

Hidrokarbonla Kirlenmiş Alanlardan İzole Edilen Bakterilerin Proteaz Üretim  
Yeteneklerinin Araştırılması

Burçin Özçelik

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Biyoloji Anabilim Dalı

şubat, 2012

Investigation of protease production ability  
of bacteria isolated from hydrocarbon polluted area

Burçin Özçelik

**MASTER OF SCIENCE THESIS**

Department of Biology

February, 2012

Hidrokarbonla Kirlenmiş Alanlardan İzole Edilen Bakterilerin Proteaz Üretim  
Yeteneklerinin Araştırılması

Burçin Özçelik

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Genel Biyoloji Bilim Dalında  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç.Dr. Ahmet ÇABUK

şubat, 2012

## ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Burçin ÖZÇELİK' in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Hidrokarbonla Kirlenmiş Alanlardan İzole Edilen Bakterilerin Proteaz Üretim Yeteneklerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

**Danışman** : Doç. Dr. Ahmet ÇABUK

**İkinci Danışman** :-

**Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:**

**Üye** : Prof.Dr. Semra İLHAN

**Üye** : Prof. Dr. Tamer AKAR

**Üye** : Doç. Dr. Cansu Filik İŞCEN

**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN

**Üye** : Doç. Dr. Ahmet ÇABUK

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Bu çalışmada hidrokarbon ile kirlenmiş 5 farklı istasyondan aseptik şartlarda alınan toprak örneklerinden 69 farklı bakteri türü izole edilmiştir. Proteolitik aktiviteleri bakımından taranan izolatlar oluşturdukları hidrolitik zon çaplarına göre değerlendirilmiş ve en geniş zon çapına sahip 3 izolat arasında kantitatif tayin sonucunda en yüksek aktiviteyi gösteren D3 izolatı gram özelliği bakımından incelenmiş ve bazı biyokimyasal testleri yapılmıştır.

D3 izolatının proteaz üretim yeteneği üzerine çeşitli faktörlerin etkisi incelenmiş ve üretim ortamının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla en uygun başlangıç pH değeri, karbon ve azot kaynakları ve bu kaynakların miktarları, inokulum miktarı, inkübasyon sıcaklık ve süre değerleri belirlenmiştir. D3 izolatı için en yüksek proteaz aktivitesi karbon kaynağı olarak %2 laktoz, azot kaynağı olarak %0,5 maya özütü kullanıldığında ve %1' lik inokulasyon oranında, 35°C' de 48 saatlik inkübasyon sonucunda gözlenmiştir.

D3 izolatının ürettiği proteaz enziminin karakterizasyonu amacıyla yapılan çalışmalarda enzimin optimum reaksiyon sıcaklığı 55°C ve optimum reaksiyon pH değeri 11 olarak bulunmuştur. Enzim amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleri ile kısmi olarak saflaştırılmış ve 1.61 kez saflaştırma sağlanmıştır. Enzim aktivitesi üzerine ağır metallerin inhibisyon etkisi olduğu gözlenmiştir. SDS-PAGE yöntemi ile moleküler ağırlığı 45-55 kDa, 29-36 kDa ve 24-29 kDa arasında olmak üzere üç bant gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hidrokarbon, proteolitik enzim, optimizasyon, kısmi saflaştırma, karakterizasyon

## SUMMARY

In this study, 69 bacteria were isolated from soil samples taken from five different stations contaminated with hydrocarbon. Isolates scanned for proteolytic activities were evaluated according to hydrolytic zone diameter they formed and the isolate D3 showed the highest activity as a result of quantitative determination of three isolates had widest zone diameters was examined for gram reaction and some biochemical tests were performed.

The effect of various factors on protease production ability of D3 isolate were examined and optimisation of production medium was performed. For this purpose, optimal initial pH value, carbon and nitrogen sources and amount of these sources, inoculum size, values of incubation temperature and time were determined. The highest protease activity for D3 isolate was observed when %2 lactose was used as a carbon source and %0,5 yeast extract as a nitrogen source and in %1 inoculation ratio, after 48 h incubation at 35°C.

In the studies for characterization of protease enzyme produced by D3 isolate, the optimum reaction temperature and pH value were determined as 55°C and pH 11. Enzyme was purified partially by ammonium sulphate precipitation and dialysis and 1,61 fold purification was provided. Inhibition effect of heavy metals was observed on protease activity. Three bands with molecular mass between 45-55 kDa, 29-36 kDa and 24-29 kDa were observed by SDS-PAGE.

**Keywords:** Hydrocarbon, proteolytic enzyme, optimisation, partial purification, characterisation

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, çalışmalarımın tüm aşamalarında beni destekleyerek yönlendiren ve bana her konuda çalışma olanağı veren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ahmet ÇABUK' a,

Lisans ve yüksek lisans eğitim döneminde ilgi ve desteğini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Nazif KOLANKAYA' ya,

Tez çalışmam sırasında laboratuvar imkanlarını paylaşan hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN' a ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Venom Araştırma Laboratuvarı çalışanı biyolog Neslihan ATLIAKIN' a,

Çalışmamda kullandığım toprak örneklerini toplayan biyolog Meltem ÇELİKDEMİR'e

Laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen biyolog Ezgi YARDIMCI, Pınar AYTAR, Serap GEDİKLİ ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışanlarına,

Öğrenim hayatım boyunca beni her zaman destekleyen, ilgi ve yardımlarını benden esirgemeyen sevgili aileme en içten dileklerle teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	v
<b>SUMMARY</b> .....	vi
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	vii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	viii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xiii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xv
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xvi
<b>1.GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1 Enzimlerin Yapısı .....	4
2.2 Enzimlerin Adlandırılması, Sınıflandırılması ve Biyoinformatik .....	5
2.2.1 Oksidoredüktazlar .....	8
2.2.2 Transferazlar .....	8
2.2.3 Hidrolazlar .....	8
2.2.4 Liyazlar .....	8
2.2.5 İzomerazlar .....	9
2.2.6 Ligazlar .....	9
2.3 Enzim Kaynakları .....	10
2.4 Enzim Aktiflik Birimleri .....	12



## İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

### Sayfa

2.5 Proteazlar .....	13
2.5.1 Proteazların Sınıflandırılması.....	14
2.5.2 Katalitik Mekanizmalarına Göre Proteazlar .....	17
2.5.3 Aktif oldukları pH değerine göre proteazlar .....	21
2.5.4 Proteaz kaynakları .....	22
2.5.4.1 Bitkisel kaynaklar .....	22
2.5.4.2. Hayvansal kaynaklar .....	24
2.5.4.3. Mikrobiyal kaynaklar .....	24
2.5.5 Mikrobiyal proteazların endüstride kullanım alanları .....	26
2.5.6 Mikrobiyal alkalen proteaz üretimi .....	26
2.5.6.1 Alkalen proteaz üretiminde etkili faktörler .....	27
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>28</b>
3.1 Materyal .....	29
3.1.1 Kullanılan kimyasallar .....	29
3.1.2 Kullanılan besi ortamları .....	29
3.1.3 Kullanılan çözeltiler .....	32
3.2 Yöntem .....	40
3.2.1 İzolasyon çalışmaları.....	40
3.2.2 İzolatların ekstraselüler proteaz enzim üretim yeteneklerinin belirlenmesi...	41
3.2.3 Proteaz üretimi .....	41
3.2.4 Proteaz aktivite tayini.....	41
3.2.4.1. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması .....	42

## İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

### Sayfa

3.2.5 Proteaz üretimi için etkin izolatın belirlenmesi .....	43
3.2.6 Seçilen İzolatın Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi .....	43
3.2.7 Proteaz üretimi için en uygun koşulların belirlenmesi .....	44
3.2.7.1 Üretim ortamının başlangıç pH değerinin proteaz üretimine etkisi .....	45
3.2.7.2 İnokulum miktarının proteaz üretimine etkisi .....	45
3.2.7.3 Karbon kaynağının proteaz üretimine etkisi .....	45
3.2.7.4 Karbon kaynağı miktarının proteaz üretimine etkisi .....	46
3.2.7.5 Azot kaynağının proteaz üretimine etkisi .....	46
3.2.7.6 Azot kaynağı miktarının proteaz üretimine etkisi .....	46
3.2.7.7 İnkübasyon sıcaklığının proteaz üretimine etkisi .....	47
3.2.7.8 İnkübasyon süresinin proteaz üretimine etkisi .....	47
3.2.8 Üretilen proteaz enziminin karakterizasyonu .....	48
3.2.8.1 Proteaz enziminin optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi .....	48
3.2.8.2 Proteaz enziminin optimum reaksiyon pH değerinin belirlenmesi .....	48
3.2.8.3 Proteaz enziminin termostabilitesinin belirlenmesi .....	49
3.2.8.4 Proteaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi .....	49
3.2.8.5 Ağır metallerin proteaz aktivitesi üzerine etkisi .....	49
3.2.8.6 Çeşitli denatürantların proteaz aktivitesi üzerine etkisi .....	50
3.2.9 Proteaz enziminin kısmi saflaştırılması .....	50
3.2.9.1 Proteaz enziminin amonyum sülfat ile çöktürülmesi .....	50
3.2.9.2 Diyaliz .....	51
3.2.10 Proteaz enziminin molekül ağırlığının belirlenmesi .....	53
3.2.10.1 Örneklerin yüklenmesi .....	54

## İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
3.2.10.2 Örneklerin boyanması .....	54
3.2.11 Proteaz enziminin zymogram analizi .....	55
3.2.12 Proteaz enzim çözeltisinde toplam protein tayini .....	55
3.2.12.1 Protein standart grafiğinin hazırlanması.....	56
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>57</b>
4.1 İzolasyon Çalışmaları .....	57
4.2 İzolatların Ekstraselüler Proteaz Enzim Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi .....	57
4.3 Proteaz Üretimi İçin Etkin İzolatın Seçilmesi .....	59
4.4 Seçilen İzolatın Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi .....	60
4.4 Proteaz Üretimi İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi .....	62
4.4.1 Üretim ortamının başlangıç pH değerinin proteaz üretime etkisi .....	62
4.4.2 İnokulum miktarının proteaz üretime etkisi .....	63
4.4.3 Karbon kaynaklarının proteaz üretime etkisi .....	64
4.4.4 Karbon kaynağı miktarının proteaz üretime etkisi .....	64
4.4.5 Azot kaynaklarının proteaz üretime etkisi .....	65
4.4.6 Azot kaynağı miktarının proteaz üretime etkisi .....	66
4.4.7 İnkübasyon sıcaklığının proteaz üretime etkisi .....	67
4.4.8 İnkübasyon süresinin proteaz üretime etkisi .....	68
4.5 Üretilen Proteaz Enziminin Karakterizasyonu .....	69
4.5.1 Proteaz enziminin optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi .....	69
4.5.2 Proteaz enziminin optimum reaksiyon pH değerinin belirlenmesi .....	70
4.5.3 Proteaz enziminin termostabilitesinin belirlenmesi .....	71
4.5.4 Proteaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi.....	72

**İÇİNDEKİLER (devam ediyor)****Sayfa**

4.5.5 Ağır metallerin proteaz aktivitesi üzerine etkisi .....	73
4.5.6 Çeşitli denatürantların proteaz aktivitesi üzerine etkisi .....	75
4.6 Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması .....	76
4.7 Proteaz Enziminin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi .....	78
4.8 Proteaz Enziminin Zymogram Analizi .....	79
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>80</b>
<b>6. KAYNAKLAR DİZİNİ .....</b>	<b>86</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Holoenzim kısımları .....	5
2.2 Proteazların hidroliz reaksiyonun mekanizması .....	13
2.3 Serin proteazın katalik bölgesindeki katalitik triad.....	18
3.1. a) Amonyum sülfat çöktürmesi b) Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu oluşan protein pelletleri .....	51
3.2. a) Diyaliz başlangıcı b) Diyaliz başlangıcından 4 saat sonra diyaliz tüpünün görüntüsü.....	53
4.1 a) A7 izolatının SMA' da görünümü b) D3 izolatının SMA' da görünümü.....	57
4.2 Kuvvetli proteolitik aktivite gösteren izolatların proteaz aktivitesi.....	59
4.3 D3 izolatı, <i>E.coli</i> ve <i>K. pneumoniae</i> için indol testi görüntüsü .....	61
4.4 Başlangıç pH değerinin proteaz üretimi üzerine etkisi .....	63
4.5 İnokulum miktarının proteaz üretimine etkisi.....	64
4.6 Karbon kaynağının proteaz üretimine etkisi .....	65
4.7 Karbon kaynağı miktarının proteaz üretimine etkisi.....	66
4.8 Azotkaynağının proteaz üretimine etkisi .....	67
4.9 Azot kaynağı miktarının proteaz üretimine etkisi.....	68
4.10 İnkübasyon sıcaklığının proteaz üretimine etkisi.....	69
4.11 İnkübasyon süresinin proteaz üretimine etkisi.....	70
4.12 Proteaz enziminin optimum reaksiyon sıcaklığı.....	71
4.13 Proteaz enziminin optimum reaksiyon pH değeri.....	72
4.14 Proteaz enziminin termostabilitesi.....	73
4.15 Proteaz enziminin pH stabilitesi.....	74

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<b><u>Şekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>4.16</b> Ağır metallerin proteaz enzimi üzerine etkisi.....	75
<b>4.17</b> Ağır metallerin proteaz enzimi üzerine etkisi.....	76
<b>4.18 a)</b> Proteaz enziminin SDS-PAGE analizi <b>b)</b> rekombinant marker.....	79
<b>4.19</b> Proteaz enziminin zymogram analiz sonuçları EDTA ve PMSF varlığında.....	80

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Enzimlerin uluslararası sınıflandırması.....	6
2.2 Enzimler ve elde edildikleri kaynaklar.....	11
2.3 Proteazların sınıflandırılması.....	14
4.1 SMA' da hidrolitik zon çapları.....	58
4.2 Seçilen D3 izolatının tanımlanması için yapılan testlerin sonuçları.....	61
4.3 Çeşitli denatürantların proteaz aktivitesi üzerine etkisi.....	76
4.4. Ham enzim ile kısmi saflaştırma sonrası enzimin aktivite ve protein miktarlarının karşılaştırılması.....	78

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

**kDa**

### Açıklamalar

Kilodalton

### Kısaltmalar

**NAD<sup>+</sup>**

Nikotinamid Adenin Dinükleotit

**NADP<sup>+</sup>**

Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

**EC-IUB**

Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu

**ATP**

Adenozin Trifosfat

**PMSF**

Fenilmetilsülfonilflorür

**DFP**

Di-izopropilflorofosfat

**TLCK**

Tosil-L-lizin klorometil keton

**3,4-DCI**

3,4- dikloroizokumarin

**PCMB**

p-kloromerküribenzoat

**TPCK**

Tosil-L-fenilalanin klorometil keton

**Asp**

Aspartik asit

**Ser**

Serin

**Gly**

Glisin

**Thr**

Treonin

**DAN**

diazoacetyl-dl-norleucine methyl ester

**EPNP**

1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)propane

**EDTA**

Etilen Diamin Tetra Asetik Asit



**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

<b><u>Kısaltmalar</u></b>	<b><u>Açıklamalar</u></b>
<b>SMA</b>	Skim Milk Agar
<b>TCA</b>	Trikloro Asetik Asit
<b>APS</b>	Amonyum Per Sülfat
<b>TEMED</b>	n,n,n,n-Tetrametiletildiamin
<b>SDS</b>	Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SDS-PAGE</b>	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>et al.</b>	Ve diğerleri
<b>vd.</b>	Ve diğerleri
<b>g</b>	Gram
<b>ml</b>	Mililitre
<b>L</b>	Litre
<b>M</b>	Molar
<b>µl</b>	Mikrolitre
<b>mm</b>	Milimetre

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Enzimler, yüksek özgülükte katalitik fonksiyonları olan, genetik kontrol altında hücre içinde sentez edilen, protein yapısındaki organik moleküllerdir. Biyolojik sistemlerde makromoleküllerin sentez ve yıkımı, genetik bilginin aktarılması, hücre zarından madde geçişi ve kimyasal enerjinin dönüşümü gibi biyokimyasal reaksiyonların biyolojik katalizörü olan enzimler, kimyasal katalizörlerle karşılaştırıldıklarında birçok üstünlüğe sahiptirler. Enzimlerin kimyasal katalizörlere göre en önemli üstünlükleri yüksek seçicilik göstermeleridir. Enzimlerin bir kısmı belirli fonksiyonel grupları içeren sınırlı sayıda moleküllere etki ederken, bir kısmı sadece tek bir moleküle eder. Bu tür enzimler aynı molekülün sterioizomerlerine bile etki göstermezler. Kimyasal katalizörlere göre daha düşük sıcaklıklara ihtiyaç duyan enzimler pH 2-12 gibi geniş bir pH aralığında aktivite gösterebilirler. Düşük enerji tüketimi, yan ürün oluşturmamaları, toksik özellik göstermemeleri, biyolojik olarak parçalanabilir olması ve tekrar kullanılabilir olmaları enzimlere, kimyasal katalizörler karşısında üstünlük sağlayan özelliklerdir (Johannes et al., 2006).

Bu üstünlüklerinin keşfedilmesinden itibaren enzimler endüstriyel alanlarda sıklıkla kullanılmaya başlamıştır. Ekmek yapımı, etlerin yumuşatılması, glikoz şurubu üretimi gibi işlemler için gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan enzimlerden bu geleneksel uygulamaların yanısıra terapötik ajanlar olarak ve immunoassaylerde marker olarak tıp alanında, eczacılıkta, tarım ve hayvancılıkta, deterjan endüstrisi ve deri endüstrisi gibi alanlarda da yararlanılmaktadır (Illanes, 2008).

Endüstride sıklıkla kullanılan enzimlere  $\alpha$ -amilaz, selülaz,  $\beta$ -glukanaz, glukoamilaz, lipaz, pektinaz ve proteazlar örnek olarak verilebilir. Bütün ticari enzimlerin %34'ü deterjan, %14'ü süt ürünleri, %12'si nişasta işletmeleri ve %11'i tekstil uygulamaları için kullanılmaktadır (Waites et al., 2001). Proteazlar % 60' lık pazar payı ile endüstriyel enzimlerin en önemli grubunu oluşturmaktadır (Pawar et al., 2009). Enzim pazarı 1998 yılında 1.6 milyar dolara, 2000 yılında 2 milyar dolara

ulaşmıştır (Barredo, 2005). 2012 yılında ise sadece proteaz pazarının 2.9 milyar doları geçmesi beklenmektedir (Khan et al., 2011).

Endüstriyel uygulamalarda geniş bir kullanım alanı bulunan proteazlar, proteinlerin peptid bağlarının hidrolizinden sorumlu ve biyolojik sistemlerde oldukça önemli fizyolojik işlevleri olan enzimlerdir. Proteinleri terminallerine yakın bağlardan ya da iç peptid bağlarından hidroliz etmelerine göre endo ve ekzopeptidazlar olarak ikiye ayrılırlar. Katalitik mekanizmalarına göre serin, sistein, aspartil ve metallo proteazlar olmak üzere dört gruba ayrılan proteazlar aktif oldukları pH değerine göre asidik, nötral ve alkalin proteazlar olarak sınıflandırılırlar. Geniş bir pH aralığında aktif olan proteazlar gıda ve deterjan endüstrisi başta olmak üzere birçok endüstri kolunun vazgeçilmez enzimleridir.

Çeşitli amaçlar ile gündelik ve ekonomik hayata giren enzimlerin kaynağını hayvansal dokular, bitkiler ve mikroorganizmalar oluşturmaktadırlar. Bu kaynaklar arasında daha çok mikroorganizmalar tercih edilmektedir. Bu tercihin nedenleri arasında; mikrobiyal enzimlerin katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, daha stabil ve ucuz olması, aktivitelerinin yüksek olması, büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta üretilebilmesi, fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajlar sayılabilir (Zemans and McCrea, 1985; Kıran vd, 2006). Mikrobiyal enzimler, antibiyotik üretimi, kimyasal reaksiyonlar, deterjan endüstrisi, kağıt hamuru ve kağıt endüstrisi, tekstil, gıda teknolojisi ve biyoremediasyon gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır.

Çok fazla sayıda enzim sentezleyen mikroorganizmaların enzim çeşitliliği türler arasında farklılık gösterdiği gibi aynı türün farklı suşları arasında da farklılıklar bulunabilmektedir. Organik maddelerin ayrıştırılmasında ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda önemli role sahip olan mikroorganizmalar toprak ekosisteminde büyük çeşitlilik göstermektedir (Baran et al., 2004). Toprak mikroflorası çevresel streslere karşı oldukça duyarlıdır. Çevresel şartlardaki değişimler ve toprak ekosisteminin ağır metaller, pestisitler ya da hidrokarbonlar tarafından kirletilmesi topraktaki mikroorganizma çeşitliliğinin azalmasına neden olabilmektir (Margesin, 2000). Ancak bu değişimlere uyum sağlayan mikroorganizmaların metabolik yollarında modifikasyonlar meydana gelebilmektedir. Ağır metaller ve pestisitler gibi toprak

kirleticileri mikroorganizmaların enzimatik faaliyetlerini inhibe etmektedirler. Çeşitli kaynaklardan çevreye giren ve önemli kirleticilerden olan hidrokarbonlar bazı mikroorganizmalar tarafından organik karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır ve bu mikroorganizmalar metabolik aktivitelerini arttırmaktadır (Labud et al., 2007). Bu özellikleri nedeniyle son yıllarda toprak mikroorganizmalarının enzimatik aktiviteleri ile topraktaki hidrokarbon kirliliklerinin iyileştirilmesi çalışmaları dikkat çekmektedir.

Bu çalışmada hidrokarbon ile kirlenmiş topraklardan izole edilen 69 bakteriyel izolatın proteolitik aktiviteleri taranmıştır. Tarama sonucunda seçilen 3 izolatın proteolitik aktiviteleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak tayin edilmiş ve çalışmaya maksimum proteaz aktivitesi gösteren izolat ile devam edilmiştir. İzolatın proteolitik enzim üretim yeteneği üzerine karbon ve azot kaynakları ile bu kaynakların miktarlarının etkisi, başlangıç pH ve inokulum miktarı araştırılmış, sıcaklık ve süre gibi kültür koşulları optimize edilmiştir. Optimum koşullarda üretimi gerçekleştirilen proteolitik enzimin sıcaklık ve pH profili çıkarılmış, çeşitli inhibitörlerin, ağır metallerin ve denatürantların enzim aktivitesi üzerine etkisi çalışılmıştır. Ayrıca kısmi olarak saflaştırılan enzimin Sodyum Dodesil Sulfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) yöntemi ile molekül ağırlığı belirlenmiştir.

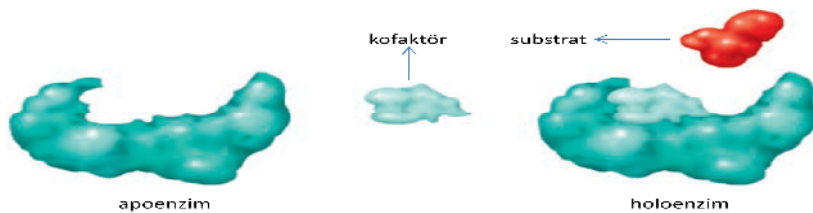
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Enzimlerin Yapısı

Canlı sistemlerde meydana gelen birçok kimyasal reaksiyon, protein yapısındaki enzimler tarafından düzenlenir. Birbirlerine peptid bağları ile bağlanmış aminoasit moleküllerinden oluşan enzimler, kimyasal reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürerek biyolojik katalizörler olarak görev görürler (Mahmoud et al., 2005). Bu görevi, enzimin substratını bağlayan çok küçük bir bölge yerine getirir. Bu bölgeye katalitik bölge denilmektedir. Enzimlerin katalitik etkileri, enzimi oluşturan aminoasitlerin sayısı ve diziliş sırasına, hidrojen bağları, elektrostatik çekim kuvveti, hidrofobik bağlar ve disülfit bağları tarafından oluşturulan üç boyutlu yapısına ve katalitik bölge olarak adlandırılan bölgedeki fonksiyonel grupların özelliklerine bağlıdır (Bulut, 2007).

