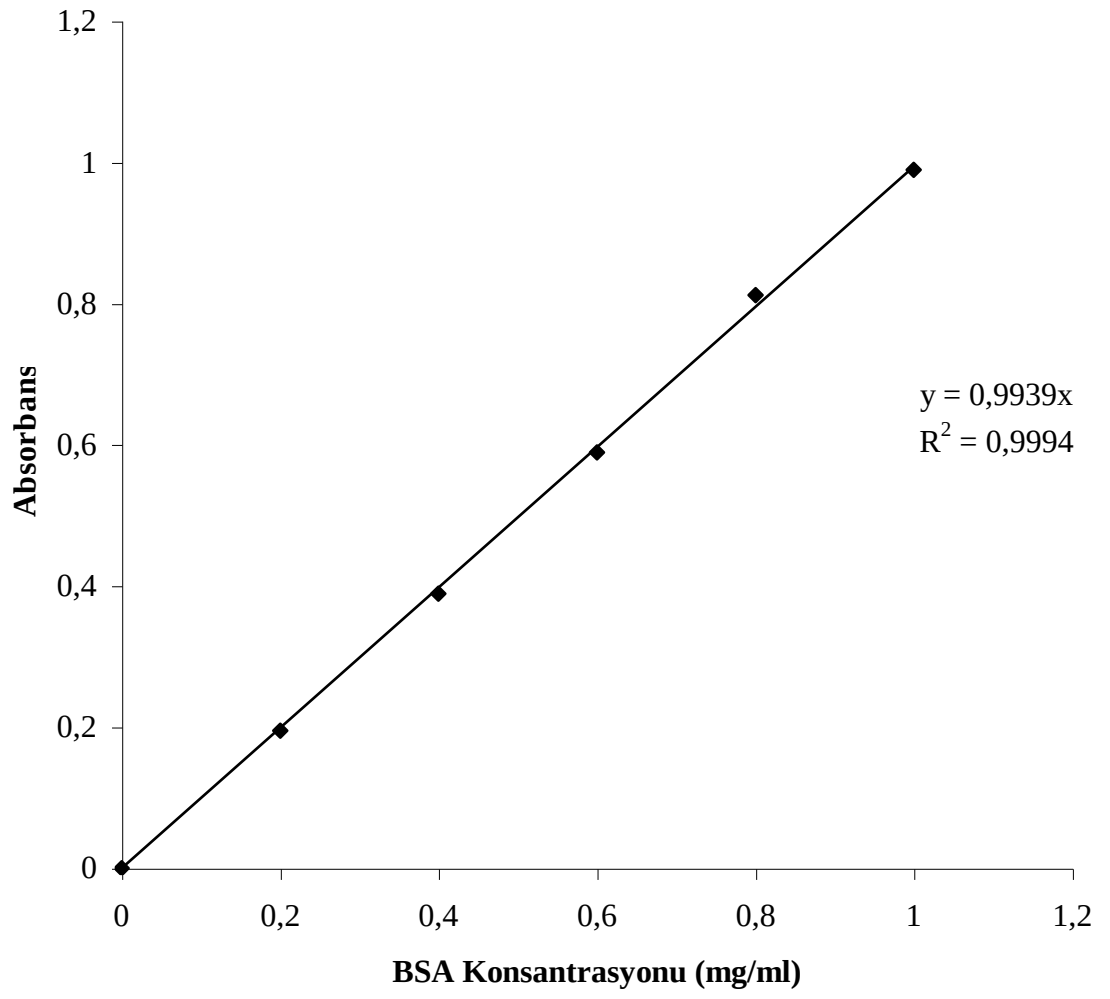
- [21] Johnvesly, B., 2002. Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for Production of a Thermostable Alkaline Protease from Thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99, Biosource Tech., **82**, 61-64.
- [22] Sookkheo, B., 2000. Purification and Characterization of the Highly Thermostable Proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33, Protein Expression and Purification, **20**, 142-151.
- [23] Uttam, C., Kumar S., 1999. Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus brevis* and its Characterization as a Laundry Detergent Additive, Process Biochemistry, **35**, 213-219.
- [24] Kumar, C.G., 1999. Novel Serine Proteases from Alkalophilic *Bacillus* ssp.: Purification and some Properties, Process Biochemistry, **34**, 441-449.
- [25] Mehrotra, S., 1999. The Production of Alkaline Protease by a *Bacillus* Species Isolate, Biosource Tech., **67**, 201-203.
- [26] Matta, H., 1998. Isolation and Partial Characterization of a Thermostable Protease of *Bacillus polymxa* B-17, Int. Journal of Food Mic., **42**, 139-145.
- [27] Aoki, K., 1995. Anaerobic Synthesis of Extracellular Proteases by the Soil Bacterium *Bacillus* sp. AM-23: Purification and Characterization of the Enzymes, Soil Biol. Biochem., **27**, 1377-1382.
- [28] Kamal, M., 1995. Isolation Characterization and Structure of Subtilisin from a Thermostable *Bacillus subtilis* Isolate, FEBS Letters, **374**, 363-366.
- [29] Hisao, S., 1991. Purification and Properties of a Surface-Active Agent and Alkaline Resistant Protease from *Bacillus* sp., Agric. Biol. Chem., **55**, 2251-2258.
- [30] Price, N. C., Stevens, L., 1982. Fundamentals of Enzymology, Oxford.
- [31] Çetin, E. T., 1965. Pratik Mikrobiyoloji, İsmail Akgün Matbaası, İstanbul.
- [32] Sonenshein, A. L., 1993. *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria, Washington.
- [33] Jica, 1995. Enzyme Technology Course Book, Japan International Cooperation Agency, Osaka, Japan
- [34] Stoscheck, C. M., 1990. Quantitation of Protein, Methods in Enzymology, **182**, 50-69.