Bazı enzimler bütünüyle proteinden oluştuğu halde enzimlerin bazıları, apoenzim olarak adlandırılan bir protein kısmı ve kofaktör ya da koenzim olarak adlandırılan protein olmayan bir kısımdan meydana gelir. Enzimin protein olmayan kısmı demir, çinko, magnezyum ya da kalsiyum gibi metal iyonlarından oluşuyor ise kofaktör; nikotinamid adenin dinükleotit ( $NAD^+$ ) ya da nikotinamid adenin dinükleotit fosfat ( $NADP^+$ ) gibi organik moleküllerden oluşuyor ise koenzim adını alır.

Apoenzimleri oluşturan aminoasit türleri ve bu aminoasitlerin dizilişleri her enzimde farklılık göstermektedir. Enzimin özelliğini ve özgülüğünü belirleyen kısım apoenzimdir. Tek başlarına aktivite gösteremeyen apoenzimler ancak kofaktörü ya da koenzimi ile birlikte iken katalitik aktivite gösterebilirler. Kofaktörü ya da koenzimi ile birleşmiş ve aktif halde bulunan enzimlere holoenzim denir. Bir holoenzimin kısımları Şekil 2.1' de verilmiştir.



**Şekil 2.1.** Holoenzimin kısımları (Tortora, 2010)

## 2.2 Enzimlerin Adlandırılması, Sınıflandırılması ve Biyoinformatik

Enzimlerin tanımlanmasından itibaren aynı enzimlere farklı isimler ya da farklı enzimlere aynı isimler verilmesi ve verilen bu isimlerin enzimin katalizlediği reaksiyon hakkında bilgi vermemesi gibi sorunlar ile karşılaşmıştır. Bu sorunlar karşısında Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu (EC-IUB) enzimleri tanımlamak için bir numara sistemi ve düzenli adlandırma geliştirmiştir. Bu numara ve adlandırma sistemi enzimleri katalizledikleri reaksiyonlara göre sınıflandırmıştır (Boyce and Tipton, 2005). Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu (EC-IUB)' nun oluşturduğu sisteme göre bütün enzimlerin dört rakamdan oluşan ve enzimi katalizlediği reaksiyona göre tanımlayan EC numaraları vardır. Bu kodlama sisteminde ilk numara enzimin sınıfını, ikinci numara enzimin etki ettiği kimyasal yapıyı ve fonksiyonel grubu, üçüncü numara alt sınıfını ve dördüncü numara enzimin seri numarasını belirtmektedir. Aynı reaksiyonu katalizleyen fakat kaynakları (mikroorganizma, haysansal, bitkisel) farklı olan enzimler aynı EC numarasını ve aynı adı alırlar. Bu sisteme göre enzimler genellikle önce substratlarının ismi, sonra katalizledikleri reaksiyon tipi yazılarak isimlendirilirler ve isimlerinin sonuna –az son eki alırlar. Birden fazla enzimin görev aldığı reaksiyonlarda ise enzimler –az sistemi şeklinde adlandırılırlar.

Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu tarafından katalizledikleri reaksiyon tipi göre oluşturulan sınıflandırma Çizelge 2.1' de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Enzimlerin uluslararası sınıflandırması (Bulut, 2007)

<b>1. Oksidoreduktazlar</b>	<b>Redoks reaksiyonlarını katalizlerler</b>
1.1	CH-OH grubuna etki edenler
1.2	C-O grubuna etki edenler
1.3	C-CH grubuna etki edenler
1.4	CH-NH <sub>2</sub> grubuna etki edenler
1.5	CH-NH grubuna etki edenler
<b>2. Transferazlar</b>	<b>Fonksiyonel grupların transferinden görev alırlar</b>
2.1	Cl <sup>-</sup> gruplarını transfer edenler.
2.2	Karbonil gruplarını transfer edenler.
2.3	Açıl gruplarını transfer edenler.
2.4	Glikozil- gruplarını transfer edenler.
2.5	N- içeren grupları transfer edenler.
2.6	Fosfat gruplarını transfer edenler.
<b>3. Hidrolazlar</b>	<b>Hidroliz reaksiyonlarını katalizlerler</b>
3.1	Esteri hidrolizleyenler.
3.2	Glikozid bağlarını hidrolizleyenler.
3.4	Peptid bağlarını hidrolizleyenler.
3.5	Diğer C-N bağlarını hidrolizleyenler.

3.6	Asit anhidritlerini hidrolizleyenler.
<b>4. Liyazlar</b>	<b>Çift bağa katılma ve çift bağ oluşturan reaksiyonları katalizleyenler</b>
4.1	C - C Liyazlar
4.2	C - O Liyazlar
4.3	C - N Liyazlar
4.4	C - S Liyazlar
4.5	C- Halid Liyazlar
<b>5. İzomerazlar</b>	<b>İzomerleşme reaksiyonlarını katalizlerler</b>
5.1	Rasamerazlar ve epimerazlar
5.2	<i>cis-trans</i> izomerazlar
5.3	İntramoleküler oksidoreduktazlar
5.4	İntramoleküler transferazlar
5.5	İntramoleküler liyazlar
<b>6. Ligazlar</b>	<b>Sentez reaksiyonlarını katalizlerler</b>
6.1	C - O bağını oluşturanlar
6.2	C - S bağını oluşturanlar
6.3	C - N bağını oluşturanlar
6.4	C - C bağını oluşturanlar
6.5	Fosforik ester bağlarını oluşturanlar



### 2.2.1 Oksidoredüktazlar

Bu sınıftaki enzimler oksidasyon reaksiyonlarının katalizini gerçekleştirirler. Ancak bir molekülün oksidasyonu bir başka molekülün redüksiyonu ile birlikte gerçekleştiği için bu enzimler oksidoredüktazlar olarak isimlendirilmektedir.

### 2.2.2 Transferazlar

Bu sınıftaki enzimler bir substrattan (donör) diğerine (akseptör) bir fonksiyonel grubu transfer eder. Sistematik isimlendirilmeleri *donör:akseptör transfer edilen grup-transferaz* şeklindedir. Fosfotransferazlar (kinazlar), formil-transferazlar (transaminazlar) ve CoA-transferazlar bu sınıftaki enzimlere örnek verilebilirler.

### 2.2.3 Hidrolazlar

Ester, glikozid, peptid, C-N, C-C veya P-N gibi bağların hidrolitik parçalanmasını katalizlerler. Bu sınıftaki enzimlere örnek olarak lipazlar, fosfatazlar, amilazlar, glikozidazlar, nükleosidazlar, proteazlar ve amidazlar verilebilir.

### 2.2.4 Liyazlar

Hidrolitik olmayan yoldan çift bağ oluşumunu ve çift bağa katılma reaksiyonlarını katalizlerler. Dönüştürdükleri substrattan ya kimyasal bir grubu ayırır yada ilave ederler. Dekarboksilazlar, aldolazlar, dehidratazlar ve karboksilazlar bu sınıfa örnek verilebilecek enzimlerdir.

### 2.2.5 İzomerazlar

Bu sınıftaki enzimler bir molekülün düzenlenmesinde görevlidirler. Molekülün geometrik ya da yapısal değişimini katalizlerler.

### 2.2.6 Ligazlar

İki molekül arasında ATP' nin parçalanmasından açığa çıkan enerjiyi kullanarak bağ oluşturan enzimlerdir. Karbon ile C,N,O ve S arasında bağ oluşumunu katalizlerler.

Enzimlerin keşfinden itibaren katalitik özellik gösteren bu biyomoleküller üzerine sayısız çalışmalar yapılmış ve gelişen teknolojinin bir sonucu olarak araştırma ve uygulamalar ile büyük miktarda veri birikimi oluşmuştur. Biyolojik problemlerin çözümünde bilişim teknolojilerini kullanarak biyolojik olayların moleküler düzeyde açıklanmasına yardımcı olan biyoinformatik sayesinde biyolojik verilerin saklanması için veri tabanları oluşturulmaktadır. Enzimlerin isimleri, EC numaraları ve katalizledikleri reaksiyon tipi gibi temel bilgilere EC-IUB veri tabanından ulaşılabilir. Ancak artık günümüzde enzimlerin biyokimyasal ve yapısal analizleri üzerine çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin depolandığı elektronik veri tabanları bulunmaktadır. Proteinlerin X-Işını kristallografisi ve NMR spektroskopisi gibi analizler ile elde edilen yapısal özellikleri PROTEİN DATA BANK ve ENZYME STRUCTURES DATABASE gibi veri tabanlarından elde edilebilmektedir. Enzimlerin yapısal, fonksiyonel, kinetik ve medikal özellikleri gibi daha kapsamlı bilgilere BRENDA veri tabanından ulaşılabilir.

### 2.3 Enzim Kaynakları

Bütün enzimler genetik kontrol altında biyolojik sistemler tarafından üretilmektedir. Mikroorganizmalardan hayvanlar alemine, algler ve mantarlardan yüksek yapılı bitkilere kadar bütün canlılar büyük bir çeşitlilikte enzim üretimi gerçekleştirmektedir (Sengupta and Dasgupta, 2006). Endüstriyel ölçekli enzim üretiminde önemli olan ilk şey istenilen enzimin kaynağının belirlenmesidir. Üretimi gerçekleştirilmek istenen enzim değişik kaynaklardan elde edilebilir. Bu kaynaklar arasında seçim yapılırken enzimin kullanılacağı alana uygunluğu büyük önem taşımaktadır. Örneğin peynir yapımında kullanılan rennet süttten kesilmemiş buzağuların midesinden elde edilmektedir çünkü mikrobiyal kökenli rennet daha ekonomik olmasına rağmen, peynir tadında bozulmaya neden olmaktadır (Kaul).

Hayvansal kaynaklı enzimler domuz midesi, pankreas ve geviş getirenlerin midesi, karaciğeri gibi genellikle hayvanların atılan organlarından elde edilir. Hayvansal kaynaklı enzimlere domuz pankreasından elde edilen tripsin ve kimotripsin, domuzların mide mukozasında bulunan, proteolitik bir enzim olan pepsin, at karaciğerinden üretilen alkoldehidrogenaz ve sığır karaciğerinden elde edilen katalaz örnek olarak verilebilir (Kaul; Bulut, 2007)

Bitki dokularından ve özsularından izole edilen birçok enzim de endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle papatya, incir ve ananas gibi bitkilerin özsuları kolaylıkla alınabildiği için bu bitkiler sistein proteaz üretimi için sıklıkla kullanılan önemli kaynaklardır.  $\beta$ -amilaz, proteaz, sitaz, hemiselülaz, fosfataz ve nükleaz gibi enzimlerin kolaylıkla izole edilebildiği malt, bitki kökenli enzimler için örnek verilebilecek bir diğer önemli kaynaktır (Kaul; Bulut, 2007). Endüstride kullanılan bazı hayvansal ve bitkisel kaynaklı enzimler ile elde edildikleri kaynaklar Çizelge 2.2' de verilmiştir.

Endüstride kullanılan birçok enzim, mikrobiyal kaynaklıdır. Çünkü mikrobiyal enzimler geliştirilen fermentasyon teknikleri ile diğer kaynaklara göre daha kısa zamanda, büyük miktarlarda ve daha ekonomik üretilebilmektedir. Ayrıca mikrobiyal enzimlerin katalitik aktivitelerinin bitkisel ve hayvansal enzimlerden daha yüksek

olduğu bilinmektedir. Gelişen teknoloji ile birlikte suda çözünmeyen matrikslere bağlanarak immobilizasyonunun sağlanması ile enzimlerin tekrar kullanılabilirliğinin sağlanması mikrobiyal enzimlerin endüstride kullanımını büyük ölçüde arttırmıştır. Son yıllarda biyoteknolojik uygulamalar ile hayvansal ve bitkisel kökenli birçok enzim mikroorganizmalara ürettirilmektedir (Kaul).

Bu güne kadar çok sayıda enzim tanımlanmış olup, bunların büyük bir kısmı ticari kullanıma uygun bulunmasına rağmen günümüzde çok az bir kısmı endüstriyel amaçla kullanılmaktadır. Mikrobiyal enzimlerin kaynakları, doğal ortamlardan izole edilen organizmalardır. Bu organizmalar aynı zamanda birden farklı enzim üretme yeteneğine sahip olabildikleri gibi, belirli bir mikroorganizma tarafından üretilen enzim miktarını indüksiyon ile arttırmak da mümkündür (Zeman and McCrea, 1985; Kıran vd., 2006).

Mikrobiyal enzimler arasında en yaygın kullanılanları proteaz, lipaz,  $\alpha$ -amilaz, glikoamilaz, glikoizomeraz gibi enzimlerdir. Endüstriyel uygulaması olan ticari enzimlerin en önemli ve en büyük sınıfını dünya enzim pazarındaki yaklaşık %60' lık pazar payı ile proteolitik enzimler oluşturmaktadırlar. Dünya enzim pazarında %28' lik payı karbohidratazlar, %3' lük payı lipazlar ve %9 'lük payı ise diğer enzimler oluşturmaktadır (Wiseman, 1987).

**Çizelge 2.2.** Enzimler ve elde edildikleri kaynaklar (Bulut, 2007)

Enzim	Temin Edilen Kaynak
<b>Hayvansal Enzimler</b>	
$\alpha$ -amilaz	Sığır ve domuz pankreası
Trypsin	Sığır ve domuz pankreası
Kimotripsin	Sığır ve domuz pankreası
Pepsin	Domuz midesi
Rennet	Danaların abomosumu
Esteraz	Pankreatik bezler
Lipaz	Sığır ve domuz pankreası
Glukozoksidaz	Karaciğer
Katalaz	Karaciğer

<b>Bitkisel Enzimler</b>	
$\alpha$ -amilaz	malt
$\beta$ -amilaz	Arpa, buğday, pirinç, tatlı patates, soya fasulyesi
R-Enzim	Fasulye, patates
Endo-b-Glukonaz	malt
Papain	<i>Carica papaya</i> lateksi
Bromealin	Ananas bitkisi tohumları
Fisin	<i>Ficus carica</i> lateksi
Lipoksigenaz	Fasulye ve patates

## 2.4 Enzim Aktiflik Birimleri

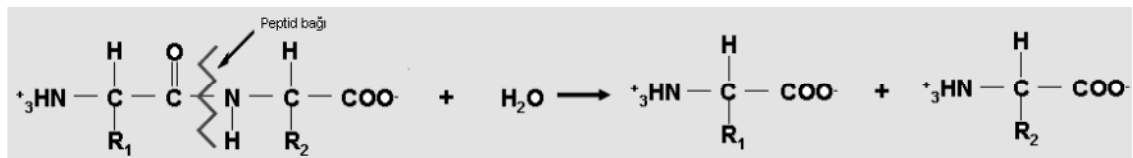
Enzimler biyolojik ortamlarda çok düşük miktarlarda buldukları için miktarlarından çok, aktivitelerinin belirlenmesi tercih edilir. Enzimlerin aktivite ölçümleri ile etkinlikleri, lokalizasyonları, kataliz mekanizmaları ve saflıkları belirlenebilir. Enzimlerin yapısal ve fizikokimyasal farklılıkları nedeniyle her enzim için aktivite tayin yöntemleri farklılık göstermektedir. Bir yöntemin uygunluğu enzimin yapısal ve fizikokimyasal özellikleri dışında, saflığına, katalizlediği reaksiyon tipine ve enzimin lokalize olduğu yer gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Utkan vd., 2011).

Bir enzimin aktivitesi, enzimin katalizlediği reaksiyonda kullanılan substratın kullanım hızı ya da ürünün oluşum hızı tayin edilerek ölçülür. Enzimlerin aktivitesinin ifadesinde kullanılan birimlerden biri, Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu' nun 1965 yılında kabul ettiği enzim ünitesidir. Enzim ünitesi, optimum şartlarda, bir dakikada 1  $\mu$ mol ürünün oluşumunu veya 1  $\mu$ mol substratın dönüşümünü katalizleyen enzim miktarını ifade etmektedir. Yaygın olarak kullanılan aktivite ifadelerinden bir diğeri spesifik aktivitedir. Bir enzimin spesifik aktivitesi, 1 mg protein başına düşen enzim ünitesinin sayısıdır. Spesifik aktivite, enzim ünitesi/mg protein olarak hesaplanmaktadır. Enzim aktivitesi için Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu tarafından önerilmiş bir diğeri birim kataldır. Optimum şartlarda 1 katal, 1 saniyede 1 mol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır. Enzim aktivitelerini

tanımlamak için nanokatal (1 nanokatal =  $10^{-9}$  katal) ve pikokatal (1 pikokatal =  $10^{-12}$  katal) ifadeleri daha çok kullanılmaktadır (Muhammet, 2008; Utkan vd.,2011).

## 2.5 Proteazlar

Proteinlerin polipeptid yapısı içinde bulunan peptid bağlarının hidrolizinden sorumlu olan proteazlar, hidrolaz sınıfı (EC 3) ve peptidaz alt sınıfı (EC 3.4) enzimleridir. Proteazların hidroliz reaksiyonlarının mekanizması Şekil 2.2' de verilmiştir.



Şekil 2.2. Proteazların hidroliz reaksiyonun mekanizması (Çelik, 2007)

Hücre içi ve hücre dışı olarak üretilen proteazlar, protein katabolizması, kan pıhtılaşması, hücre büyümesi ve göçü, doku düzenlemesi, tümör büyümesi ve çoğalması, zimojenlerin aktivasyonu, öncü proteinlerden aktif peptidin ve hormonların salınımı, membrana salgı proteinlerinin taşınması, iltihaplanma gibi çok çeşitli fizyolojik fonksiyonları yerine getirmektedir. Hücre içi proteazlar, metabolizmanın düzenlenmesinde kritik bir rol oynarken, hücre dışı proteazlar hücrenin bulunduğu ortamdaki protein gibi büyük polipeptitleri hidroliz tepkimesi ile parçalayarak hücre içine taşınabilecek küçük moleküllü ürünlere dönüştürür (Bulut, 2007). İnsan ve fare genomunun biyoistatistiksel analizleri sonucunda yaklaşık 500-600 proteaz tanımlanmıştır (Turk, 2006)

Proteazlar ile ilgili yapılan çalışmalar Spallanzani' nin 1793 yılında mide sıvısının protein parçalama özelliğini saptaması ile başlamıştır. 1836 yılında bu enzimi

pepsin olarak adlandırılan Schwann aynı zamanda bu enzimi yüksek oranda saflaştırmıştır (Aunstrup and Andresen, 1972; Liese et al., 2000). Aynı yıllarda pankreastan izole edilen enzime tripsin, bağırsak mukozasından izole edilen enzime ise erepsin adı verilmiştir. 1930' larda proteinlerin peptid bağlarının enzimler tarafından parçalandığı Bergman ve arkadaşları tarafından saptanmıştır (Ishihara, 1960). 1940' lı yıllarda pepsin, tripsin, kimotripsin ve papain gibi hayvansal ve bitkisel kaynaklı enzimler ile saflaştırma çalışmaları yapılmıştır.

### 2.5.1 Proteazların Sınıflandırılması

Hidrolazlar sınıfında yer alan proteazları aktif ve katalitik bölgelerindeki yapısal çeşitliliklerinden dolayı geleneksel enzim sınıflandırma sistemi ile sınıflandırmada bazı güçlükler ile karşılaşmaktadır. Hidrolazlar sınıfının geniş bir grubunu oluşturan proteazları elde edildikleri kaynaklara, aktif bölgedeki fonksiyonel gruplarına ve katalitik bölgedeki işlevlerine göre 3 ana kriter ele alınarak sınıflandırmak mümkündür. (Çizelge 2.3)

**Çizelge 2.3.** Proteazların sınıflandırılması (Rao, 1998)

#### 1. Kaynağına göre proteazlar

- 1.1. Bitkisel proteazlar
- 1.2. Hayvansal proteazlar
- 1.3. Mikrobiyal proteazlar

#### 2. Aktif Bölgedeki fonksiyonel gruplarına göre proteazlar

- 2.1. Serin proteazlar
- 2.2. Sistein proteazlar
- 2.3. Aspartat proteazlar

#### 2.4. Metalo proteazlar

### 3. Katalitik bölgedeki işlevlerine göre proteazlar

#### 3.1. Ekzopeptidazlar

##### 3.1.1. Aminopeptidazlar

##### 3.1.2. Karboksi peptidazlar

###### 3.1.2.1 Serin tipi

###### 3.1.2.2. Sistein tipi

###### 3.1.2.3. Metalo tipi

#### 3.2. Endopeptidazlar

##### 3.2.1 Serin proteazlar

##### 3.2.2 Sistein proteazlar

##### 3.2.3 Aspartat proteazlar

##### 3.2.4 Metalo proteazlar

##### 3.2.5 Treonin proteazlar

Proteazlar Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu tarafından katalitik bölgedeki işlevlerine göre endopeptidaz ve ekzopeptidaz olmak üzere 2 büyük gruba ayrılmıştır.

Ekzopeptidazlar, sadece substratın amino ya da karboksi uçlarına yakın peptid bağlarının hidrolizinde görevlidir. Polipeptid zincirinin N terminalini hidroliz eden amino peptidazlar polipeptidden tek bir amino rezidüsünü, dipeptidi ya da tripeptidi uzaklaştırır. N-terminaldeki metionini uzaklaştırdığı bilinen amino peptidazlar mikrobiyal türlerin geniş bir çeşidinde bulunur. Mikrobiyal kaynaklar tarafından genellikle hücre içi enzimler olarak üretilen amino peptidazlar *A. oryzae* tarafından hücre dışı bir enzim olarak üretilir (McDonald, 1985; Çelik, 2007)



Polipeptid zincirinin C terminalinde işlevsel olan karboksi peptidazlar, zincirden tek bir aminoasit ya da dipeptidi ayırırlar. Karboksi peptidazlar aktif bölgelerindeki aminoasitlerin çeşidine göre 3 gruba ayrılırlar. Serin karboksipeptidazlar aktif bölgelerinde serin kalıntıları içerirler ve asidik pH değerlerinde aktiftirler (Feng and Xue, 2005). Bir çok organizmada bulunan serin karboksipeptidazların genellikle substrat spesifiteleri aynı olmakla birlikte enzimin optimum pH, stabilite, moleküler ağırlıkları ve inhibitörlerin etkisi gibi özellikleri farklılık göstermektedir. Bu durum zimojenlerin aktif enzimlere dönüştürülme mekanizmalarının mantarlar, bitkiler ve hayvanlarda farklı olmasından kaynaklanmaktadır (Breddam, 1986). Metallo karboksi peptidazlar aktiviteleri için metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Memelilerdeki metallo karboksi peptidazlar aktiviteleri için  $Zn^{+2}$  ya ihtiyaç duyarken, *Saccharomyces spp.* ve *Pseudomonas spp.*' den izole edilen metallo karboksi peptidazlar aktiviteleri için  $Zn^{+2}$  ya da  $Co^{+2}$  gibi iyonlara ihtiyaç duyarlar (Reznik and Fricker, 2001; Çelik, 2007). Sistein karboksi peptidazlar, aktif bölgelerinde sistein kalıntıları içerirler.

Endopeptidazlar polipeptid zincirinin C ve N- terminal uçları dışındaki iç bağlarının hidrolizinde görevlidirler. Katalitik etki mekanizmaları dikkate alındığında endopeptidazlar genellikle, serin, sistein, metallo ve aspartat endopeptidazlar olmak üzere 4 gruba ayrılırlar da, 2004 yılında kendilerine kimya alanında Nobel ödülü kazandıran çalışmalarıyla Avram Hershko, Aaron Ciechanover ve Irwin Rose treonin proteazları tanımlamışlardır (Ekici vd., 2008).

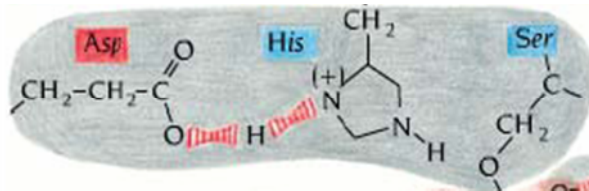
Serin endopeptidazlar aktif merkezlerinde serin, sistein endopeptidazlar ise aktif merkezlerinde sistein kalıntısı içerirler. Aspartat endopeptidazlar katalitik aktiviteleri için genellikle iki aspartik asit kalıntısına ihtiyaç duyarlarken metallo endopeptidazlar katalitik mekanizmalarında yaygın olarak çinko veya diğer metal iyonlarını kullanırlar (Özdemir, 2003). Treonin endopeptidazlar ise katalitik bölgelerinde treonin kalıntısı bulundurulur (Ekici vd. 2008). Bir kısım endopeptidaz ise henüz katalitik aktivite mekanizması tanımlanamadığı için yukarıda belirtilen grupların dışında EC 3.4.99 alt sınıfında listelenmiştir. Bu alt sınıfa aktivite gösterebilmek için ATP'ye ihtiyaç duyan ATP-endopeptidazlar örnek gösterilebilir (Rao et al., 1998).

## 2.5.2 Katalitik Mekanizmalarına Göre Proteazlar

Proteazlar katalitik mekanizmalarına göre genellikle serin, sistein, metallo ve aspartat proteazlar olmak üzere 4 grupta incelenirler. 2004 yılında Avram Hershko, Aaron Ciechanover ve Irwin Rose' un ubiquitin-proteozom kompleksinde treonin proteazı tanımlamaları ile katalitik mekanizmalarına göre sınıflandırılan proteazlara yeni bir grup eklenmiştir (Ekici vd., 2008).

Proteazların yaklaşık 1/3' ünü oluşturan serin proteazlar (EC 3.4.21), katalitik bölgelerinde katalizden sorumlu Ser<sup>195</sup>/His<sup>57</sup>/Asp<sup>102</sup> aminoasitlerini taşırlar (Şekil 3.2). Bu katalitik triadda histidin, serin ve aspartata hidrojen bağı ile bağlıdır. Serin nükleofil, histidin ise genel bir baz gibi davranır. Negatif yüklü aspartat ise histidin kalıntısında oluşan pozitif yükü nötralize eder (Ekici vd., 2008). Serin proteazlar virüsler, bakteriler ve ökaryotlarda bulunan, hayati önem teşkil eden enzimlerdir (Rao et al., 1998).

Serin proteazlar hem endopeptidaz hem de ekzopeptidaz özellik gösterirler. Yapısal benzerliklerine göre 20 aile içinde gruplandırılan serin proteazların, en iyi bilinen grupları kimotripsin, tripsin ve elastaz gibi enzimleri içeren kimotripsin tip (SA) ve subtilisin gibi bakteriyel enzimleri içeren subtilisin tip serin proteazlar (SB)' dir (Rao et al., 1998; Çelik 2007). Kimotripsin tip proteazlar omurgalıları da kapsayan yüksek yapıli canlılarda ve prokaryotlarda bulunurken, subtilisinler sadece basillerde bulunmaktadır (Kraut, 1977). Bu iki grup dışında Karboksipeptidaz C (SC) ve *Escherichia* d-Ala-d-Ala peptidaz A (SE) grupları bulunmaktadır. Bu gruplardaki enzimlerin katalitik mekanizmaları ve aktif bölgedeki yapıları aynı olmasına rağmen moleküler yapıları farklılık göstermektedir (Rao et al., 1998)



**Şekil 2.3.** Serin proteazın katalik bölgesindeki katalitik triad (Çelik, 2007)

Ser<sup>195</sup>/His<sup>57</sup>/Asp<sup>102</sup> serin proteazlara ek olarak katalitik bölgesinde farklı aminoasit kalıntıları içeren serin proteazlar da bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak Ser/His/Glu, Ser/His/His ya da Ser/Glu/Asp katalitik triadlarını içeren serin proteazlar; Ser/Lys ya da Ser/His gibi katalitik diadları içeren serin proteazlar ve sadece Ser katalitik kalıntısını içeren serin proteazlar verilebilir (Ekici vd., 2008).

Genellikle nötral ve alkalin pH değerlerinde aktif olan serin proteazlar, pH 7-11 arasında optimum aktivite gösterirler. İzoelektrik noktaları genellikle pH 4-6 arasındadır. Birkaç istisna dışında molekül ağırlıkları genellikle 18-35 kDa arasındadır. *Blakeslea trispora*' dan izole edilen serin proteazın moleküler ağırlığının 126 kDa olduğu rapor edilmiştir (Rao et al., 1998).

Serin proteazların en tipik inhibitörü fenilmetilsülfonilflorür (PMSF) olmakla birlikte, di-izopropilflorofosfat (DFP), tosil-L-lizin klorometil keton (TLCK), 3,4-dikloroizokumarin (3,4-DCI) gibi inhibitörler tarafından da inhibisyona uğratılırlar (Hedstrom, 2002). Aktif bölgenin yakınlarında sistein kalıntıları içeren serin proteazlar p-kloromerküribenzoat (PCMB) gibi tiyol ayıraçları tarafından da inhibe edilirler (Rao et al., 1998).

Serin proteazların 2 büyük alt sınıfını alkalin serin proteazlar ve subtilisinler oluştururlar. Alkalin serin proteazlar, peptid bağıni tirozin, fenilalanin ya da lösin karboksil ucundan hidrolizler. Yüksek pH değerlerinde aktif olan alkalin serin proteazlar bakteri, maya, küf ve mantarlardan üretilirler ve izoelektrik noktaları pH 9 civarındadır. Moleküler ağırlıkları 15-30 kDa aralığındadır. Bu enzimler DFP ya da bir patates proteaz inhibitörü tarafından inhibe olurlar, fakat tosil-L-fenilalanin klorometil keton (TPCK) ya da TLCK tarafından inhibe olmazlar. *Arthrobacter*, *Streptomyces* ve *Flavobacterium spp.* gibi bazı bakteriler tarafından üretilebilirler. Ayrıca *S. cerevisiae* ve filamentöz bir fungus olan *Conidiobolus spp.* tarafından üretildiği de rapor edilmiştir (Rao et al., 1998).

Subtilisinler ise *Bacillus* orijinli alkalen proteazlardır. Subtilisin Carlsberg ve Subtilisin Novo olmak üzere 2 tipi tanımlanmıştır. Subtilisin Carlsberg *Bacillus licheniformis*, Subtilisin Novo ise *Bacillus amyloliquefaciens* tarafından üretilen ticari enzimlerdir. İki enzimin moleküler ağırlığı (27.5 kDa), optimum sıcaklıkları (60° C) ve optimum pH değerleri (pH 10) aynı olmakla birlikte, birbirlerinden 58 aminoasitlik bir farkla ayrılırlar. Ayrıca Subtilisin Carlsberg stabilitesi için  $Ca^{+2}$  ye ihtiyaç duymaz (Rao et al., 1998).

Aspartat proteazlar (EC 3.4.23), katalitik aktiviteleri için aspartik asit kalıntısına ihtiyaç duyan endopeptidazlardır. Aktif bölgeleri Asp/Ser/Gly ya da Asp/Thr/Gly şeklindedir. Genel olarak düşük pH değerlerinde (pH 3-4) maksimum aktivite gösterdikleri için asidik proteazlar olarak da bilinirler. pH 3-4.5 arasında izoelektrik noktasına sahiptirler. Moleküler ağırlıkları 30-45 kDa arasında değişiklik göstermektedir. Aspartil proteazlar pepsin (A1), retropepsin (A2) ve pararetropepsin (A3) olmak üzere 3 aile içinde gruplandırılırlar. Bu gruptaki enzimler pepstatin tarafından inhibe olurlar. Ayrıca bakır iyonları varlığında diazoacetyl-dl-norleucine methyl ester (DAN) ve 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)propane (EPNP)' e karşı hassasiyet gösterirler. Mikrobiyal aspartil proteazlar, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Neurospora* tarafından üretilen pepsin benzeri enzimler ve *Mucor spp.* ve *Endothia* tarafından üretilen renin benzeri enzimler olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar (Rao et al., 1998).

Sülfidril ya da tiyol proteazlar olarak da bilinen sistein proteazlar, prokaryotlar ve ökaryotları da içine alan birçok biyolojik sistem tarafından üretilirler. Sistein proteazlar katalitik aktiviteleri için sistein ve histidin kalıntılarına ihtiyaç duyarlar. Sistein ve histidin kalıntılarının dizilişi (Ser/His ya da His/Ser) sınıflar arasında farklılık gösterir. Yan zincir spesifitesine göre; papain benzeri, tripsin benzeri, glutamik asite spesifik ve diğerleri olmak üzere 4 büyük grupta toplanırlar. Birçoğu papain ailesi içinde sınıflandırılan 20 aileleri tanımlanmıştır. Papain ailesi içindeki enzimlerin görevi protein hidrolizasyonu olmakla birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalarda immünolojik kontrollerde, prohormon aktivasyonunda ve apoptosis çalışmalarında kullanılabilirliği belirlenmiştir. Birkaç istisna dışında genellikle nötral pH değerlerinde aktiftirler.

Lizozomal sistein proteazların asidik pH değerlerinde aktif olduğu bilinmektedir. PCMB gibi sülfidril ajanlarına karşı hassasiyet gösterirler. Metal şelatlayıcı ajanlardan ve DFP tarafından inhibisyona uğramazlar. Clostripain *Clostridium* tarafından üretilen, Streptopain ise *Streptococcus* tarafından üretilen sistein proteazlardır. Bu iki enzimin moleküler ağırlıkları ve izoelektrik noktaları farklılık göstermektedir. Clostripainin izoelektrik noktası pH 4.9 ve moleküler ağırlığı 50 kDa iken, streptopain pH 8.4 ve 32 kDa moleküler ağırlığa sahiptir (Rao et al., 1998; Çelik 2007).

Aminoasit dizilimlerinde ve yapılarında farklılıklar olmakla birlikte metallo proteazlar aktiviteleri için iki değerlikleri metallere ihtiyaç gösterirler. Yaklaşık 30 sınıfı tanımlanmıştır. Bunların on yedi tanesi sadece endopeptidaz, on iki tanesi sadece ekzopeptidaz, biri ise hem endopeptidaz hem de ekzopeptidaz özelliindedir. İşlevsel özelliklerine göre nötral, alkalin ve *Myxobacter I* ve *Myxobacter II* olarak 4 gruba ayrılırlar. Nötral metalloproteazlar sadece hidrofobik amino asitlere spesifisite gösterirlerken, alkalin metalloproteazlar çok geniş bir spesifisite gösterirler. *Myxobacter I* 14 kDa moleküler ağırlığa sahiptir ve *Arthrobacter crystellopoites*' in hücre duvarını lizise uğratabilirken, *Myxobacter II*' in bakterilerin hücre duvarı üzerine lizis yeteneği bulunmamaktadır. Genellikle EDTA gibi şelatlayıcı ajanlar tarafından inhibe olurlar. Ancak sülfidril ajanlarıyla ve DFP ile inhibisyona uğramazlar (Rao et al., 1998).

*B. stearothermophilus* tarafından üretilen termolizin bir nötral metalloproteaz olup, moleküler ağırlığı 34 kDa'dur. Ayrıca 80° C' de 1 saat yarılanma ömrüyle çok kararlı bir proteazdır. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Serratia spp.* tarafından üretilen alkalin metalloproteazlar ise 48-60 kDa moleküler ağırlığa sahiptirler ve pH 7-9 arasında aktifirler (Rao et al., 1998).

*Clostridium hystolyticum* ve *Achromobacter iophagus* tarafından üretilen kollejenaz ve *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen elastaz metalloproteazların diğer önemli enzimlerindedir (Rao et al., 1998).

Metalloproteazlar sınıfında en iyi karakterize edilen enzimlerden biri karboksipeptidaz A sığır pankreası tarafından üretilen 307 amino asitlik bir

ekzopeptidazdır ve kendisine sıkıca bağlanmış formda bulundurduğu çinko iyonu ile karakterize edilir.  $Zn^{+2}$  iyonunun  $Co^{+2}$  ve  $Ni^{+2}$  gibi metal iyonları ile yer değiştirmesi durumunda aktivitenin korunduğu gözlenmiştir. İnsan pankreası C-terminal hidrofobik kalıntıları tercih eden karboksipeptidaz A ve C-terminal bazik kalıntıları tercih eden karboksipeptidaz B olmak üzere bu enzimlerin proenzim formunu sentezler ve salgılar. Pankreatik karboksipeptidaz peptid zincirinde arjinin, lizin ve prolin dışındaki C-terminal kalıntıyı hidrolizler (Öner, 2008).

### 2.5.3 Aktif oldukları pH değerine göre proteazlar

Proteazlar aktivite gösterdikleri optimum pH değerlerine göre asidik, nötral ve alkalin proteazlar olmak üzere 3 gruba ayrılırlar.

Asidik proteazlar pH 2-6 arasında aktivite gösteren, 380-420 aminoasit uzunluğunda enzimlerdir (Rao et al., 1998). Asidik proteazların genellikle fungal kökenli olduğu bilinmektedir (Mukhtar and Haq, 2008). Aspartat proteazlar asidik proteazlar olarak kabul edilirken, bazı metallo ve sistein proteazlar da bu pH aralığında maksimum aktivite göstermektedirler (Gidamo, 2009).

Nötral proteazlar, nötral pH değerlerinde ya da zayıf baz veya zayıf asit değerlerinde aktiftirler. Sistein proteazlar ile metalloproteazların büyük bir kısmı ve bazı serin proteazlar bu gruba dahil edilirler. Nötral proteazlar genellikle bitkisel kaynaklı olmakla birlikte birkaç fungal ve bakteriyel türden de nötral proteazlar elde edilmiştir. (Gidamo, 2009).

Alkalin proteazlar pH 8-13 arasında aktiftirler. Genellikle *Bacillus* ve *Streptomyces* gibi alkafilik mikroorganizmalardan elde edilirler. Alkalin proteazlar genellikle serin proteazlar sınıfını kapsamaktadırlar. Ancak bazı metallo proteazların da alkalin pH değerlerinde aktivite gösterdiği bilinmektedir. Alkalin proteazların moleküler ağırlıkları 15-30 kDa arasında değişiklik göstermektedir. Ancak 45 kDa gibi yüksek moleküler ağırlığa ve 8 kDa gibi düşük moleküler ağırlığa sahip alkalin proteazlar da rapor edilmiştir. Alkalin proteazların  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  gibi iki

değerlikli metallerin varlığında aktivitelerinde artış gözlendiği ve termalstabilitelelerinde artış gözlendiği bilinmektedir. Alkalen proteazlar genellikle serin proteazların tipik inhibitörü olan PMSF ile inhibe olurlar. Bazı alkalen proteazlar ise metaloproteaz yapısında oldukları için EDTA gibi şelatlayıcı ajanlarla inhibe olurlar (Rao et al., 1998; Gidamo, 2009).

#### **2.5.4 Proteaz kaynakları**

Proteazlar protein katabolizması, kan koagülasyonu, hücre büyümesi ve göçü, doku düzenlenmesi, inflamasyon, tümör büyümesi ve metastaz, zimojenlerin aktivasyonu, hormonların salınımı ve proteinlerin hücre zarından geçişi gibi birçok fizyolojik role sahip olmalarından dolayı bütün biyolojik sistemlerde bulunmaktadır. Genel olarak ekstraselüler proteazlar büyük proteinlerin küçük moleküllere hidrolizini katalizlerken, intraselüler proteazlar metabolizmanın düzenlenmesinde kritik bir role sahiptirler. Proteazlar, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar olmak üzere 3 temel kaynaktan elde edilebilirler. Endüstriyel amaçlı kullanılan diğer bütün enzimlerde olduğu gibi proteaz üretiminde de üretim koşullarının daha ekonomik olması ve daha fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi nedenlerden dolayı mikrobiyal kaynaklar tercih edilmektedir.

##### **2.5.4.1 Bitkisel kaynaklar**

Bütün biyolojik sistemlerde olduğu gibi bitkiler de fonksiyonel olmayan proteinlerin amino asitlere hidrolizinde proteazları kullanmaktadır. Bitkiler 15 aileye ait 140 sistein proteaz sentezi gerçekleştirirler. Sistein proteazların bitkilerde programlanmış hücre ölümü, çiçeklenme zamanı, polen ve embriyo gelişimi üzerine etkileri bulunmaktadır. 200' den fazla çeşidi ile bitkilerde en çok sentezlenen proteaz ise serin proteazlardır. Bitkisel kaynaklı serin proteazlar 14 aileye ayrılırlar. Embriyoda kutikula oluşumu ve sekonder metabolitlerin oluşumu gibi önemli işlevleri bulunmaktadır. Plastid farklılaşması, nodülasyon, oksine karşı duyarlılık ve mayoz gibi işlevleri bulunan metaloproteazların bitkilerde yaklaşık 20 çeşidi bulunur. Bitkilerde

sadece 3 ailesi bulunmasına rağmen aspartil proteazlar bitkilerde en fazla bulunan ikinci proteaz sınıfıdır (Van der Horn, 2008).

Günümüzde bitkilerden elde edilen tüm endüstriyel enzimler aktif merkezlerinde sülfidril grubu içerirler ve tüm bitkisel kaynaklı proteazlar sistein proteaz sınıfına dahildirler. Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanılmasını yetiştirdiği iklim koşulları ve yetiştirdiği toprağın özellikleri gibi faktörler etkilemektedir. Özellikle tropikal bitkilerden elde edilen proteazların eldesinde yaygın olarak kullanılan bitkiler *Carica papaya* (papaya), *Anana sativa* (ananas), *F. carica*, *F. glabrata*, *Cynera cardunculus* (enginar) ve *Soya hispida* (soya fasulyesi)' dir (Ward, 1985).

Endüstriyel proteazlar arasında en fazla üretimi gerçekleştirilen batı ve orta Afrika ile Hindistan' da yetişen *Carica papaya* tarafından üretilen papain adı verilen enzimdir. Enzimin aktivitesinin elde edildiği bitki kaynağına, bitkinin yetiştirdiği iklim koşullarına ve ekstrasyon ve saflaştırma yöntemlerine göre değişiklik gösterdiği bilinmektedir (Rao et al., 1998). Ham papainde %10 kadar lateks proteini, %45 civarında kimopapain A ve B endoglukanaz, karboksipeptidaz, lizozim, amilaz ve az miktarda da lipaz enzimleri bulunmaktadır (Uhlig, 1998). Enzim pH 5-9 arasında aktivite göstermektedir ve 80-90 ° C' ye kadar stabilitesini korumaktadır (Rao et al., 1998). Yılda 500 ton ham papain enzimi üretilmekte ve 15 milyon dolarlık değer sağlanmaktadır (Uhlig, 1998).

Bromelain ise ananas ağacının gövdesinden ve öz suyundan elde edilen bir proteazdır. Enzim pH 5-9 arasında aktiftir ve 70° C' de inaktive olur (Rao et al., 1998). İlk defa 1892' de Chittenden adlı bir araştırmacı tarafından ananas öz suyunda tanımlanmıştır. Bromelain terapotik destek olarak 1957' de tanıtılmış ve o zamandan beri bilimsel literatürde yerini almış 600'den fazla araştırma makalesiyle birçok hastalığa önemli faydaları olduğu kanıtlanmıştır (Sevinç, 2010). Great Food Biochem. (Bangkok, Thailand) enzimin en büyük üretici firmasıdır (Rao et al., 1998).



#### **2.5.4.2. Hayvansal kaynaklar**

Günümüzde en çok bilinen hayvansal kaynaklı proteazlar; pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve renindir. Hayvansal proteazlar, gıda sanayisinde, protein hidrolizatları üretiminde, et ve balık atıklarının gideriminde, deri endüstrisinde ve tıpta kullanılmaktadır (Öner, 2008).

Peptid zincirini lisin ve arjinin kalıntılarından sonraki karboksil ucunu hidrolize uğratan tripsin, önemli bir sindirim enzimidir. Tripsin neden olduğu acımsı tat nedeni ile gıda endüstrisi için uygun değildir. Bakteriyel kültür ortamlarının hazırlanmasında ve bazı medikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Rao et al., 1998).

Kimotripsin pankreastan elde edilen pahalı bir enzimdir ve sadece tanısal çalışmalarda kullanılmaktadır. Peptid bağı karboksil ucundan fenilalanin, triptofan ve tirozin kalıntılarının birinden hidroliz eder (Rao et al., 1998).

Pepsin 1836'da Theodor Schwann tarafından keşfedilen ilk hayvansal enzimdir. Bütün omurgalıların midesinde bulunur. Pepsin bir aspartik proteazdır ve pH 1-2 arasında optimum aktivite göstermektedir. pH 6'nın üzerinde inaktive olur ve iki hidrofobik aminoasit arasındaki peptid bağlarının hidrolizini katalizler (Rao et al., 1998).

Renin, anne sütünü sindirmek için her memelinin midesinde üretilen doğal, kompleks bir enzimdir ve sütü pıhtılaştırır. Hayvansal kökenli renin için en yaygın kaynak yeni doğan sütle beslenmiş buzağının kesilen şirdenidir (Rao et al., 1998). Renin, pepsine benzer bir proteazdır ve bütün süt veren memelilerin midelerinde inaktif pro-renin olarak bulunur. Pepsin işleviyle ya da kendi kendine katalizle aktif renine dönüşür. Süt endüstrisinde süt kazeininin çöktürülmesinde ve lor üretiminde kullanılmaktadır (Öner, 2008).

#### **2.5.4.3. Mikrobiyal kaynaklar**

Günümüzde en çok tercih edilen proteaz kaynağı, bakteri, fungus ve virüs kökenli olan mikrobiyal proteazlardır. Bitki ve hayvan proteazlarının dünyadaki

ihtiyacı karşılayamamalarından dolayı ve üretim ve izolasyon aşamalarında yaşanan zorluklardan dolayı son yıllarda mikrobiyal proteazlara olan ilgide bir artış olmuştur. Mikroorganizmalar sahip oldukları geniş biyokimyasal çeşitlilik nedeniyle ve çevresel ve genetik düzenlemelerle enzim üretimi arttırılabileceği, enzim özellikleri değiştirilebileceği için mükemmel enzim kaynaklarıdır (Rao et al., 1998; Mathew, 1999). Mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin çok geniş bir çeşitlilik göstermesi de (asidik, nötral, alkalin) endüstriyel uygulamalarda mikrobiyal enzimlerin tercih edilme nedenlerindedir (Mathew, 1999). Mikrobiyal proteazlar dünya genelinde enzim satışının % 40' ını karşılarlar (Rao et al., 1998).

Bakteriler, funguslar, mayalar ve aktinomisetlerden elde edilebilen proteazlar mikroorganizmanın türüne ve hatta suşuna bağlı olarak çeşitlilik gösterir veya aynı suş tarafından kültür koşullarına bağlı olarak çeşitli proteazlar da üretilebilir.

Endüstriyel amaçlı enzim üretiminde bakterilerden nötral ve alkalin proteazlar üretilmektedir. Bakteriyel nötral proteazlar pH 5-8 değerlerinde aktiftirler ve düşük sıcaklık toleransına sahiptirler. Bazı nötral proteazlar metaloproteaz özellik gösterirken, bazıları serin proteaz özelliğindedir. Bakteriyel alkalin proteazlar, yüksek pH değerlerinde aktif olmaları ve geniş substrat spesifiteleri ile karakterizedirler. Optimum sıcaklıkları 60°C civarındadır (Rao et al., 1998). Bakteriyel üretimde genellikle *Bacillus* cinsine ait mikroorganizmalar tercih edilmekle birlikte *Alcaligenes faecalis* (Thangam and Ranjkumar, 2002), *Proteus vulgaris* (Brady et al., 1994), *Pseudomonas aeruginosa* (Bayoudh et al., 2000), *Pseudomonas fluorescens* (Kalaiarasi and Sunitha, 2009)' den de proteaz üretimi gerçekleştirildiği rapor edilmiştir.

Fungal proteazlar, bakteriyel proteazlara göre daha fazla çeşitlilik gösterirler. Buna nötral, asidik ve alkalin proteaz üreten *Aspergillus oryzae* örnek gösterilebilir. Ancak fungal proteazlar düşük aktiviteye ve düşük sıcaklık toleransına sahip oldukları için endüstriyel üretimde pek fazla tercih edilmezler (Rao et al., 1998).

### 2.5.5 Mikrobiyal proteazların endüstride kullanım alanları

Mikrobiyal proteazlar gösterdikleri büyük çeşitlilik ve ekstrem şartlara uygun özellikleri nedeniyle endüstride oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptirler. Özellikle gıda, deterjan ve deri endüstrisinde kullanılan mikrobiyal proteazlar diğer endüstriyel alanlarda da kullanılmaktadır.