EKLER

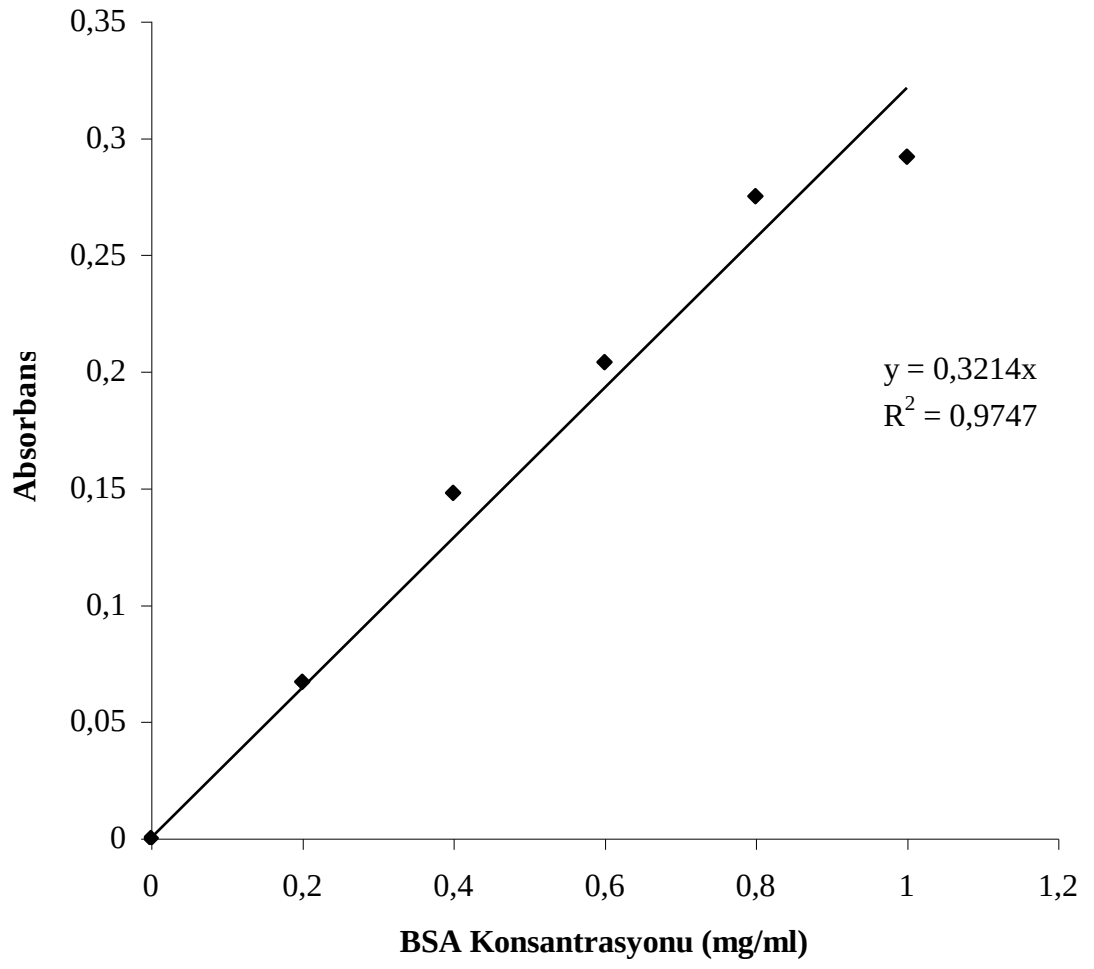
A. Şekiller



Şekil A.1. Trosin Standart Eğrisi



Şekil A.2. BSA Standart Eğrisi (280 nm)



Şekil A.3. BSA Standart Eğrisi (BCA yöntemi)

ÖZGEÇMİŞ

Elif ORHAN 1978 yılında İstanbulda doğdu. Lise öğrenimini Z.Burnu Teknik Lisesi Bilgisayar bölümünde tamamladı. 1996 senesinde İstanbul Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümüne girdi. 2000 yılında bu bölümden mezun oldu. 2000 yılında İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya Mühendisliği bölümünde yüksek lisansa başladı. Halen İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Kimya Mühendisliği Programında yüksek lisansına devam etmektedir.