Proteazlar, gıda endüstrisinde soya sosu ve jelatin ile kazein hidrolizatlarının üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca bitkisel bir enzim olan papain ile birlikte etin yumuşatılması işleminde de kullanılırlar. Proteazların gıda endüstrisinde diğer kullanım alanları peynir, ekmek, pasta bisküvi üretimi için düşük proteinli un üretimidir (Mathew, 1999). Gıda endüstrisinde kullanılan enzimlere örnek olarak Alcalase®, Neutrase®, Esperase®, Protamex™, and Novozym® FM verilebilir. Bu enzimler Novozymes, Danimarka tarafından pazarlanmaktadır. *Aspergillus saitoi* tarafından üretilen asidik karakterdeki aspergillopepsin I (Kikkoman Corp., Japonya) meyva sularının ve alkollü içeceklerin saklanması sırasında oluşan bulanıklığın giderilmesinde kullanılmaktadır (Sumantha et al., 2006).

Deterjan endüstrisinde protein kökenli lekelerin uzaklaştırılması amacıyla alkalin proteazlar deterjan katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Yüksek pH değerlerinde aktif olabildikleri için bakteriyel proteazlar bu endüstri alanında tercih edilmektedir. Özellikle *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen alkalin proteaz deterjan katkı maddesi olarak tercih edilmektedir. *Bacillus firmus* (Aunstrup and Andresen, 1972), *Bacillus sp. GX 6644* (Durham et al., 1987) ve *Conidiobolus coronatus* (Phadatare et al., 1993) tarafından üretilen proteazların da deterjan katkı maddesi olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir.

### 2.5.6 Mikrobiyal alkalin proteaz üretimi

Endüstriyel enzim üretiminin geliştirilmesinde ilk basamak potansiyel üretici olduğu düşünülen mikroorganizmanın doğal ortamından izolasyonudur. İzole edilen

mikroorganizmanın geliştirilen agar plak tekniklerine uygun olarak proteolitik aktivite taraması gerçekleştirilir. Bu tarama işleminde dikkat edilmesi gereken en önemli konu besi ortamında enzim aktivitesini inhibe edici ajanların bulunmamasıdır. Bu besi ortamlarında enzim substratı olarak kazein, jelatin, bovin serum albumin, hemoglobin gibi proteinler kullanılabilir (Sumantha et al., 2006).

Uygun suşun izolasyonundan sonra besi ortamı ve kültürasyon koşullarının optimizasyonu ile enzim üretiminin ve aktivitesinin artırılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Sumantha et al., 2006).

#### **2.5.6.1 Alkalen proteaz üretiminde etkili faktörler**

Proteaz üretiminde, azot ve karbon kaynağı bakımından zengin besi ortamları kullanılmaktadır. Karbon kaynağı olarak nişasta (Sinha and Satyanarayana, 1991, Ferrero et al., 1996), glikoz (Sinha and Satyanarayana, 1991; Gessesse and Kashe, 1997) ve laktoz (Sumantha et al., 2006) kullanımının enzim üretiminde artışı sağladığı rapor edilmiştir. Long ve çalışma arkadaşlarının (1981) yaptıkları çalışmanın sonucuna göre ise glikoz gibi kolay metabolize edilen karbon kaynaklarının enzim üretiminde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. *Bacillus licheniformis* S40 ile yapılan bir çalışmada fruktoz alkalen proteaz üretimi için en uygun karbon kaynağı seçilmiştir (Sen and Satyanarayana, 1993). Ayrıca yüksek karbonhidrat konsantrasyonlarının enzim üretimini baskıladığı bilinmektedir (Sumantha et al., 2006).

Alkalen proteaz üretimi için organik azot kaynaklarının, inorganik azot kaynaklarından daha etkili olduğu bilinmektedir (Mathew, 1999). Bakteriyel alkalen proteaz üretiminde organik azot kaynaklarının teşvik edici özelliği Ferrero ve arkadaşları (1996) ile Shi ve arkadaşları (1997) tarafından yapılan çalışmalar sonucunda rapor edilmiştir. İnorganik azot kaynaklarının özellikle yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında alkalen proteaz üretimini baskıladığı bildirilmiştir (Heineken and O'Conner, 1972; Long et al., 1981; Fujiwara and Yamamoto, 1987). Ayrıca serbest aminoasitlerin alkalen proteaz üretimini baskıladığı bilinmektedir. *Bacillus* cinsine ait

türlerle yapılan çalışmalarda izolösün ve prolinin alkalen proteaz üretimini baskıladığı rapor edilmiştir (Sumantha et al., 2006).

Kültür ortamının başlangıç pH değeri enzim üretimi için önemli bir faktördür (Mathew, 1999). *Bacillus pumilus* c72 için nötral bir pH değeri bildirilirken (Yaoyu et al., 1997), *Bacillus coagulans* (Gaiju et al., 1996), *Bacillus licheniformis* (Mao et al., 1992), *Pseudomonas maltophilia* (Kobayashi et al., 1985) ve *Streptomyces moderatus* (Chandrasekaran and Dhar, 1983) için asidik pH değerlerinin uygun olduğu gözlenmiştir. *Bacillus sp* GX 6644 için en uygun pH değeri 9.5 (Durham et al., 1987), *Pseudomonas sp.* SJ 320 için pH 10.0 (Cheong et al., 1993), *Bacillus subtilis* için pH 10.5 (Purva et al., 1998) ve *Bacillus pumilis* mutantları için pH 10.5-11.0 (Qiu et al., 1990) olarak rapor edilmiştir.

Mikroorganizmaların enzim üretim yetenekleri üzerine inokulasyon oranının etkisi bulunmaktadır (Mathew, 1999). Sinha and Satyanarayana (1991) *Bacillus licheniformis* S40 ile yaptıkları bir çalışmada en uygun inokulasyon oranını % 2 olarak belirlemişlerdir. Gaiju ve çalışma arkadaşlarının (1996) *Bacillus coagulans* ile yaptıkları bir çalışmanın sonunda en uygun inokulasyon oranı % 4 olarak bildirilmiştir.

Bakteriyel alkalen proteaz üretiminde mikroorganizmaların ihtiyaç duydukları sıcaklık değerleri, türler arasında oldukça büyük farklılık göstermektedir. *Bacillus licheniformis* S40 için alkalen proteaz üretiminde en uygun sıcaklık 35°C olarak rapor edilirken (Sinha and Satyanarayana, 1991), *Bacillus subtilis* için 37°C olarak belirtilmiştir (Chang et al., 1988). *Pseudomonas sp* SJ320 (Cheong et al., 1993) ve *Nocordiopsis dassonvillei* (Tusijibo et al., 1990) için 20-27°C gibi düşük sıcaklıklar bildirilirken *Streptomyces rectus var. proteolyticus* ile 50°C' de en yüksek enzim üretimi gözlenmiştir (Misuzawa et al., 1969). Ayrıca *Bacillus coagulans* (Gaiju et al., 1996) ve *Bacillus stearothermophilus* AP-4 (Dhandapani and Vijayaragavan, 1994) için en uygun sıcaklık 55°C olarak belirlenmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

### 3.1 Materyal

#### 3.1.1 Kullanılan kimyasallar

İzolatin üretim aşaması, enzim aktivitesinin saptanması ve enzim profilinin çıkarılması çalışmalarında kullanılan bütün kimyasallar analitik saflıkta olup Merck, Sigma, Riedel de Haen ve Applichem' den temin edilmiştir.

#### 3.1.2 Kullanılan besi ortamları

##### **Minimal Salt Medium Agar:**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	: 5,6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	: 2,1 g
NH <sub>4</sub> Cl	: 2,7 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	: 0,05 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	: 0,19 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	: 0,001 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	: 0,003 g
Maya Özütü	: 0,05 g
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> KO <sub>2</sub>	: 1 g
Glikoz	: 20 g
Agar	: 15 g

Besiyeri içerikleri 1000 ml distile suda çözülmüş ve 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

**Skim Milk Agar:*****Solüsyon A***

Nutrient Broth: 1,3 g

Agar : 1,6 g

Distile Su : 90 ml

pH  $6,3 \pm 0,2$  ayarlanıp  $121^{\circ}\text{C}$ ' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

***Solüsyon B***

%10' luk Skim Milk besiyeri için;

Skim Milk: 1 g

Distile Su : 10 ml

1,5 atmosfer basınçta 8 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Daha sonra her iki besiyeri karıştırılarak plaklara dökülmüştür.

**Bazal ortam:**

Pepton : 5 g

Glikoz : 10 g

NaCl : 0,5 g

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  : 0,1 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 0,3 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0,4 g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O : 0,1 g  
Maya özütü : 5 g  
Distile su : 1000 ml

pH 7,5 ± 0,2' e ayarlanıp 110°C' de 25 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

**Nutrient Agar:**

Nutrient agar : 20 g  
Distile su : 1000 ml

121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

**Nutrient Broth:**

Nutrient broth : 8 g  
Distile su : 1000 ml

121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

**İndol besiveri:**

Tripton: 10.0 gr



Sodyum klorür (NaCl): 5.0 gr

Distile Su: 1000 ml

pH  $7,4 \pm 0,2$ 'e ayarlanıp  $121^{\circ}\text{C}$ ' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

### 3.1.3 Kullanılan çözeltiler

#### **Gram boyamada kullanılan çözeltilerin hazırlanması:**

##### **Kristal viyole:**

Kristal viyole : 2 g

Etanol : 20 ml

Amonyum oksalat : 0,8 g

Distile su : 80 ml

2 çözelti ayrı ayrı hazırlandıktan sonra karıştırılmıştır.

##### **Lugol:**

Potasyum iyodür : 2 g

Distile su : 100 ml

İyot : 1 g

Potasyum iyodür ve distile su iyice çözüldükten sonra, iyot eklenmiştir. Karanlık ortamda saklanmıştır.

**Safranin:**

Safranin : 0,25 g

Distile su: 90 ml

Safranin, distile su içinde iyice çözülmüştür.

**Biyokimyasal testlerde kullanılan çözeltiler:****%0,5' lik tetrametil-p-fenilendiamin çözeltisi:**

Tetrametil-p-fenilendiamin: 0,5 g

Distile su: 100 ml

Tetrametil-p-fenilendiamin, distile su içinde iyice çözülmüştür.

**Proteaz aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler:****% 0,6' lık kazein çözeltisi:**

50 mM Glisin-NaOH-NaCl tampon çözeltisinin 100 ml'sinde 0,6 g olacak şekilde çözülerek hazırlanmıştır.

**50 mM Glisin-NaOH-NaCl tampon (pH 10.5):**

Glisin : 3,75 g

NaOH : 2 g

NaCl : 2,925 g

1 L distile suda, glisin ve sodyum hidroksit ayrı ayrı çözülmüş ve bu iki çözelti pH 10.5 olana dek birbiriyle karıştırılmıştır. Bu karışıma 2,925 gr NaCl ilave edilmiştir.

**Trikloroasetikasit (TCA) çözeltisi:**

0.11 M TCA : 17,97 g

0.22 M Sodyum asetat : 18,05 g

0.33 M Asetik asit : 18,87 ml

Ortam içerikleri 1 L distile suda çözülür.

**Sodyum karbonat çözeltisi (0,5 M)**

52,995 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (sodyum karbonat) 1 L distile suda çözülmüştür.

**Folin-Ciocalteu reaktifi (yarı yarıya seyreltilmiş)**

100 ml Folin-Ciocalteu fenol, 100 ml distile suda seyreltilir.

**Optimizasyon çalışmalarında kullanılan tampon çözeltiler:**

pH optimizasyonu için 6-12 arasındaki pH değerleri çalışılmıştır. 6-8 arasındaki pH değerleri için fosfat tamponu; 9-12 arasındaki pH değerleri için  $\text{NaHCO}_3 - \text{NaOH}$  tamponu kullanılmıştır. Bu tamponların hazırlanmasında Perrin ve Dempsey (1974)' in önerdiği yöntemden yararlanılmıştır.

**$\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$  tamponu:**

pH	X
6,0	6,15
7,0	30,5
7,5	38,7
8,0	47,35

X ml 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (13,6 g/l) alınır ve (50-X) ml 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (4,0 g/l) ilave edilerek 100 ml' ye tamamlanır.

**$\text{NaHCO}_3 - \text{NaOH}$  tamponu:**

pH	X
9,0	3,1
10	10,7
11	22,7
12	28,9

50 ml 0,05 M NaHCO<sub>3</sub> (4,2 g/l) alınır ve X ml 0,1 M NaOH (4,0 g/l) ilave edilerek 100 ml' ye tamamlanır.

**Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan tampon çözeltiler:**

**50 mM Glisin-NaOH-NaCl tampon (pH 8-12 aralığı):**

Glisin : 3,75 g

NaOH : 2,0 g

NaCl : 2,925 g

1 L distile suda, glisin ve sodyum hidroksit ayrı ayrı çözülmüş ve bu iki çözelti pH 8,0, 9,0, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5 ve 12,0 olana dek birbiriyle karıştırılmıştır. Bu karışıma 2,925 g NaCl ilave edilmiştir.

**200 mM Glisin-NaOH-NaCl tampon (pH 12,5):**

Glisin :15,012 g

NaOH : 8 g

NaCl : 2,925 g

1 L distile suda, glisin ve sodyum hidroksit ayrı ayrı çözülmüş ve bu iki çözelti pH 12,5 olana dek birbiriyle karıştırılmıştır. Bu karışıma 2,925 g NaCl ilave edilmiştir.

**SDS-PAGE ve zymogram analizlerinde kullanılan çözeltiler:****%12' lik ayırma jeli:**

Kullanılan kimyasal	Miktarı (µl)
dH <sub>2</sub> O	1980
%30 akrilamid-bisakrilamid	2400
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1500
%10 SDS	60
APS	60
TEMED	15

**%5' lik yükleme jeli:**

Kullanılan kimyasal	Miktarı (µl)
---------------------	--------------

dH <sub>2</sub> O	1980
%30 akrilamid-bisakrilamid	250
1.0 M Tris base (pH 6.8)	190
%10 SDS	15
APS	15
TEMED	1,5

**%30 akrilamid-bisakrilamid:**

Akrilamid : 29 g

Bisakrilamid : 1 g

Akrilamid ve bisakrilamid 60 ml distile su ile çözülerek 37°C' ye ısıtılmış ve çözünmesi sağlanmıştır. Toplam hacim 100 ml olacak şekilde tamamlanmış ve 0,45 µl' lik filtre kağıdı ile sterilize edilmiştir.

**1,5 M Tris-HCl (pH 8,8):**

Tris base : 27,2475 g

Distile su: 100 ml

HCl eklenerek pH 8,8' e ayarlanmıştır ve 150 ml' ye tamamlanmıştır.

**1,0 M Tris base (pH 6,8):**

Tris base : 12,11 g

Distile su: 80 ml

Konsantre HCl ile pH 6,8' e ayarlanmış ve distile su ile hacim 100 ml' ye tamamlanmıştır.

**%10 SDS (pH 7,2):**

SDS : 10 g

Distile su: 80 ml

68°C' ye ısıtılmıştır. Konsantre HCl ile pH 7,2' ye ayarlanmış ve hacim 100 ml' ye tamamlanmıştır.

**%10' luk amonyum per sülfat (APS):**

APS : 0,25 g

Distile su: 2,5 ml

140 µl' lik hacimlerde tüplere ayrılarak -20°C' de saklanmıştır.

**Yürütme tamponu:**

Tris base : 7,55 g

Glisin : 47 g

SDS (%10) : 25 ml

Karışım distile su ile 500 ml' ye tamamlanır.



**Boya çözeltileri:**

<b>Kimyasallar</b>	<b>A boyası</b>	<b>B boyası</b>	<b>C boyası</b>
Isopropanol	25 ml	25 ml	10 ml
Asetik asit	10 ml	10 ml	10 ml
Coomassieblue (%25)	20 ml	8 ml	0,8 ml
Distile su	45 ml	57 ml	80 ml

Elektroforez işlemi sonunda jel, sırası ile A, B ve C boyları içinde 15' er dakika bekletilir.

**3.2 Yöntem****3.2.1 İzolasyon çalışmaları**

Eskişehir organize sanayi bölgesinde belirlenen ve uzun süre hidrokarbon türevleri için alıcı ortam olarak kullanılmış alanlar izolasyon çalışmaları için seçilmiştir. Hidrokarbonla kirlenmiş farklı istasyonlardan aseptik şartlarda alınan toprak örnekleri +4°C'de muhafaza edilerek, laboratuara getirilmiştir. Laboratuara getirilen toprak örnekleri izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

10 g toprak örneği 90 ml steril serum fizyolojik çözeltisinde (%0.9) süspansiyon edilmiş ve bu çözeltiden  $10^{-5}$  e kadar seri seyreltmeler yapılmıştır. Bu seyreltmelerden 100 µl alınarak yayma plaka yöntemi ile minimal salt medium agar besi ortamına ekim yapılmıştır. 35°C' de 48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında besiyerinde tek düşmüş farklı morfolojik görünüme sahip koloniler seçilerek ayrı petrilere ekimleri yapılmış ve

izolatların saf kültürleri elde edilmeye çalışılmıştır. Bu koloniler daha sonraki çalışmalar için Nutrient Agarda, +4°C' de muhafaza edilmişlerdir.

### **3.2.2 İzolatların ekstraselüler proteaz enzim üretim yeteneklerinin belirlenmesi**

İzolatların proteolitik enzim üretim yetenekleri Skim Milk Agar (SMA)' da araştırılmıştır. İğne uçlu öze ile alınan izolat kolonileri aseptik koşullarda saplama yöntemi ile 2 paralel olacak şekilde SMA' a inoküle edilerek 35±1°C' de, 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda ekim yapılan bölge etrafında şeffaf zon oluşturan izolatlar, proteolitik aktiviteleri bakımından pozitif ve zon oluşturmayan izolatlar ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Koloni etrafında 3-13 mm' lik hidroliz zonu zayıf proteolitik aktivite (+), 13,01-25 mm' lik hidroliz zonu orta derecede proteolitik aktivite (++) , 25,01-35 mm' nin arasındaki hidroliz zonu kuvvetli proteolitik aktivite (+++) olarak değerlendirilmiştir (Chopra and Mathur, 1984; Mostert et al., 1979).

### **3.2.3 Proteaz üretimi**

Enzim üretimi için izolatların +4°C' deki stok kültürlerinden bazal ortamda aşı kültürleri hazırlanmıştır. 35±1°C' de, 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda aşı kültürlerin spektrofotometrik olarak optik yoğunlukları ayarlanmış ve bazal üretim ortamına alınmıştır. Üretim ortamında 35±1°C' de 18 saat inkübasyona devam edilmiştir.

### **3.2.4 Proteaz aktivite tayini**

Proteaz aktivite tayini Anson Yöntemine göre spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Enzim üretim ortamından alınan 10 ml' lik sıvı kültürler 9.000 rpm' de 10 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Elde edilen supernatant ham enzim kaynağı olarak aktivite tayininde kullanılmıştır.

Supernatant (0,5 ml), 50 mM glisin-NaOH-NaCl tamponunda hazırlanan %0,6'lık kazein çözeltisinin 2,5 ml' si ile karıştırılarak 30°C' de 20 dakika su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda ortama 2,5 ml trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi ilave edilerek reaksiyon durdurulmuş ve 30°C' de su banyosunda 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyon karışımı 9.000 rpm' de 5 dakika süre ile santrifüjlenmiş ve supernatantın 0,5 ml' si üzerine 0,5 M sodyum karbonat çözeltisinden 2,5 ml ilave edilmiştir. Karışıma 2 kat seyreltilmiş 0,5 ml Folin-Ciocalteau reaktifi ilave edilerek, karışım 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin, 0,5 ml besiyeri ile hazırlanan köre karşı 660 nm' deki absorbans değerleri ölçülmüştür. Enzim aktivitesi izleyen metinde verilen standart tirozin grafiği kullanılarak aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Takami et al., 1977).

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/ml / dak)} = \frac{(\text{OD} / \text{Eğim}) \times \text{Seyreltme Faktörü} \times \text{Toplam Hacim(ml)}}{\text{Enzim Hacmi(ml)} \times \text{İnkübasyon Süresi(dak)}}$$

#### **3.2.4.1. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması**

Proteaz aktivitesi hesaplamasında kullanılacak olan tirozin standart grafiğinin oluşturulması için, 50 mM glisin-NaOH-NaCl tamponunda (pH 10,5) 0-35 µg/ml tirozin içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonda tirozin içeren her bir çözeltiden 0,5 ml temiz tüplere aktarılarak üzerine 2,5 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 0,5 ml iki kez seyreltilmiş Folin-Ciocalteau reaktifi ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek 660 nm' deki absorbans değerleri okunmuştur. Tirozin miktarına bağlı olarak okunan 660 nm' deki absorbanslardan yararlanılarak, tirozin standart grafiği çizilmiştir. Çizilen standart grafik proteaz aktivitelerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Tirozin standart grafiği Ek A' da verilmiştir.

### 3.2.5 Proteaz üretimi için etkin izolatın belirlenmesi

İzolatların ekstraselüler proteaz aktivitelerinin belirlenmesi çalışmaları sonucunda kuvvetli proteolitik aktivite (+++) gösteren üç izolat seçilmiştir. Bu izolatlar bazal ortama inoküle edilerek 35°C’ de 18 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 3.2.4’ de verilen yönteme göre proteaz aktiviteleri ölçülmüş ve proteaz üretimi için en etkin izolat belirlenmiştir. Çalışmaya seçilen ve D3 olarak kodlanan organizma ile devam edilmiştir.

### 3.2.6 Seçilen İzolatın Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Tanımlama çalışmalarında izolatın Nutrient agarda geliştirilmiş 24 saatlik kültürleri kullanılmıştır.

#### **Gram Boyama:**

Gram boyama işlemi Smith ve Hussey (2005)’ in belirttiği yönteme göre yapılmıştır. Buna göre; bakterilerin 24 saatlik genç kültürlerinden, steril öze ile alınarak 1 damla distile su ile yayma preparat hazırlanmış ve preparatlar havada kurumaya bırakılmıştır. Kuruma tamamlandıktan sonra lamlar 3 defa alevden geçirilerek tespit işlemi yapılmıştır. Daha sonra lamların üzerine, mikrobiyal film tabakasını kaplayacak şekilde, bol miktarda kristal viyole damlatılarak 1 dakika beklenmiştir. Kristal viyole yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra lamların üzerine lugol dökülerek yine 1 dakika beklenmiştir. Boya, suyla uzaklaştırılmış ve lamlar % 95’ lik etil alkol ile 15-20 saniye yıkanmıştır. Ardından, film tabakasının üzerine safranin eklenmiş ve 30 saniye sonra boya yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar, havada kurutulmuş ve immersiyon yağı ile 100X’ lik objektifte, ışık mikroskopunda incelenmiştir. Koyu mor (menekşe) renkli olan mikroorganizmalar Gram (+), açık pembe renkli olanlar ise Gram (-) olarak tanımlanmıştır.

**Katalaz testi:**

Lam üzerine saf kolonilerden bir öze dolusu alınıp, koloni üzerine 2-3 damla % 3' lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatarak karıştırılmıştır. Lam üzerinde gaz kabarcıklarının oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Miller, 1992).

**İndol Testi:**

İndol besiyerine izolatanın saf kültüründen aşılama yapılmış ve 37°C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda besiyerine kovaks ayırıcı damlatılmıştır. İndol besiyerinin yüzeyinde kırmızı halka oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Harley, 2005).

**Oksidaz Testi:**

Nutrient agarda saf kültürü hazırlanan izolat 35°C' de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda saf kültür üzerine tetrametil-p-fenilendiaminin % 0,5' lik çözeltisinden ilave edilmiştir. 1-2 dakikalık bekleme süresi sonunda mavi renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (MacFaddin, 1972).

**3.2.7 Proteaz üretimi için en uygun koşulların belirlenmesi**

Proteaz üretimi için en uygun koşulların belirlenmesi için; başlangıç pH, inokulum miktarı, karbon kaynakları, karbon kaynağının miktarı, azot kaynakları, azot kaynağının miktarı, inkübasyon süresi ve sıcaklık parametreleri çalışılmıştır. Enzim üretim çalışmaları 250 ml' lik erlenlerde 50 ml besiyeri ortamında gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.7.1 Üretim ortamının başlangıç pH değerinin proteaz üretimine etkisi**

Bu çalışmada üretim ortamının başlangıç pH değerinin proteaz üretimine etkisini belirlemek için bazal ortam pH 5 ve 12 arasındaki tamponlarla hazırlanmıştır (Ahmed et al., 2010; Srividya and Mala, 2009; Abou-Elela et al., 2011). pH 5-8 için  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  tamponu, pH 9-12 için  $\text{NaHCO}_3$ - $\text{NaOH}$  tamponu kullanılmıştır. 250 ml' lik erlenlerde belirtilen pH değerlerinde hazırlanan 50 ml' lik besiyerlerine 24 saatlik aşı kültürden %5 oranında inokulasyon gerçekleştirilmiştir. Kültürler çalkalamalı inkübatörde 150 rpm çalkalama hızında, 35°C sıcaklıkta ve 18 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda proteaz aktivitesi 3.2.4' de verilen yönteme göre belirlenmiştir.

### **3.2.7.2 İnokulum miktarının proteaz üretimine etkisi**

İnokulum miktarının proteaz üretimine etkisinin belirlenmesi amacı ile bir önceki çalışmada belirlenen pH değerinde sabit tutularak hazırlanmış 50 ml besiyeri ortamına %1 – 3 – 5 – 7 – 10 oranında inokulasyon gerçekleştirilmiştir (Ahmed et al., 2010; Naidu and Davi, 2005). Kültürler çalkalamalı inkübatörde 150 rpm çalkalama hızında, 35°C sıcaklıkta ve 18 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda proteaz aktivitesi 3.2.4' de verilen yönteme göre belirlenmiştir.

### **3.2.7.3 Karbon kaynağının proteaz üretimine etkisi**

Mikroorganizmaların üremesinde karbon kaynaklarının önemi dikkate alınarak farklı karbon kaynakları ile çalışılmıştır. Bu amaç ile enzim üretim ortamında bulunan glikoz yerine aynı oranda laktoz, maltoz, sukroz, selüloz, fruktoz, gliserol, melas ve nişasta karbon kaynağı olarak kullanılmıştır (VijayAnand et al., 2010; Sangeetha et al., 2008). Bu besiyeri ortamlarına daha önceki çalışmalarda belirlenen koşullar sabit tutularak inokulasyon gerçekleştirilmiştir. Çalkalamalı inkübatörde 150 rpm çalkalama hızında, 35°C sıcaklıkta ve 18 saat süre ile inkübasyona bırakılan kültürlerin proteaz aktivitesi 3.2.4' de verilen yönteme göre belirlenmiştir.

#### **3.2.7.4 Karbon kaynağı miktarının proteaz üretimine etkisi**

Seçilen karbon kaynağının farklı miktarlarını (% 0,25-0,5-1,0-1,5-2,0-2,5-3,0-5,0) içeren 50 ml' lik besiyerleri seçilen pH değerinde hazırlanmış ve belirlenen inokulum miktarında inokulasyon gerçekleştirilerek karbon kaynağı miktarının proteaz üretimine etkisi belirlenmiştir. Kùltürler çalkalamalı inkübatörde 150 rpm çalkalama hızında, 35°C sıcaklıkta ve 18 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda proteaz aktivitesi 3.2.4' de verilen yönteme göre belirlenmiştir.

#### **3.2.7.5 Azot kaynağının proteaz üretimine etkisi**

Azot kaynaklarının proteaz aktivitesi üzerine etkisi bazal ortam sıvı besiyerinde azot kaynağı olarak bulunan maya özütü yerine aynı oranda farklı inorganik ve organik azot kaynaklarının kullanılması ile belirlenmiştir. Bu amaçla enzim üretim ortamında organik azot kaynağı olarak malt özütü, tirozin, maya özütü, yağsız süt tozu, jelatin ve glisin; inorganik azot kaynağı olarak ise amonyum nitrat ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) ve amonyum klorür ( $\text{NH}_4\text{Cl}_2$ ) kullanılmıştır (VijayAnand et. al., 2010; Sangeetha et al., 2008). Farklı azot kaynakları ile hazırlanan bu besiyerlerine seçilen inokulum miktarında inokulasyon gerçekleştirilmiş ve kùltürler çalkalamalı inkübatörde 150 rpm çalkalama hızında, 35°C sıcaklıkta ve 18 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda proteaz aktivitesi 3.2.4' de verilen yönteme göre belirlenmiştir.

#### **3.2.7.6 Azot kaynağı miktarının proteaz üretimine etkisi**

Azot kaynağı miktarının proteaz üretimine etkisinin belirlenmesi amacı ile seçilen azot kaynağının farklı miktarlarını içeren 50 ml' lik besiyerleri seçilen pH

değerinde hazırlanmış ve seçilen inokulum miktarında inokulasyon gerçekleştirilerek azot kaynağı miktarının proteaz üretimine etkisi belirlenmiştir. En yüksek aktivitenin belirlendiği azot kaynağı bazal ortam sıvı besiyerine % 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 ve 5,0 oranlarında ilave edilmiştir. Çalkalamalı inkübatörde 150 rpm çalkalama hızında, 35°C sıcaklıkta ve 18 saat süre ile inkübasyona bırakılan kültürlerin proteaz aktivitesi 3.2.4' de verilen yönteme göre belirlenmiştir.

### **3.2.7.7 İnkübasyon sıcaklığının proteaz üretimine etkisi**

Enzim üretimi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisini belirlemek için en yüksek enzim aktivitesinin gözleendiği karbon ve azot kaynaklarının uygun miktarları ile hazırlanan bazal ortam seçilen pH değerindeki tampon ile hazırlanmıştır. Kültürler 25-30-35-40-45-50 ve 55°C' de 150 rpm çalkalama hızında 18 saat inkübe edilmiş (VijayAnand et al., 2010) ve inkübasyon süresi sonunda 3.2.4' de verilen yönteme göre aktivite tayini yapılmıştır.

### **3.2.7.8 İnkübasyon süresinin proteaz üretimine etkisi**

İnkübasyon süresinin enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacı ile daha önce belirlenen optimum koşullarda hazırlanan üretim ortamına uygun miktarda inokulasyon gerçekleştirilmiş ve seçilen sıcaklık değerinde 150 rpm çalkama hızında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyona bırakılan bağımsız kültürlerden 6, 12, 18, 24, 48, 72 ve 96 saat sonunda örnekler alınmış (Reddy et al., 2011) ve 3.2.4' de verilen yönteme göre aktivite tayini yapılmıştır.

Tüm optimizasyon çalışmaları aseptik koşullarda gerçekleştirilmiştir. Her bir deneme birbirinden bağımsız en az 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.



### **3.2.8 Üretilen proteaz enziminin karakterizasyonu**

Etkin izolatın (D3) ürettiği enzimin optimum reaksiyon sıcaklığının ve pH değerinin belirlenmesi, termostabilitesi ve pH stabilitesinin belirlenmesi, çeşitli inhibitörlerin ve ağır metallerin enzimatik aktiviteye etkilerinin araştırılması amacı ile optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen koşullarda üretilen izolata ait kültür sıvısı toplanmış, 9.000 rpm' de 10 dakika santrifüj işlemine tabi tutularak hücrelerinden ayrılmış ve elde edilen supernatant ham enzim kaynağı olarak enzim karakterizasyonunda kullanılmıştır.

#### **3.2.8.1 Proteaz enziminin optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi**

Proteaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla enzim %0,6' lık kazein çözeltisi ile 25-30-35-40-45-50-55-60 ve 65°C' de 20 dakika inkübasyona bırakılmış (Khan et al., 2011; Çelik, 2007) ve inkübasyon sonunda aktivite tayini yapılmıştır. Farklı sıcaklıklarda elde edilen enzim aktivite değerleri, 30°C' de ölçülen enzim aktivitesi 100 kabul edilerek bağıl aktivite cinsinden hesaplanmıştır.

#### **3.2.8.2 Proteaz enziminin optimum reaksiyon pH değerinin belirlenmesi**

Proteaz enziminin aktivitesi üzerine reaksiyon ortamının pH değerinin etkisinin araştırılması amacıyla enzim, 8, 9, 10, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5 ve 13 pH değerlerindeki glisin-NaOH-NaCl tamponu ile hazırlanmış %0,6' lık kazein çözeltisi ile 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 3.2.4' de verilen yönteme göre yapılan aktivite tayininde en yüksek aktiviteyi gösteren pH değeri 100 kabul edilmiştir. Diğer pH değerlerinde elde edilen enzim aktiviteleri bağıl aktivite cinsinden hesaplanmıştır. Çalışmada pH 8-12 aralığı 50mM, glisin-NaOH-NaCl ve pH 12,5 200mM glisin-NaOH-NaCl tamponu ile hazırlanmıştır (Öner, 2008).

### **3.2.8.3 Proteaz enziminin termostabilitesinin belirlenmesi**

Proteaz enziminin sıcaklık kararlılığının belirlenmesi amacı ile optimum koşullarda üretimi gerçekleştirilen izolatın kültür sıvısı santrifüj işlemine tabi tutularak supernatantı elde edilmiştir. Elde edilen supernatant 25 ve 70°C arasındaki sıcaklık değerlerinde 1 saat süre ile ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyon işleminden sonra 0,5 ml supernatant 50 mM, pH 10,5 glisin-NaOH-NaCl tamponu ile hazırlanan %0,6'lık kazein çözeltisi ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 3.2.4' de verilen yönteme göre enzim aktiviteleri tayin edilmiştir. En yüksek aktivitenin gözlemlendiği pH değeri 100 kabul edilerek farklı sıcaklıklarda ön inkübasyona bırakılan supernatantların bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır (Charles et al., 2008).

### **3.2.8.4 Proteaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi**

Proteaz enziminin pH stabilitesini belirlemek amacıyla 0,5 ml enzim, pH 6 ve 13 arasındaki değerlere sahip 4,5 ml tampon çözeltisi ile karıştırılarak 1 saat süre ile 30°C' de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda enzim-tampon karışımından 0,5 ml alınarak 3.2.4' de verilen yönteme göre her pH değeri için aktivite tayini yapılmıştır. En yüksek aktiviteyi gösteren pH değeri 100 kabul edilmiştir. Farklı pH değerlerinde ön inkübasyona bırakılan supernatantların bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır (Charles et al., 2008).

### **3.2.8.5 Ağır metallerin proteaz aktivitesi üzerine etkisi**

Proteaz aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonlarının etkisinin saptanması amacıyla FeCl<sub>3</sub>, CuCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, NiCl ve HgCl metalleri enzim aktivitesi ölçümünde son konsantrasyonları 5 mM olacak şekilde reaksiyon ortamına ilave edilmiş ve 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda içerisinde metal iyonu bulunmayan kontrol çözeltisinin aktivitesi 100 kabul edilerek değişik metal iyonlarını içeren reaksiyon karışımlarının bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır.

### **3.2.8.6 Çeşitli denatürantların proteaz aktivitesi üzerine etkisi**

Bu çalışmada proteaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacı ile denatürant özellikte olduğu bilinen SDS ve üre kullanılmıştır. Bu denatürantlardan SDS enzim aktivite ölçümünde reaksiyon karışımına son konsantrasyonu 0,5 ve 1,0 mM olacak şekilde eklenirken, üre reaksiyon karışımına son konsantrasyonu 0,5, 1,0 ve 5,0 mM olacak şekilde eklenmiştir. 3.2.4' de verilen yöntemle göre yapılan aktivite tayini sonucunda elde edilen sonuçlar içerisinde hiçbir denatürant bulunmayan kontrol çözeltisinin aktivitesi 100 kabul edilerek bağıl olarak hesaplanmıştır.

### **3.2.9 Proteaz enziminin kısmi saflaştırılması**

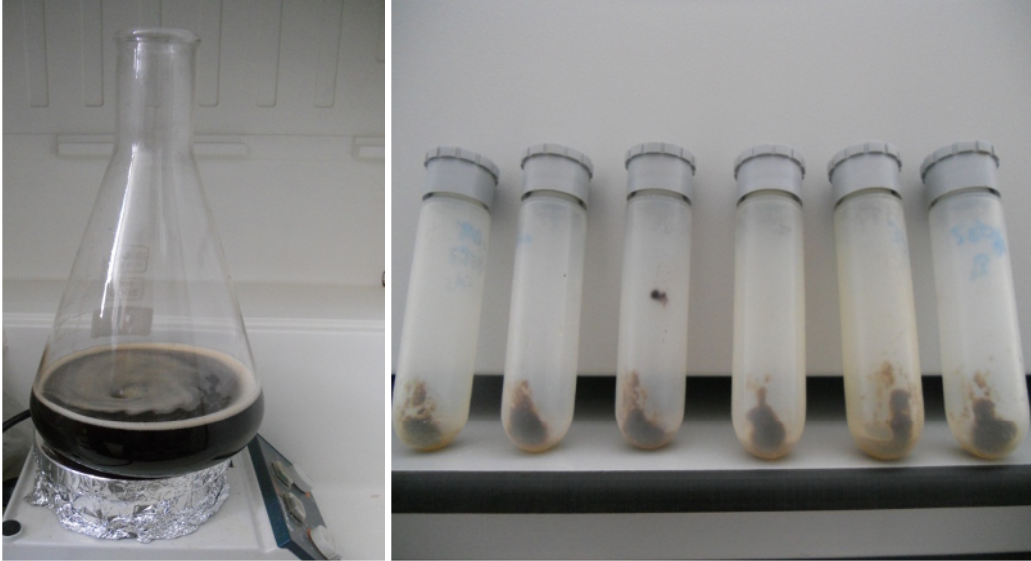
Proteolitik aktivite açısından etkin izolattan elde edilen proteaz enzimi hücre dışına salgılanan bir enzim olduğundan fermentasyon sonunda hücreler +4°C' de 9000 rpm' de 10 dakika santrifüjlenerek (SIGMA, model) ortamdan uzaklaştırılmış ve kültür üst sıvısı enzimin amonyum sülfat ile çöktürülmesi ve diyaliz çalışmalarında kullanılmak üzere +4°C' de saklanmıştır.

#### **3.2.9.1 Proteaz enziminin amonyum sülfat ile çöktürülmesi**

Kültür üst sıvısında bulunan proteaz enziminin çöktürülmesi amacı ile katı  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  son konsantrasyon %75 olacak şekilde buz banyosu içindeki kültür üst sıvısına karıştırılarak eklenmiştir. İstenen doygunluğa karşılık gelen amonyum sülfat miktarı 1000 ml kültür üst sıvısına çözünmesine izin verecek şekilde karıştırılarak yavaş yavaş ilave edilmiştir.

Amonyum sülfat çöktürmeleri, çöktürme ortamı pH değeri 10,5 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Amonyum sülfat ilavesinin bitiminde elde edilen süspansiyon çözeltisi 1 gece süre ile karışmaya bırakılmıştır (Şekil 3.1a). Süre bitiminde çözelti içindeki protein agregatları 10000xg' de +4°C' de 30 dakika süre ile santrifüjlenerek

çöktürülmüş ve üst sıvı ile çökelti ayrılmıştır (Şekil 3.1b). Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu oluşan protein pelletleri 50 mM pH 10,5 NaOH-glisin tampon çözeltisinin en az miktarında çözülerek yine aynı tampon çözeltisine karşı gece boyunca diyaliz edilmiştir. Amonyum sülfat çöktürmeleri ve diyaliz işlemlerinin hepsi +4°C' de gerçekleştirilmiştir (Öner, 2008).



**Şekil 3.1.** a) Amonyum sülfat çöktürmesi b) Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu oluşan protein pelletleri

### **3.2.9.2 Diyaliz**

Protein çözeltilerinden tuzların giderimi ya da bir sonraki saflaştırma işleminin verimli çalışması için çözeltinin tamponunun değiştirilmesi sıkça karşılaşılan durumlardandır. Bu amaçla soğuk diyaliz işlemi uygulanmıştır. Amonyum sülfat ile çöktürülen protein çözeltisi küçük molekülleri geçiren büyük molekülleri alıkoyan yarı geçirgen bir membrandan oluşan diyaliz torbasına (Sigma D-9777 sellüloz membran) konmuştur. Diyaliz torbası pH 10,5 NaOH-glisin tampon çözeltisi içine bırakılmıştır. Yarı geçirgen diyaliz hortumları uygun büyüklüklerde kesildikten sonra üniform bir

gözenek büyüklüğü sağlamak ve ağır metal kontaminantlarını gidermek amacı ile bir ön işlemde geçirilmiştir. Bu ön işlemde uygulanan yöntem izleyen metinde açıklanmıştır.

- Diyaliz edilecek sıvıyı alacak şekilde uygun boyda kesildikten sonra bu hortum %2 NaHCO<sub>3</sub> ve %0,05 EDTA içeren çözelti içine tamamen daldırılarak 10 dakika kaynatılmıştır. Kaynatma sırasında hortumun sıvıya dalmış durumda olmasına özen gösterilmiştir.

- Kaynama sıvısı atılmıştır ve hortumlar 10 dakika distile su ile kaynatılmış ve bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır.

- Diyaliz hortumları mikrobiyal kontaminasyonu önlemek amacı ile %20 (v/v) etanol içeren sıvı içine alınmış ve +4°C' de saklanmıştır.

Diyaliz işlemi ise şu basamaklardan oluşmuştur:

- Diyaliz hortumu kullanılmadan önce hortumun içi ve dışı distile su ile yıkanmıştır.

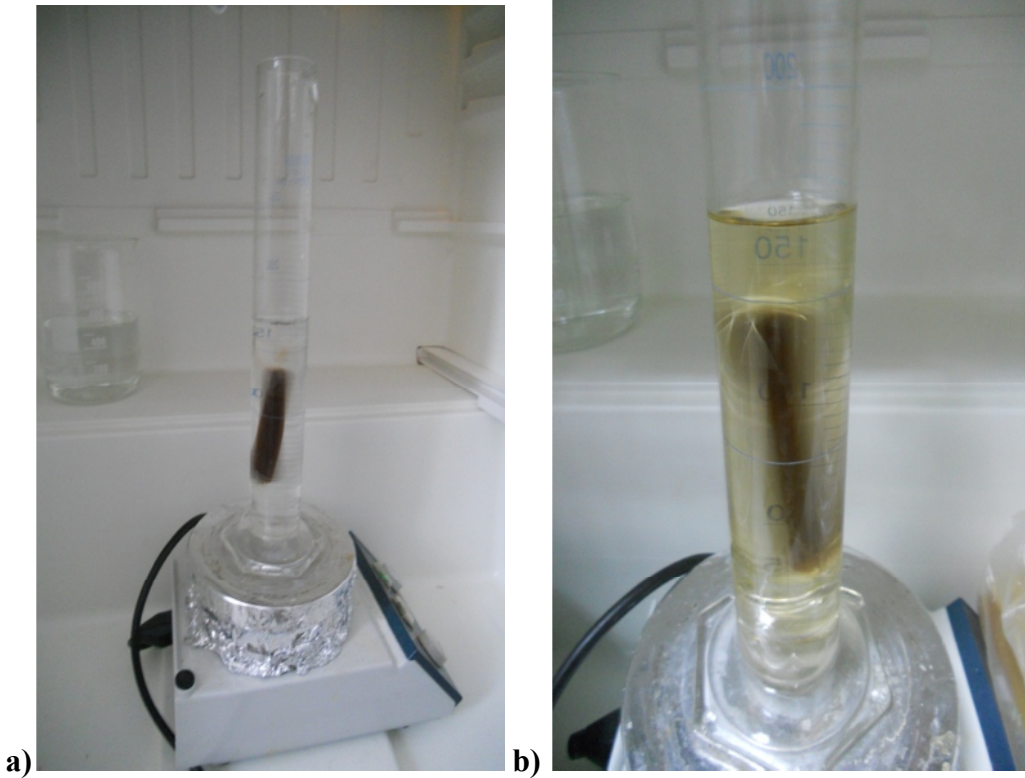
- Hortumun bir ucu bağlamış ve diyaliz edilecek sıvı hortum içine konulmuştur. Hortum bir beherin içinde olacak şekilde doldurulmuştur. Diyaliz esnasında hortumun hacmi artacağından ağzına kadar doldurulmamaya özen gösterilmiştir.

- Torbadaki hava uzaklaştırılacak şekilde torbanın üst kısmı da sıkıca bağlanmıştır.

- Torba büyük hacimdeki diyaliz tamponu içine bırakılmış ve tampon manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır.

- Bu sistem +4°C' de bir gece dengeye ulaşmaya bırakılmıştır. Diyaliz başlangıcı ve 4 saat sonrası tamponda diyaliz tüpünün görüntüsü Şekil 3.2 a-b' de verilmiştir.

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisinin ve diyalizden alınan diyalizatın proteaz enzim aktivitesi ve protein miktarları belirlenmiştir. Buna göre proteaz enzimi için saflaştırma katsayısı ile saflaştırma verimi hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. a) Diyaliz başlangıcı b) Diyaliz başlangıcından 4 saat sonra diyaliz tüpünün görüntüsü

### 3.2.10 Proteaz enziminin molekül ağırlığının belirlenmesi

Proteaz enziminin molekül ağırlığının belirlenmesi için Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi uygulanmıştır. SDS-PAGE için %12' lik ayırma jeli ve %5' lik yükleme jeli hazırlanmıştır. Jellerin hazırlanışı Çizelge 3.1 ve 3.2' de verilmiştir. Jeller hazırlandıktan sonra elektroforez mandalına yerleştirilmiş ve sızma olmayacak şekilde yerleştirilmiş cam plakaya mikropipet yardımıyla öncelikle %12' lik ayırma jeli dökülmüştür. Jelin üzerine n-bütanol eklenerek polimerizasyon beklenmiştir. Ayırma jeli donduktan sonra jel üzerindeki n-bütanol ortamdan uzaklaştırılmış ve üzerine %5' lik yükleme jeli eklenmiştir. Yükleme

jelinin polimerizasyonu beklenmeden elektroforez tarağı yerleştirilmiş ve polimerizasyonu beklenmiştir. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra tarak dikkatlice çıkarılmış ve örneklerin yüklenmesi işlemine geçilmiştir.

### **3.2.10.1 Örneklerin yüklenmesi**

Proteaz enziminin moleküler ağırlığının belirlenmesi için amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleri sonucunda elde edilen enzim çözeltisi ve standart olarak rekombinant marker (Sigma) kullanılmıştır. Enzim çözeltisinin 10 µl' si aynı miktarda DDT' li yükleme tamponu ile karıştırılarak 1-2 dakika kaynatılmıştır. 1 dakika santrifüj işleminden sonra örnekler kuyulara yüklenmiştir. Daha önce hazırlanmış olan jel elektroforez tankına yerleştirilmiş ve elektroforez tankı yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Örneklerin düzgün bir şekilde ilerlemesi için tanka önce 80 V, daha sonra 120 V akım uygulanmıştır. Yaklaşık 2 saat süren elektroforez işleminden sonra boyama aşamasına geçilmiştir.

### **3.2.10.2 Örneklerin boyanması**

Elektroforez işleminden sonra dikkatlice cam plakalardan ayrılan jel plastik bir kaba alınmış ve markerın olduğu taraftan jel küçük bir parça kesilerek sırası ile % 0,05-0,02-0,002' lik Coomassie Brilliant Blue ile 15' er dakika boyanmıştır. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra fazla boyanın uzaklaştırılması için destek çözeltisine alınarak 1 gece bu çözeltide bekletilmiştir. Proteaz enziminin molekül ağırlığı standart proteinler baz alınarak belirlenmiştir.

### 3.2.11 Proteaz enziminin zymogram analizi

Proteaz enziminin zymogram analizi için 3.2.10' da verilen yönteme göre jeller hazırlanmıştır. Zymogram analizinde %12' lik ayırma jeli %0.1 (w/v) kazein içermektedir. Jeller hazırlandıktan sonra örneklerin yüklenmesi işlemine geçilmiştir. Örneklere herhangi bir denatürasyon işlemi uygulanmamıştır. 10 µl örnek, 10 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Örneklerin düzgün bir şekilde ilerlemesi için tanka önce 80 V, daha sonra 120 V akım uygulanmıştır. +4°C' de yaklaşık 2 saat süren elektroforez işleminden sonra SDS' in uzaklaştırılması amacıyla 1 saat %2,5 Triton X-100 içinde orbital çalkalayıcıda oda ısısında bekletilmiştir. Distile su ile yıkanan jel pH 7 ve 10,5 ile PMSF ve EDTA çözeltilerinde 24 saat bekletilmiştir. Ardından Coomassie Blue ile boyanmıştır. Boyama işleminden sonra jel 1 gece destek tamponda bekletilmiştir.

### 3.2.12 Proteaz enzim çözeltilisinde toplam protein tayini

Enzim örneklerindeki protein miktarı Coomassie Blue boyası bağlama yöntemi ile belirlenmiş ve standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. 1 ml enzim çözeltilisi üzerine 1 ml Coomassie Blue reaktifi ilave edilerek iyice karıştırılmış ve 5 dakikalık bekleme süresini takiben örnek çözeltilisinde oluşan mavi rengin şiddeti 595 nm' de okunmuştur (Sedmak and Grossberg, 1977).

Enzim çözeltilisindeki protein miktarlarını protein standart grafiği oluşturularak aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Protein (mg/ml)} = (\text{OD}_{595}/\text{Eğim}) \times \text{Seyrelme faktörü}$$



### **3.2.12.1 Protein standart grafiğinin hazırlanması**

10 mg BSA 10 ml distile suda çözümlenerek 1 mg/mL olacak şekilde BSA çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiden 1 ml alınmış üzerine 9 ml dH<sub>2</sub>O eklenerek 1/10 oranında seyreltilmiştir. Konsantrasyon duyarlılık sınırı içinde kalan standartlar (5, 10, 15, 20, 25, 30 µg/ml BSA) uygun seyreltmeler yapılarak son hacim 1 ml olacak şekilde hazırlanmışlardır. Hazırlanan 1 ml örnek üzerine 1 ml Coomassie Blue reaktifi ilave edildikten sonra karışımın absorban değeri 595 nm’de okunmuştur.

OD<sub>595</sub>’e karşı BSA konsantrasyonunun (µg/ml) işaretlenmesinden elde edilen standart doğrunun eğimi belirlenerek örneklerdeki protein miktarı hesabında kullanılmıştır. BSA standart doğrusunun grafiğı Ek-B’ de verilmiştir.

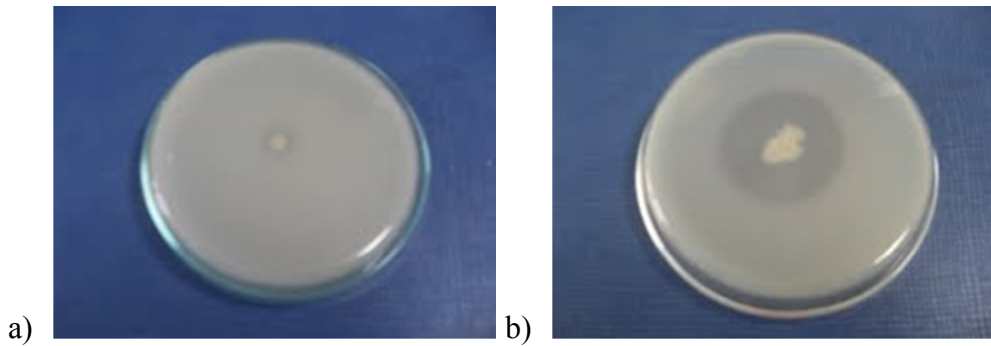
## 4. BULGULAR

### 4.1 İzolasyon Çalışmaları

Uzun süre hidrokarbon türevleri için alıcı ortam olarak kullanılmış alanlardan alınan toprak örnekleri ile yapılan saflaştırma çalışmaları sonucunda farklı morfolojik görünümüne sahip 69 izolat elde edilmiştir.

### 4.2 İzolatların Ekstraselüler Proteaz Enzim Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi

Hidrokarbon ile kirlenmiş farklı istasyonlardan aseptik şartlarda alınan toprak örneklerinden 3.2.1' de belirtilen yöntem kullanılarak saflaştırılan izolatların %10' luk SMA' da ekstraselüler proteaz üretim yetenekleri araştırılmıştır. Bu amaçla bakteriyel izolatların hidroliz zonu değerlendirilmiş ve sonraki çalışmalar kuvvetli proteolitik aktivite gösteren izolatlar ile gerçekleştirilmiştir. İzolatların SMA' da oluşturdukları hidroliz zonlarının çapları Çizelge 4.1' de verilmiştir. Kuvvetli proteolitik aktivite göstermeleri nedeniyle seçilen izolatlar A6, C3 ve D3 izolatlarıdır. Proteolitik aktivite göstermeyen A7 izolatı ile kuvvetli proteolitik aktivite gösteren D3 izolatlarının SMA' da görünüşleri Şekil 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4.1. a) A7 izolatının SMA' da görünümü b) D3 izolatının SMA' da görünümü

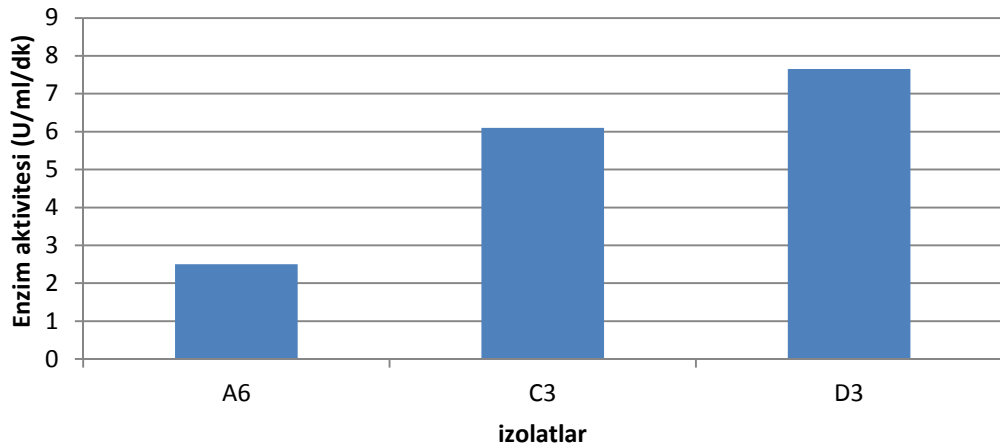
Çizelge 4.1. SMA' da hidrolik zon çapları

İzolot	Zon çapı (mm)	İzolot	Zon çapı (mm)	İzolot	Zon çapı (mm)
A1	-	B5	7.290	C2	29.385
A2	28.365	B6	23.830	C3	35.300
A3	-	B7		C4	27.510
A4	-	B8	-	C5	11.300
A5	31.475	B9	-	C6	-
A6	34.090	B10	-	C7	21.635
A7	-	B11	-	C8	-
A8	18.790	B12	-	D1	31.850
A9	-	B13	-	D2	-
A10	32.700	B14	-	D3	33.160
A11	31.165	B15	-	D4	-
A12	29.850	B16	-	D5	-
A13	31.360	B17	-	D6	-
A14	13.645	B18	-	D7	-
A15	-	B19	-	D8	25.090
A16	-	B20	-	D9	31.060
A17	12.090	B21	7.470	D10	-
A18	-	B22	-	E1	23.535
A19	-	B23	7.550	E2	
B1	29.705	B24	-	E3	

<b>B2</b>	24.015	<b>B25</b>	-	<b>E4</b>	6.820
<b>B3</b>	-	<b>B26</b>	-	<b>E5</b>	30.940
<b>B4</b>	-	<b>C1</b>	-	<b>E6</b>	-

### 4.3 Proteaz Üretimi İçin Etkin İzolatın Seçilmesi

SMA' da yapılan kalitatif tarama çalışmaları sonucunda seçilen 3 izolatın ekstraselüler proteaz aktivitelerinin ölçülmesi için bazal ortamda 35°C' de 18 saat inkübasyona bırakılan kültürlerden santrifüj işlemi ile supernatantlar elde edilmiş ve ekstraselüler proteaz aktivitesi için ham enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. 3.2.4' de verilen yöntemle gerçekleştirilen aktivite tayini sonucunda A6, C3 ve D3 etkin üreticiler olarak seçilmiştir. A6, C3 ve D3 izolatlarının proteaz aktiviteleri Şekil 4.2' de verilmiştir. D3 izolatı diğerlerine kıyasla daha yüksek aktivitede proteaz ürettiği için çalışmaya D3 izolatı ile devam edilmiştir.



**Şekil 4.2.** Kuvvetli proteolitik aktivite gösteren izolatların proteaz aktivitesi (Çalışma koşulları: inkübasyon süresi: 18 sa., inkübasyon sıcaklığı 35°C, inokulum miktarı: %5)

#### 4.4 Seçilen İzolatın Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Seçilen D3 izolatının tanımlaması amacıyla 3.2.6' da belirtilen yöntemler kullanılarak; katalaz, oksidaz ve indol testleri ile Gram boyama yapılmıştır.

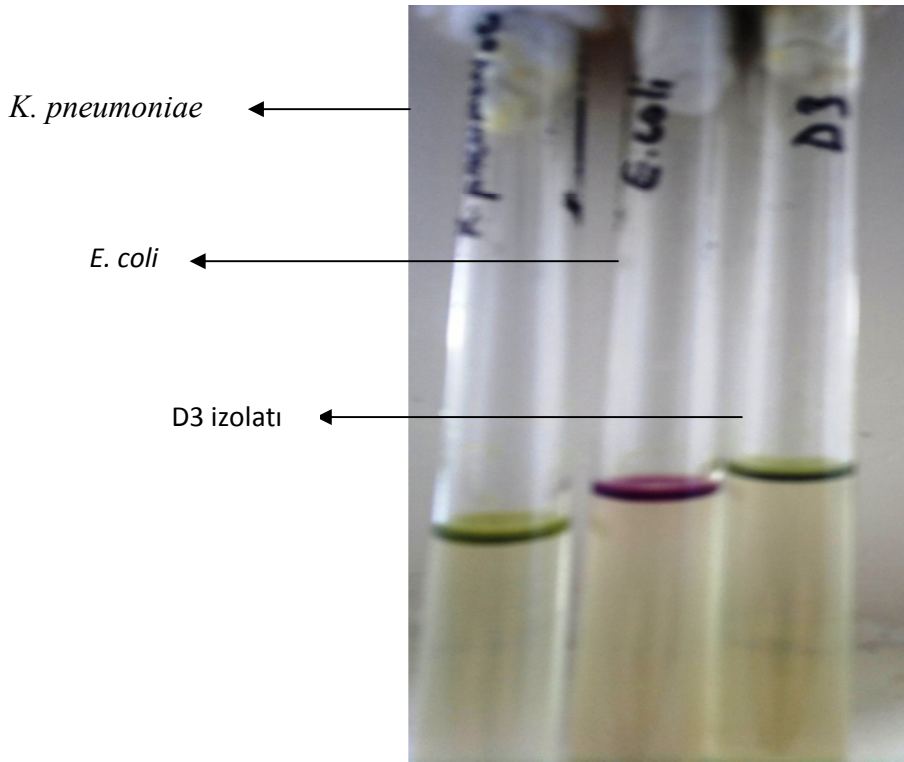
Smith ve Hussey' in belirttiği yönteme göre yapılan Gram boyama sonucunda izolatın Gram (-) özellikte ve basil morfolojisinde olduğu tespit edilmiştir.

Lam üzerindeki saf koloni üzerine %3' lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatıldığında, hava kabarcıklarının çıktığı gözlenmiş ve bu test sonucunda izolatın katalaz pozitif olduğu belirlenmiştir.

Nutrient agarda saf kültürü hazırlanan izolat 35°C' de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresi sonunda saf kültür üzerine % 0,5' lik tetrametil-p-fenilendiaminin çözeltisinden ilave edilmiştir. 1-2 dakikalık bekleme süresi sonunda ortam renginin mavi olduğu gözlenmiş ve izolatın oksidaz pozitif olduğu belirlenmiştir.

Trypton ve NaCl içeren besi ortamına izolatın saf kültüründen aşılama yapılmış ve 37°C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda besiyerine kovaks ayırıcı damlatılmıştır. Besi ortamı yüzeyinde herhangi bir renk değişiminin gözlenmemesi izolatın indol negatif olduğu şeklinde yorumlanmıştır. D3 izolatı ile pozitif kontrol *E. coli* ve negatif kontrol *K. pneumoniae*' nin indol testi görüntüleri Şekil 4.3' te verilmiştir.

Seçilen izolatın tanımlanması amacıyla yapılan testlerin sonuçları Çizelge 4.2' de verilmiştir.



Şekil 4.3. D3 izolatu, *E.coli* ve *K. pneumoniae* için indol testi görüntüsü

Çizelge 4.2. Seçilen D3 izolatının tanımlanması için yapılan testlerin sonuçları

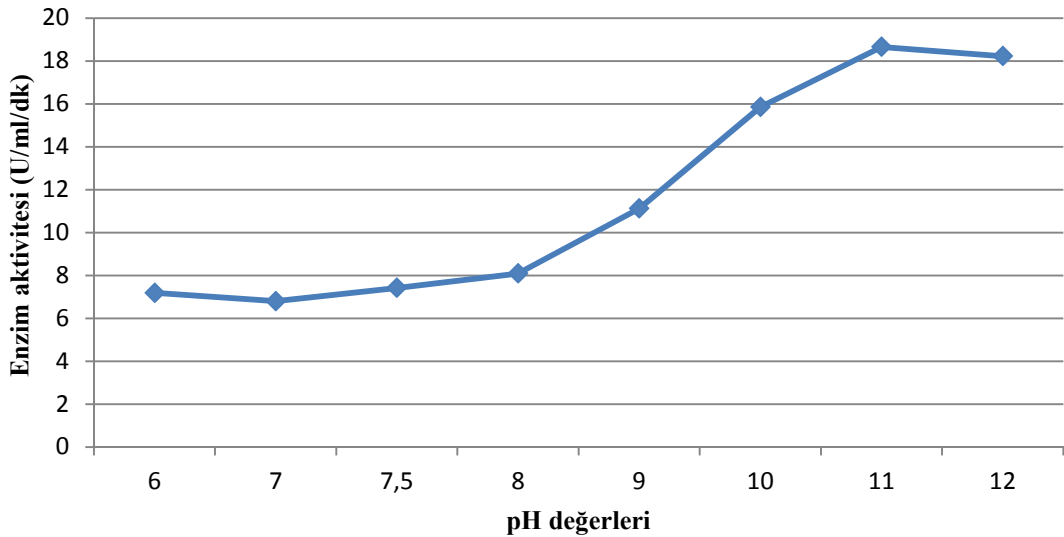
Uygulanan Test	Sonuçları
Gram boyama	Gr (-)
Katalaz Testi	Katalaz (+)
Oksidaz Testi	Oksidaz (+)
Indol Testi	Indol (-)

#### 4.4 Proteaz Üretimi İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi

D3 izolatının ekstraselüler proteaz üretimine, üretim ortamının başlangıç pH değerinin, inokulum miktarının, farklı karbon kaynaklarının, seçilen karbon kaynağının miktarının, farklı azot kaynaklarının, seçilen azot kaynağının miktarının, inkübasyon süresinin ve inkübasyon sıcaklığının etkileri çalışılmıştır. Enzim üretim çalışmaları 250 ml'lik erlenlerde 50 ml besiyeri ortamında gerçekleştirilmiştir.

##### 4.4.1 Üretim ortamının başlangıç pH değerinin proteaz üretimine etkisi

Bu çalışmada üretim ortamının başlangıç pH değerinin proteaz üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacı ile D3 izolatı pH 5, 6, 7, 7,5, 8, 9, 10, 11 ve 12 değerlerindeki tamponlar ile hazırlanan bazal ortamda 35°C' de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kültür süpernatantından 3.2.4' de verilen yöntemle yapılan ölçümlerde en yüksek aktivitenin pH 11' de gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 4.4).

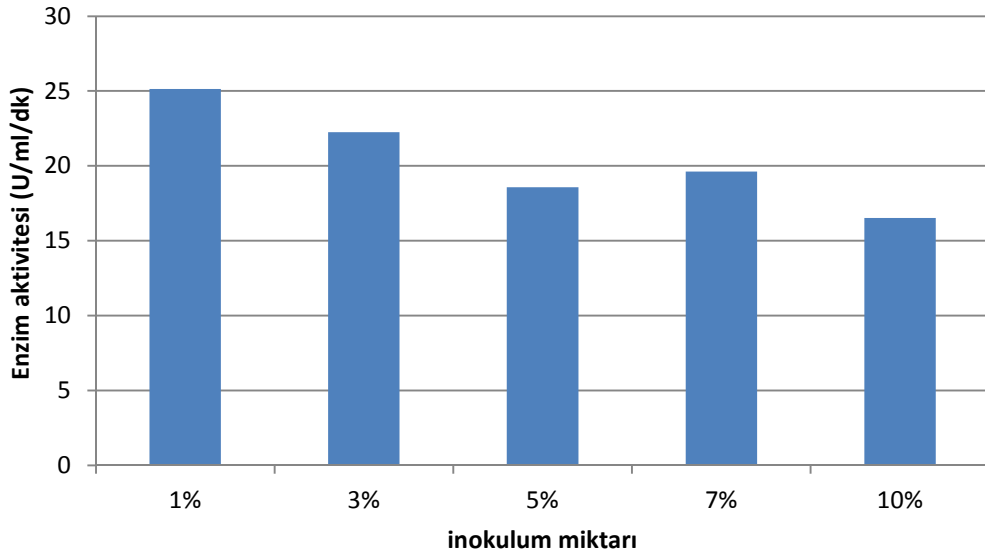


Şekil 4.4. Başlangıç pH değerinin proteaz üretimi üzerine etkisi (Çalışma koşulları: inkübasyon süresi: 18 sa., inkübasyon sıcaklığı 35°C, inokulum miktarı: %5)

Elde edilen Şekil 4.4' te görüldüğü gibi enzim aktiviteleri pH 7,5' tan sonra önemli oranda artış göstermektedir. Elde edilen sonuçlar seçilen D3 izolatu ile üretilen proteaz enziminin alkali koşullarda daha etkili olduğunu göstermektedir. Bu verilere göre üretilen enzimin bir alkalen proteaz olduğu düşünülmektedir.

#### 4.4.2 İnokulum miktarının proteaz üretimine etkisi

Proteaz üretimine inokulum miktarının etkisinin belirlenmesi amacı ile pH 11 tampon ile hazırlanmış bazal ortama değişik oranlarda ( %1-10) izolat inokule edilmiş ve 35°C' de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aktivite tayini sonucunda inokulum miktarı %1 düzeyinde kullanıldığında alkalen proteaz üretiminin en yüksek düzeyde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5).

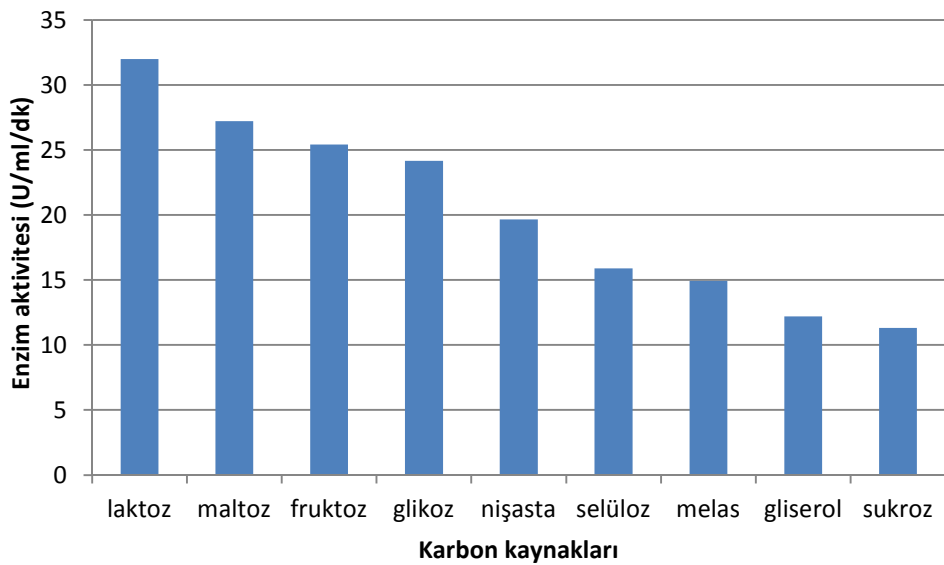


Şekil 4.5. İnokulum miktarının proteaz üretimine etkisi (Çalışma koşulları: inkübasyon süresi: 18 sa., inkübasyon sıcaklığı 35°C)



#### 4.4.3 Karbon kaynaklarının proteaz üretimine etkisi

İzolatin proteaz üretim yeteneği üzerine karbon kaynaklarının etkisinin belirlenmesi amacı ile kullanılan 9 farklı karbon kaynağı arasında (glikoz, laktoz, maltoz, sukroz, selüloz, fruktoz, gliserol, melas ve nişasta) en yüksek aktivite, laktozun kullanıldığı sıvı kültürden elde edilen supernatant ile gözlenmiştir. Laktozdan sonra en yüksek aktiviteye maltoz ve fruktozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı ortamlarda rastlanmıştır. En düşük aktiviteye sukroz ve gliserolün karbon kaynağı olarak kullanıldığı kültür supernatantlarında rastlanmıştır (Şekil 4.6).

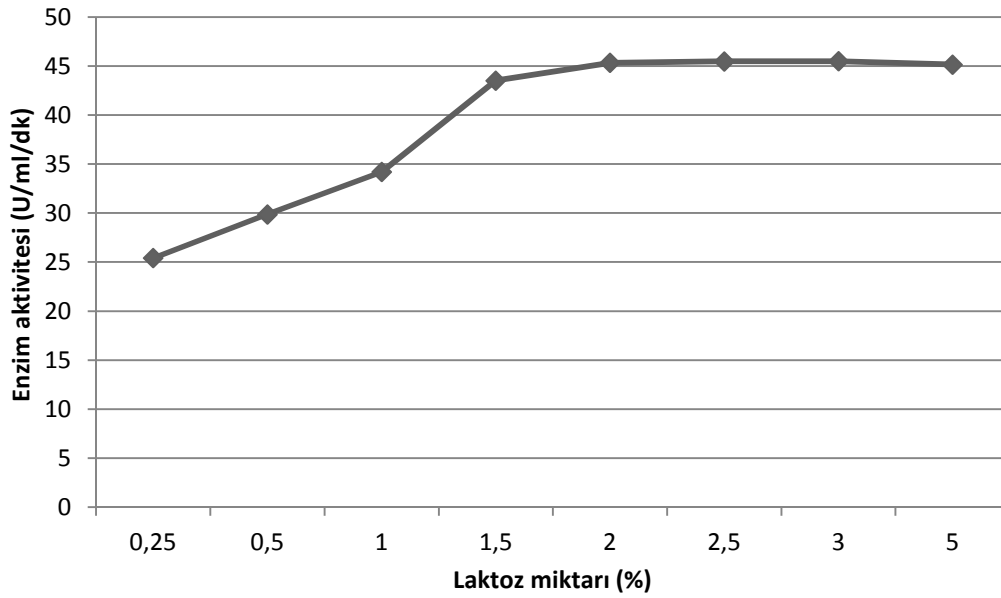


Şekil 4.6. Karbon kaynağının proteaz üretimi üzerine etkisi (Çalışma koşulları: inkübasyon süresi: 18 sa., inkübasyon sıcaklığı 35°C, inokulum miktarı %1)

#### 4.4.4 Karbon kaynağı miktarının proteaz üretimine etkisi

Laktozun farklı miktarlarını içeren kültür ortamlarında inkübasyona bırakılan izolatin proteaz üretim yeteneği değerlendirilmiştir. Şekil 4.7’ de görüldüğü gibi laktozun %2 ve daha sonra artan konsantrasyonlardaki kullanımlarında anlamlı bir fark

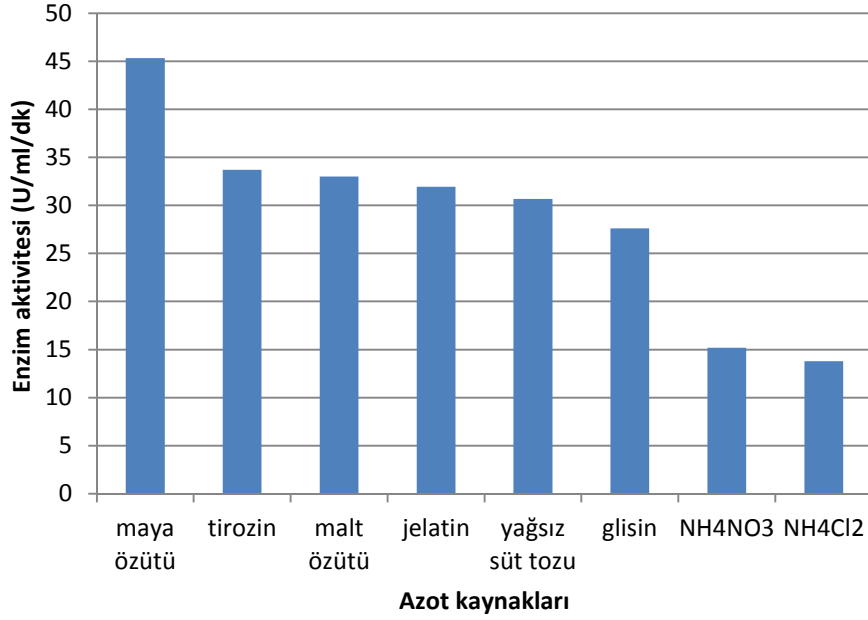
gözlenmemiştir. Bu nedenle çalışmaya %2 oranında laktoz kullanılarak devam edilmiştir.



Şekil 4.7. Karbon kaynağı miktarının proteaz üretimine etkisi (Çalışma koşulları: inkübasyon süresi: 18 sa., inkübasyon sıcaklığı 35°C, inokulum miktarı %1)

#### 4.4.5 Azot kaynaklarının proteaz üretimine etkisi

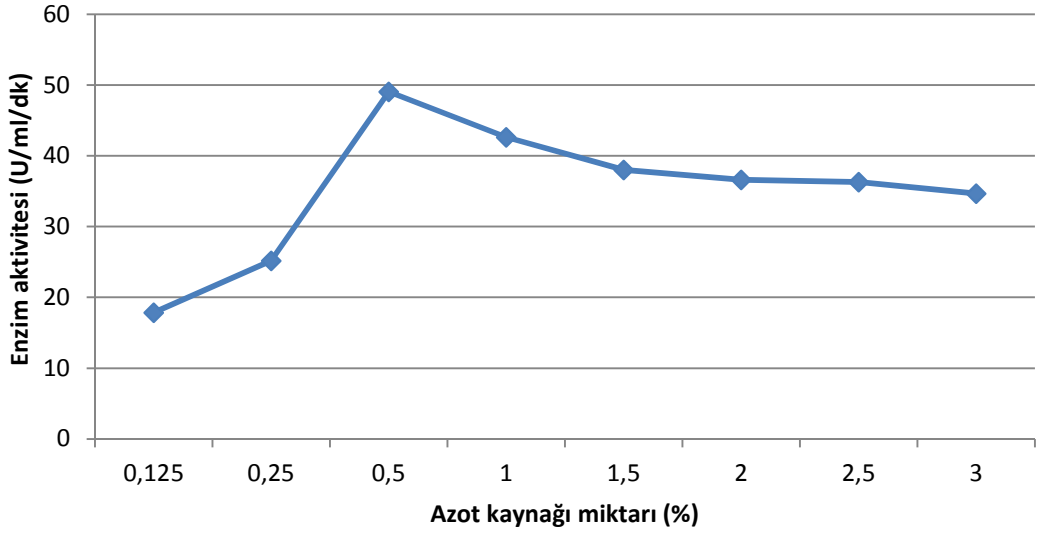
Organik ve inorganik azot kaynaklarının kullanıldığı proteaz üretim çalışmalarında inorganik azot kaynaklarının izolatin enzim üretim yeteneğinde düşüşe neden olduğu gözlenmiştir. Organik azot kaynakları arasında en yüksek enzim aktivitesinin maya özütü kullanıldığında olduğu saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.8' de verilmiştir.



**Şekil 4.8.** Azotkaynağının proteaz üretimine etkisi (Çalışma koşulları: inkübasyon süresi: 18 sa., inkübasyon sıcaklığı 35°C, inokulum miktarı %1)

#### 4.4.6 Azot kaynağı miktarının proteaz üretimine etkisi

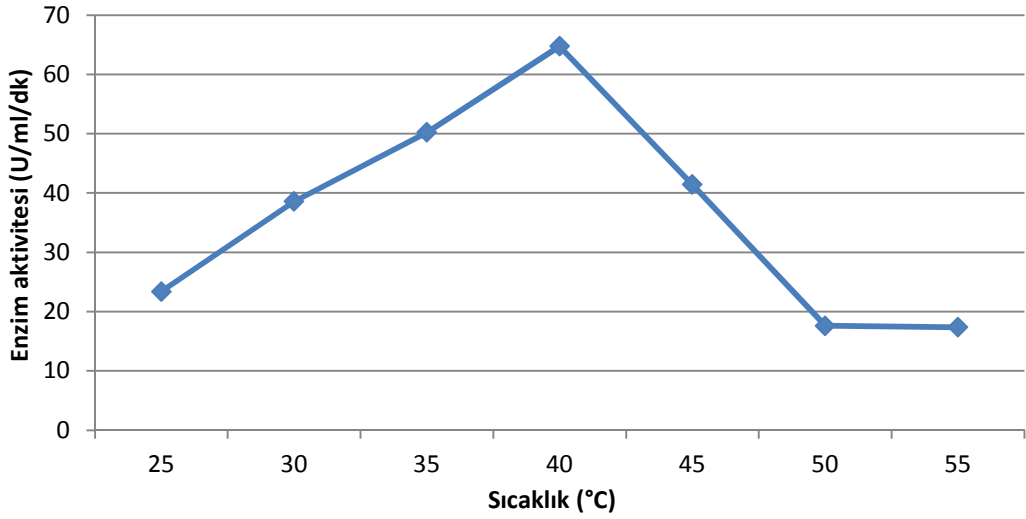
Azot kaynağı miktarının proteaz üretimine etkisinin belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmada en uygun miktar %0,5 olarak bulunmuştur. Çalışma sonuçları Şekil 4.9' da verilmiştir.



**Şekil 4.9.** Azot kaynağı miktarının proteaz üretimine etkisi (Çalışma koşulları: inkübasyon süresi: 18 sa., inkübasyon sıcaklığı 35°C, inokulum miktarı %1)

#### 4.4.7 İnkübasyon sıcaklığının proteaz üretimine etkisi

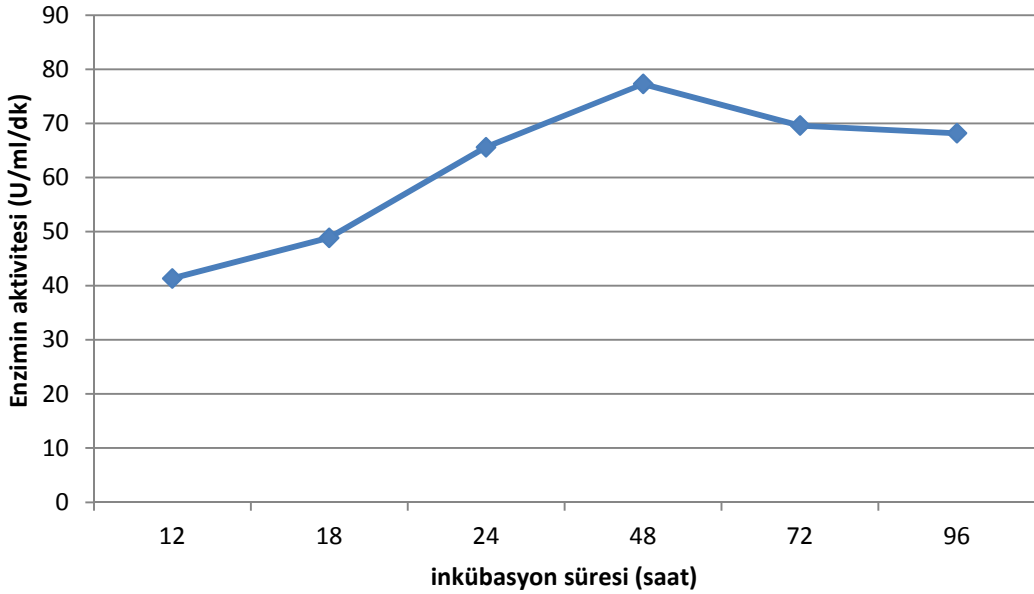
Seçilen D3 izolatının alkalin proteaz üretimine etkisinin belirlenmesi amacıyla optimum koşullarda hazırlanan kültür ortamı 25-55° C arası değişen sıcaklıklarda 18 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. 40° C' ye kadar enzim üretiminin arttığı, 45° C' den sonra enzim üretiminde düşüş olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** İnkübasyon sıcaklığının proteaz üretimine etkisi (Çalışma koşulları: inkübasyon süresi: 18 sa, inokulum miktarı: %1)

#### 4.4.8 İnkübasyon süresinin proteaz üretimine etkisi

İnkübasyon süresinin D3 izolatının proteaz üretimine etkisinin belirlenmesi amacıyla optimum koşullarda hazırlanan kültür ortamı 35°C’ de 12-96 saat arasında inkübasyona bırakılmıştır. En yüksek enzim aktivitesi 48 saat sonunda yapılan ölçümlerde gözlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. İnkübasyon süresinin proteaz üretimine etkisi (Çalışma koşulları: inkübasyon sıcaklığı: 35°C, inokulum miktarı: %1)

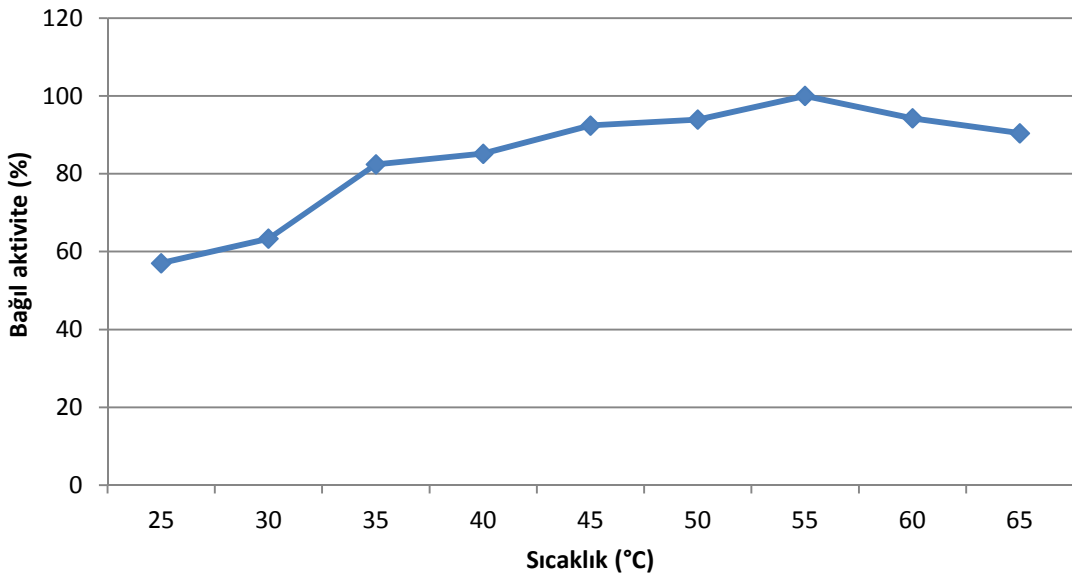
#### 4.5 Üretilen Proteaz Enziminin Karakterizasyonu

Belirlenen optimum koşullarda hazırlanmış kültür ortamında 35°C’ de 48 saatlik inkübasyon sonunda D3 izolatı tarafından üretilen alkalen proteaz enziminin karakteristik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla enzimin optimum reaksiyon sıcaklığı ve pH değeri, termostabilitesi ve pH stabilitesi belirlenmiş, çeşitli inhibitörlerin, denatürantların ve ağır metallerin enzimatik aktiviteye etkileri araştırılmıştır.

##### 4.5.1 Proteaz enziminin optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi

Enzimin optimum reaksiyon sıcaklığı % 0,6’ lık kazein çözeltisi ile 25 ve 65°C arasındaki sıcaklık değerlerinde 20 dakika inkübasyona bırakılarak belirlenmiştir. D3 izolatının ürettiği proteaz enziminin aktivitesinde 25-55°C arasında düzenli bir artış gözlenirken, 55°C’ nin üzerindeki sıcaklık değerlerinde enzim aktivitesinde düşüş

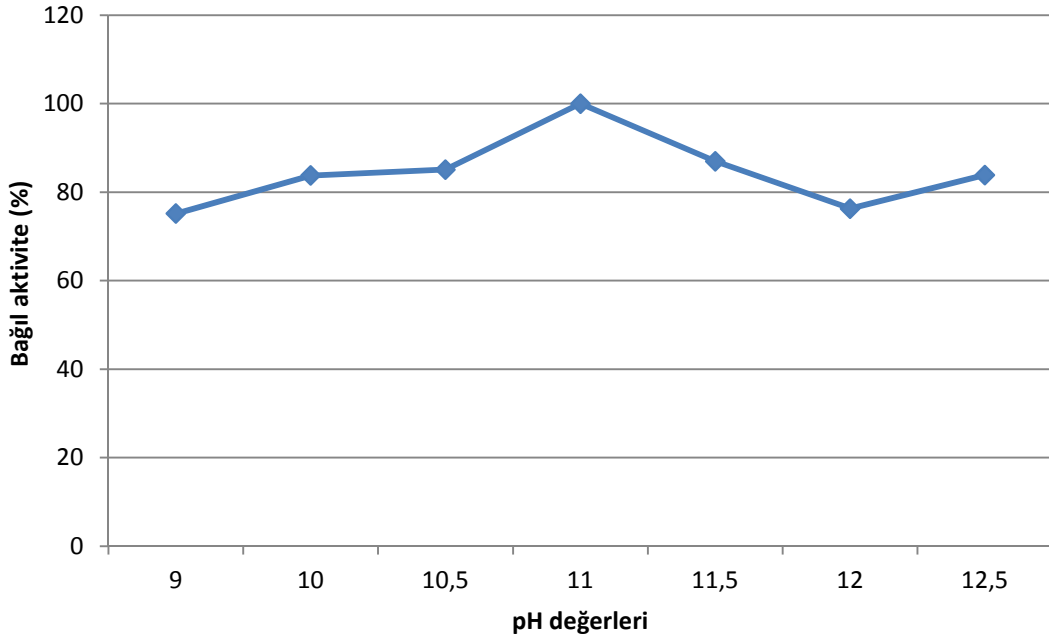
olduğu tespit edilmiştir. Optimum reaksiyon sıcaklığı 55°C olarak belirlenmiştir. en yüksek sıcaklık değerinde ölçülen enzim aktivitesi 100 kabul edilerek yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen bağıl aktiviteler Şekil 4.12' de verilmiştir.



**Şekil 4.12.** Proteaz enziminin optimum reaksiyon sıcaklığı (Çalışma koşulları: reaksiyon pH değeri: 10,5, reaksiyon süresi: 20 dk)

#### 4.5.2 Proteaz enziminin optimum reaksiyon pH değerinin belirlenmesi

pH 8-12 aralığı için 50mM, glisin-NaOH-NaCl ve pH 12,5 için 200mM glisin-NaOH-NaCl tampon çözeltilerinin kullanıldığı çalışmada optimum pH değeri 11 olarak belirlenmiştir. En yüksek aktiviteyi gösteren pH değerinin 100 kabul edildiği çalışmada diğer pH değerlerinde elde edilen enzim aktiviteleri Şekil 4.13' te verilmiştir.

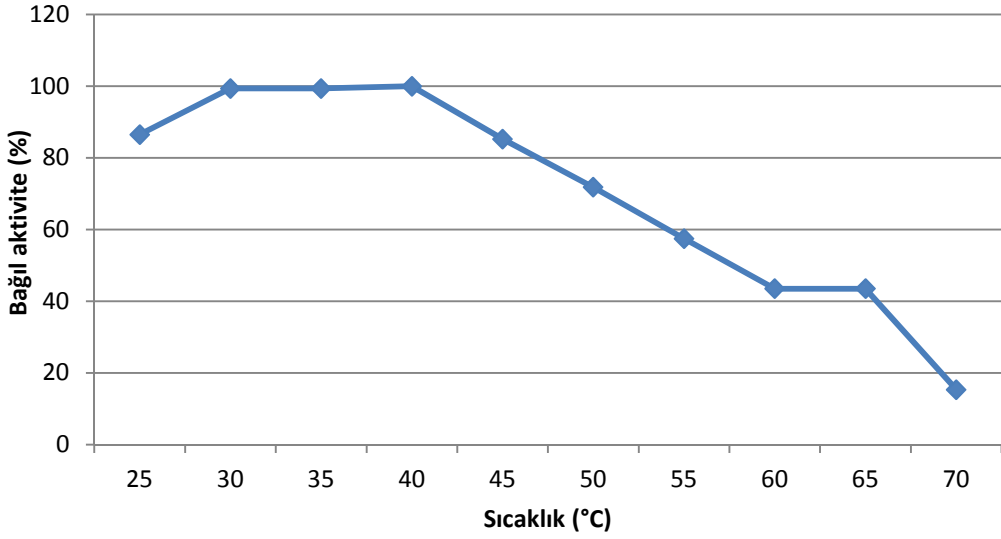


**Şekil 4.13.** Proteaz enziminin optimum reaksiyon pH değeri (Çalışma koşulları: reaksiyon sıcaklığı: 30°C, reaksiyon süresi: 20 dk)

#### 4.5.3 Proteaz enziminin termostabilitesinin belirlenmesi

D3 izolatından elde edilen supernatant 25 ve 70°C arasındaki sıcaklık değerlerinde 1 saat süre ile ön inkübasyona bırakılmıştır. En yüksek aktivitenin gözleendiği sıcaklık değerindeki aktivite 100 kabul edilerek diğer sıcaklık değerlerinde elde edilen enzim aktiviteleri bağıl olarak hesaplanmıştır. 45, 50, 55 ve 60°C’ de sırası ile %14,77, %28,19, %42,52, %56,5 aktivite kaybı gözlenmiştir. 70°C’ de aktivitenin büyük ölçüde kaybolduğu tespit edilmiştir. Enzimin sıcaklık stabilitesi incelendiğinde 30, 35 ve 40°C’ de aktivitesini koruduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.14’ te verilmiştir.

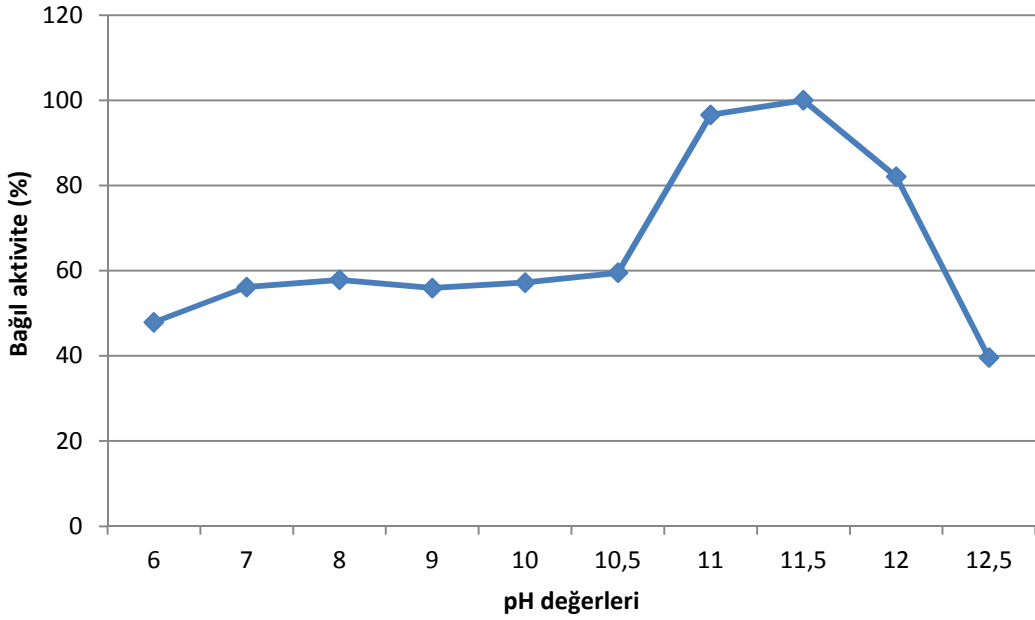




**Şekil 4.14.** Proteaz enziminin termostabilitesi (Çalışma koşulları: reaksiyon sıcaklığı: 30°C, reaksiyon pH değeri: 10,5, reaksiyon süresi: 20 dk)

#### 4.5.4 Proteaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi

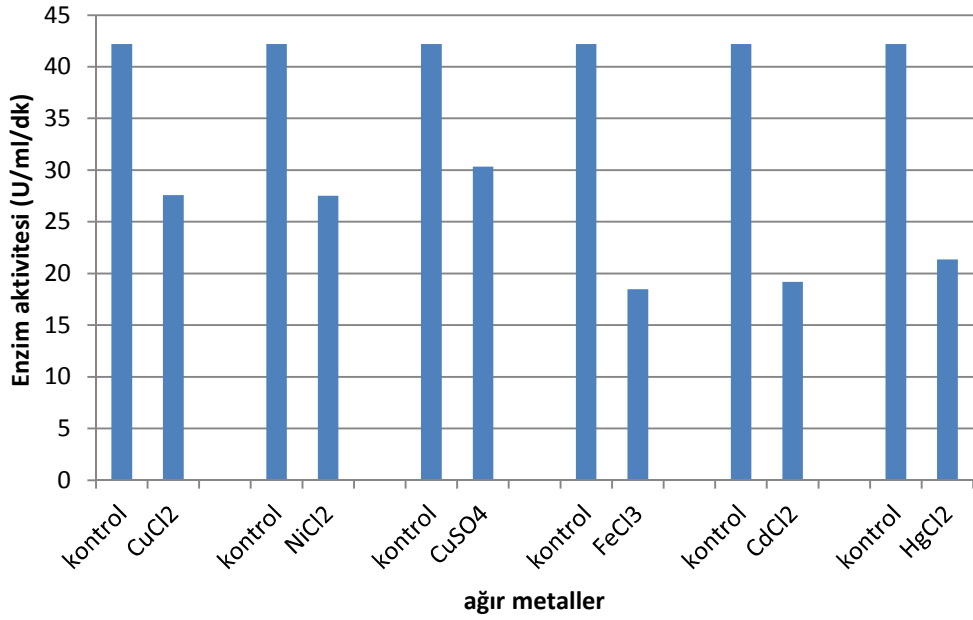
pH 6 ve 12,5 arasındaki değerlere sahip tampon çözeltileri ile karıştırılarak ve 1 saat süre ile ön inkübasyona bırakılan supernatantın pH stabilitesi incelenmiştir. En yüksek aktivitenin gözlemlendiği pH değeri 100 kabul edilerek diğer pH değerleri için bağıl aktiviteler hesaplanmıştır. Seçilen D3 izolatından elde edilen enzimin pH 7-10,5 arasında 1 saat stabilitesini koruduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.14' te verilmiştir.



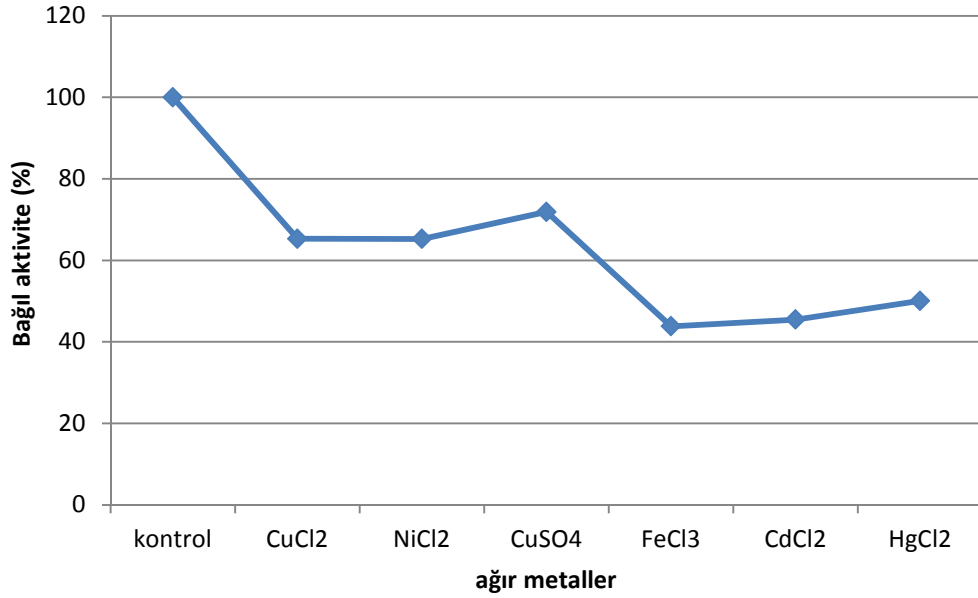
**Şekil 4.15.** Proteaz enziminin pH stabilitesi (Çalışma koşulları: reaksiyon sıcaklığı: 30°C, reaksiyon pH değeri: 10,5, reaksiyon süresi: 20 dk)

#### 4.5.5 Ağır metallerin proteaz aktivitesi üzerine etkisi

Proteaz aktivitesi üzerine  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{NiCl}$  ve  $\text{HgCl}$  metal iyonlarının etkisinin incelendiği çalışmada bütün metal iyonlarının aktivite üzerinde negatif etkisi olduğu gözlenmiştir. Her metal iyonu için aktivite sonuçları metal iyonu içermeyen kontrolle birlikte Şekil 4.16’ da verilmiştir. Ayrıca metal iyonu içermeyen kontrolün 100 kabul edilerek hesaplandığı bağıl aktivite değerleri Şekil 4.17’ de belirtilmiştir.



**Şekil 4.16.** Ağır metallerin proteaz enzimi üzerine etkisi (Çalışma koşulları: reaksiyon sıcaklığı: 30°C, reaksiyon pH değeri: 10,5, reaksiyon süresi: 20 dk)



**Şekil 4.17.** Ağır metallerin proteaz enzimi üzerine etkisi (Çalışma koşulları: reaksiyon sıcaklığı: 30°C, reaksiyon pH değeri: 10,5, reaksiyon süresi: 20 dk)

#### 4.5.6 Çeşitli denatürantların proteaz aktivitesi üzerine etkisi

D3 izolatının proteaz aktivitesi üzerine reaksiyon karışımına son konsantrasyonu 0,5 mM olacak şekilde eklenen ürenin çok fazla bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. 1,0 ve 5,0 mM üre alkalin proteaz enzimin aktivitesini sırasıyla % 5,76 ve % 18,89 oranında inhibe etmiştir. SDS ile yapılan çalışmalar sonucunda ise son konsantrasyon 0,5 mM ve 1,0 mM olacak şekilde reaksiyon karışımına SDS' in sırası ile enzim aktivitesini % 35,64 ve 67,02 oranında arttırdığı gözlenmiştir. Kontrolün 100 kabul edilerek hesaplandığı bağıl aktivite sonuçları Çizelge 4.3' te verilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Çeşitli denatürantların proteaz aktivitesi üzerine etkisi

Bağıl aktivite (%)	
kontrol	100
0.5 mM üre	99.13
1.0 mM üre	94.24
5.0 mM üre	81.01
0.5 mM SDS	135.64
1.0 mM SDS	167.02

#### **4.6 Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması**

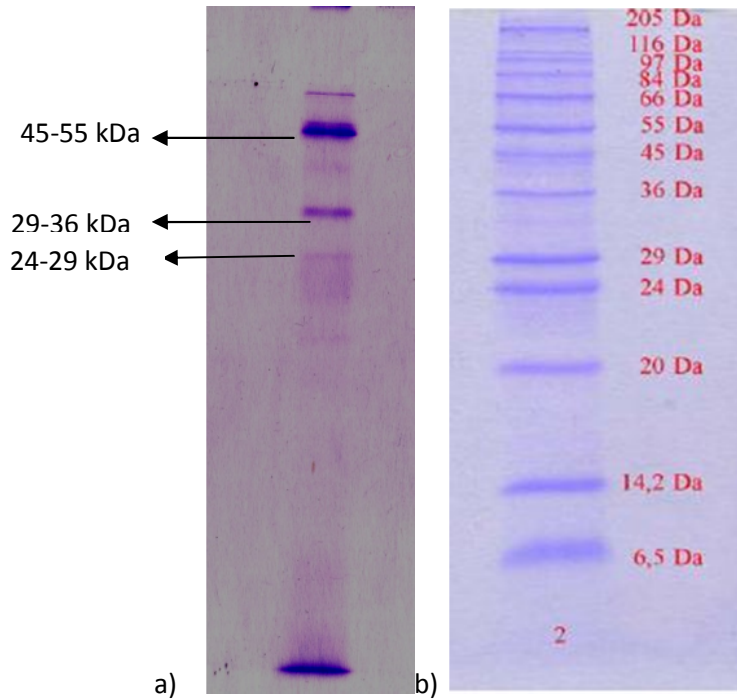
D3 izolatından elde edilen proteaz enzimi amonyum sülfat ile çöktürülmüş ve çöktürme işleminden sonra protein çözeltilerinden tuzların uzaklaştırılması amacıyla diyaliz işlemi uygulanmıştır. Ham enzim ile kısmi saflaştırılan enzimin aktivite ve protein miktarları Çizelge 4.4' te verilmiştir.

**Çizelge 4.4.** Ham enzim ile kısmi saflaştırma sonrası enzimin aktivite ve protein miktarlarının karşılaştırılması

Örnek ferm.	Hacim (ml)	Protein(mg/ml)	ToplamProtein (mg)	Aktivite (U/ml/min)	Toplam aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma katsayısı
Ham enzim	750	0,22	165	78,30	58725	355,9	100	1
Amonyum sülfat presipitasyonu ve Diyaliz sonrası	17	1,2735	21,64	731,61	12432	574,49	21	1,61

#### 4.7 Proteaz Enziminin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

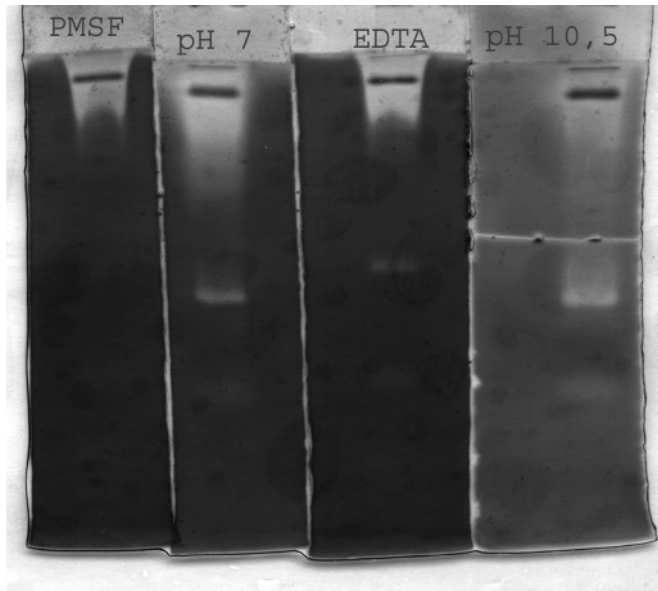
Proteaz enziminin molekül ağırlığının belirlenmesi için SDS-PAGE yöntemi uygulanmıştır. %12' lik ayırma jeli ve %5' lik yükleme jellerinin kullanıldığı yöntemde kısmi olarak saflaştırılmış enzim ve rekombinant proteinden oluşan marker yüklenmiştir. 2 saat süren yürütme işlemi sonucunda bantlar Coomassie Brilliant Blue ile boyanmıştır. Örnek marker ile karşılaştırıldığında 45-55 kDa, 29-36 kDa ve 24-29 kDa arasında olmak üzere 3 bant olduğu görülmektedir. Boyama işlemi sonucunda görüntülenen bantlar Şekil 4.18' de verilmiştir.



**Şekil 4.18. a)** Proteaz enziminin SDS-PAGE analizi **b)** rekombinant marker

#### 4.8 Proteaz Enziminin Zymogram Analizi

Zymogram analizinde %0,1 kazein içeren %12' lik ayırma jeli ve %5' lik yükleme jeli kullanılmıştır. Herhangi bir denatürasyona tabi tutulmayan örnekler yürütme işlemi sonucunda EDTA ve PMSF içeren çözeltilerde bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda boyama işlemine tabi tutulan örneğin bant görüntüleri Şekil 4.19' da verilmiştir.



Şekil 4.19. Proteaz enziminin zymogram analiz sonuçları EDTA ve PMSF varlığında



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Proteazlar, substrat ya da ürün çözünürlüğünü arttırdığı ve ürün geri dönüşümünü kolaylaştırdığı için genellikle susuz ortamlarda kullanılmaktadırlar. Ayrıca sulu ortamların peptid sentezi gibi reaksiyonlar için termodinamik açıdan uygun olmaması gibi nedenlerden dolayı bu tür reaksiyonlarda susuz ortamlar tercih edilmektedir. Bu nedenle susuz çözücü sistemlerinde proteolitik aktivite gösterebilen mikroorganizmalar endüstriyel uygulamalar için önemli kaynaklar haline gelmiştir ve son yıllarda organik çözücülerin varlığında stabilitesini koruyabilen mikroorganizmalar üzerine araştırmalar önem kazanmıştır (Geok et al., 2003). Organik çözücüler önemli ve tehlikeli kirleticiler olarak doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Karbon kaynağı toleransı yüksek olan mikroorganizmalar hidrokarbon yapısındaki kirleticileri karbon kaynağı olarak kullanmaktadır ve bu tür kirleticilerin bulunduğu topraklarda bazı mikroorganizma popülasyonlarında artış gözlenmektedir (Labud et al., 2006). Ayrıca Margesin ve arkadaşlarının (2000) yaptıkları bir çalışmada hidrokarbonların mikrobiyal proteaz aktivitesinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, hidrokarbon ile kirlenmiş topraklardan izole edilen bazı bakterilerin ekstraselüler proteaz üretim yetenekleri belirlenmiştir. Skim Milk Agarda yapılan tarama çalışmaları sonucunda en geniş hidroliz zonu gösteren A6, C3 ve D3 izolatlarının Anson yöntemi ile proteaz aktivite tayinleri yapılmıştır. En yüksek aktiviteyi gösteren izolatin enzim aktivitesinin artırılması amacı ile kültür koşulları optimize edilmiş ve enzimin sıcaklık ve pH profili çıkarılmış, çeşitli inhibitörlere, ağır metallere ve denatüranlara karşı dirençliliği, molekül ağırlığı gibi özellikleri belirlenmiştir.

A6, C3 ve D3 izolatları arasında en yüksek proteaz aktivitesi D3 izolatında gözlenmiştir. Seçilen izolatin optimum başlangıç pH değeri 11 olarak bulunmuştur. Ahmed ve ark. (2010)' in *Bacillus subtilis* ile yaptıkları bir çalışmada alkalin proteaz üretimi için optimum pH değerinin 11 olduğu rapor edilmiştir. Cheetham (1995), Muderrizadi ve ark. (2001) ve Kumar (2002)' in ayrı ayrı yaptıkları çalışmalarda

*Bacillus sp.*' den alkalen proteaz üretimi için optimum pH değerinin 11,5 olduğu bildirilmiştir. *Stenotrophomonas maltophilia* ile yapılan bir başka çalışmada pH 9' da optimum alkalen proteaz üretimi olduğu gözlenmiştir (Kuddus and Ramteke, 2011). Thangam and Rajkumar (2002), *Alcaligenes faecalis* ile proteaz üretimini alkali koşullarda gerçekleştirdiklerini rapor etmişlerdir. *Bacillus amovivorus* ile yapılan bir çalışmada biyokütle miktarının ortam pH değeri 7 olduğunda en yüksek olduğu gözlenirken, en yüksek proteaz üretiminin alkali pH değerinde (pH 8,5) gerçekleştiği bildirilmiştir (Sharmin et al., 2005).

Elde edilen sonuçlara göre D3 izolatu tarafından üretilen proteaz enziminin alkalen karakterde bir enzim olduğu söylenebilir. Alkalen proteazlar genellikle *Bacillus* cinsi gibi Gram (+) bakteriler tarafından üretilseler de *Pseudomonas aeruginosa* (Moriyama, 1963); *Pseudomonas maltophilia* (Kobayashi et al., 1985); *Pseudomonas sp.* strain B45 (Chakraborty and Srinivasan, 1993), *Xanthomonas maltophilia* (Debette, 1991), *Vibrio alginolyticus* (Deane et al., 1987) ve *Vibrio metschnikovii* RH530 (Kwon et al., 1994) gibi Gram (-) bakteriler tarafından üretildiği de rapor edilmiştir.

D3 izolatının optimum inokulum miktarının alkalen proteaz üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmalarda en yüksek alkalen proteaz üretimi %1' lik inokulasyon sonucunda bulunmuş, inokulasyon oranındaki artışın izolatın enzim üretim yeteneğinde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. *Bacillus licheniformis* ile yaptıkları alkalen proteaz üretim çalışmasında optimum inokulum miktarını % 2 olarak belirleyen Nadeem ve arkadaşları inokulasyon konsantrasyonu arttığında nutrientlerin hızlıca tüketildiğini ve büyüme ile alkalen proteaz üretiminde azalış olduğunu belirtmişlerdir. Shafee ve arkadaşları *Bacillus cereus* 146 suşu ile yaptıkları çalışmada düşük inokulum miktarları ile proteaz üretiminde artış gözlendiğini rapor etmişlerdir (Shafee et al., 2005). Nadeem ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada *B. subtilis* PCSIR-5 ile alkalen proteaz üretiminde optimum inokulum miktarı % 10 bulunmuştur. Tüm bu sonuçlar dikkate alındığında inokulum miktarının hücre büyümesinde ve proteaz üretiminde oldukça önemli bir etkisi olduğu ve bu etkinin suşların karakteristikleri ile yakından ilişkili olduğu söylenebilir.

Enzim üretiminin optimizasyonu amacı ile denenen 9 farklı karbon kaynağı arasında en iyi sonuç laktoz ile gözlenmiştir. Toprakta izole edilen bir bakteri türünün alkalin proteaz üretiminde maltozun düşük üretime neden olduğunu belirten çalışmanın aksine çalışmamızda laktozdan sonra en yüksek aktivite maltoz ile gözlenmiştir (Bhatiya and Jadeja, 2010). En düşük enzim aktivitesinin karbon kaynağı olarak gliserol ve sukrozun kullanıldığı fermentasyon ortamlarında gözlemlendiği çalışmamızda D3 izolatının alkalin proteaz üretim yeteneği üzerine farklı karbon kaynaklarının etkilerinin farklı olduğu tespit edilmiştir. Yine topraktan izole edilen *Bacillus sp.* suşları ile yapılan bir çalışmada gliserol ile en düşük alkalin proteaz aktivitesinin tespit edilmesi çalışmamızı destekler niteliktedir (Sevinç, 2010). Naidu ve Devi (2005)' nin araştırmalarına göre ise *Bacillus* cinsinde proteaz üretiminde en uygun karbon kaynaklarının laktoz, nişasta ve sukroz olduğu saptanmıştır. Banerjee ve çalışma arkadaşları (1999) *Bacillus brevis* ile proteaz üretiminde en uygun karbon kaynağını laktoz olarak belirlemişlerdir. *Bacillus cereus* CA 17 suşu için laktoz ve sukroz varlığında proteaz aktivitesinde düşüş gözlemlendiği rapor edilmiştir (Uyar vd., 2011). Gessesse ve Gashe (1997)' nin yaptıkları bir başka çalışmada ise glikoz ve sukroz en uygun karbon kaynakları olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda D3 izolatının alkalin proteaz üretim yeteneğini arttırmak için laktozun farklı miktarları denenmiştir. Laktozun %2' lik konsantrasyonuna kadar alkalin proteaz üretiminde düzenli bir artış gözlenirken, %2 ile %5' lik konsantrasyon aralığında çok büyük farklar gözlenmemiştir. Endüstriyel ölçekte üretim düşünüldüğünde maliyet açısından %2' lik miktarın daha ekonomik olacağı göz önünde bulundurularak çalışmaya %2 oranında laktoz ile devam edilmiştir.

D3 izolatının alkalin proteaz üretimi üzerine etkisini belirlemek için farklı azot kaynakları taranmıştır. Bu taramalar sonucunda en düşük enzim aktivitesine inorganik azot kaynakları olan  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ve  $\text{NH}_4\text{Cl}_2$  ile gözlenmiştir. İzolatın en yüksek enzim aktivitesi maya özütü ile tespit edilmiştir. Mikrobiyal ürünlerin üretiminde organik azot kaynaklarının inorganik azot kaynaklarına göre daha etkili olduğu belirtilmiştir (Shaheen et al., 2008). Sangethaa ve arkadaşları (2008) *Bacillus pumilus* SG2 ile

yaptıkları proteaz üretimi çalışmalarında maya özütünü en iyi azot kaynağı olarak belirlemişlerdir.

İnkübasyon sıcaklığının optimizasyonu amacıyla yapılan çalışmalarda D3 izolatının 35°C’ de en yüksek enzim aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Quadar ve arkadaşları *Bacillus sp.* PCSIR EA-3 izolatı ile en yüksek proteaz aktivitesini 35°C’ de tespit etmişlerdir (Quadar et al., 2009). Entomopatojenik bir fungus olan *Metarhizium anisopliae* ile yapılan proteaz üretim çalışmalarında kültür ortamı için optimum sıcaklığın 35°C olduğu belirtilmiştir (Ali et al., 2011).

İnkübasyon süresinin enzim üretimine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda 48 saatlik inkübasyon sonunda alkalen proteaz biyosentezinin maksimum olduğu gözlenirken, 72 saatten sonra enzim biyosentezinde düşüş tespit edilmiştir. Mahmoud ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *B. sphaericus* B-5 ve *B. subtilis* B-6 için optimum inkübasyon süresini 48 saat olarak belirtmişlerdir (Mahmoud et al., 2005). *Bacillus sp.* PCSIR EA-3 ile yapılan bir başka çalışmada 48 saatlik inkübasyon sonunda maksimum alkalen proteaz aktivitesi belirlenirken, 72 saatten sonra enzim üretiminde düşüş gözlemlendiği rapor edilmiştir (Quadar et al., 2009).

Optimizasyon çalışmaları sonucunda tespit edilen koşullarda üretimi gerçekleştirilen enzimin aktivitesi üzerine sıcaklık, pH, çeşitli metal iyonları ve denatürantların etkileri araştırılmıştır. Çalışmalar sonucunda D3 izolatı tarafından üretilen alkalen proteaz enzimi için optimum reaksiyon sıcaklığı 55°C ve optimum pH 11 olarak belirlenmiştir. Ayrıca enzimin 65°C’ de aktifliğini koruması enzimin termostabil karakterde olduğunu göstermiştir. Shaheen ve ark. (2008), *Bacillus subtilis* tarafından üretilen proteazın 50°C ve pH 11’ de en yüksek aktiviteyi gösterdiğini belirtirken, Joo ve ark. (2002) *Bacillus horikoshii*’ nin ürettiği proteaz için optimum reaksiyon sıcaklığının 50°C ve optimum reaksiyon pH değerinin 9 olduğunu bildirmişlerdir. Yine bir *Bacillus* proteazının pH 10,5 ve 40°C’ de en yüksek aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Mehrotra et al., 1999).

D3 izolatından izole edilen enzimin alkalen pH değerlerinde aktivitesini koruyabilmesi ve termostabil karakterde olması, enzimin endüstride kullanılabilirliği

için önemli avantajlar sağlamaktadır. Özellikle deterjan endüstrisinde yaygın olarak kullanılan proteazların yüksek sıcaklıkta ve alkalin ortamlarda kararlılıklarını koruyabilmeleri istenmektedir (Rao et al., 1998).

Ağır metallerin alkalin proteaz üzerine etkisi incelendiğinde denenen bütün metal iyonlarının enzim aktivitesinde düşüşe neden olduğu gözlenmiştir. *Streptomyces clavuligerus* suş Mit-1 alkalin proteazında  $Cd^{+2}$  iyonlarıyla enzim aktivitesinde bir artış gözlenirken (Thumar and Singh, 2007) bizim çalışmamızda en yüksek inhibisyon etkisi  $CdCl_2$  ve  $FeCl_3$  ile gözlenmiştir.  $CuSO_4$  varlığında enzimin aktivitesini %71 oranında koruduğu tespit edilmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde Fincan ve Okumuş (2007), *Bacillus* sp.'den elde ettikleri enzimin  $Cu^{+2}$  varlığında aktivitesini kaybetmediğini belirtirken, *Streptomyces* proteazı ile yapılan bir çalışmada  $Cu^{+2}$  ile enzimin aktivitesini % 46 kaybettiği belirtilmiştir (Azeredo et al., 2004). Çalışmamızda  $NiCl_2$  ve  $CuCl_2$ ' un enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin hemen hemen aynı olduğu gözlenmiştir.

Çeşitli denatürantların alkalin proteaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için değişik konsantrasyonlarda üre ve SDS enzim reaksiyon ortamına eklenmiş ve inkübasyon sonunda denatürant içermeyen kontrole karşı bağıl aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 0,5 mM üre enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir etki göstermezken, 1,0 ve 5,0 mM üre, enzim aktivitesinde sırası ile %6 ve %19' luk bir azalmaya neden olmuştur. *Bacillus brevis* ile yapılan alkalin proteazın karakterizasyonu çalışmalarında enzimin üre varlığında aktivitesini %95 koruduğu bildirilmiştir (Bnaerjee et al., 1999). Bir başka çalışmada *Geobacillus* sp. YMTC 1049' den elde edilen termostabil proteazın 4-6 M üre varlığında aktivitesinde hafif bir artış meydana geldiği rapor edilmiştir (Zhu et al., 2007). %5' lik SDS varlığında *Bacillus cereus* CA15 suşunun ürettiği alkalin proteaz enziminin aktivitesini %75 koruduğu bildirilirken (Uyar ve ark., 2011), çalışmamızda SDS varlığında enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir. 0,5 mM ve 1,0 mM son konsantrasyon olacak şekilde reaksiyon ortamına eklenen SDS sırası ile %35 ve %67 oranında bir artış sağlamıştır. Enzimin denatürantlar varlığında aktivitesini yüksek oranda koruması D3 izolatu tarafından üretilen enzimin endüstriyel uygulamalarda kullanılması açısından önem

taşımaktadır. Özellikle SDS varlığında enzim aktivitesinde artış gözlenmesi enzimin deterjan katkı maddesi olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleri sonrasında enzimin spesifik aktivitesinde 1,61 kat bir artış olduğu gözlenmiştir. Enzim spesifik aktivitesindeki bu artış enzimin ileri saflaştırma teknikleri ile saflaştırılarak daha yüksek aktiviteler elde edilebileceğini göstermektedir.

SDS-PAGE yöntemi ile moleküler ağırlığı belirlenen enzim 45-55 kDa, 29-36 kDa ve 24-29 kDa arasında olmak üzere 3 bant vermiştir. Bu durum enzimin moleküler ağırlıkları farklı olan 3 alt birime sahip olduğu şeklinde yorumlanabileceği gibi, enzim kısmi olarak saflaştırıldığı için ortamda moleküler ağırlıkları farklı olan 3 enzimin varlığından da sözedilebilir.

Zymogram ile yapılan inhibisyon çalışmaları sonucunda EDTA varlığında enzimin az da olsa inhibe olduğu gözlenmiştir. PMSF varlığında ise EDTA'ya kıyasla daha fazla bir inhibisyon gözlenmiştir. Enzimin EDTA varlığında çok fazla inhibisyona uğramaması ve ağır metallerle muamele işlemleri sonucunda enzim aktivitesinde düşüş gözlenmesi enzimin metalloproteaz karakterde olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. PMSF varlığında gözlenen kuvvetli inhibisyon ise enzimin serin proteaz olduğu düşüncesini kuvvetlendirmektedir.

Tüm bu çalışmalar sonucunda, hidrokarbon ile kirlenmiş alanlardan izole edilen D3 izolatının ürettiği enzimin yüksek sıcaklıkta ve alkalin ortamlarda kararlı olduğu görülmüştür. Ayrıca SDS ile muamele edildiğinde de aktivitede bir kaybın oluşmaması nedeni ile üretilen alkalin proteazın özellikle deterjan sektörü başta olmak üzere önemli bir alternatif oluşturabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında elde edilen veriler doğrultusunda potansiyel üretici D3 izolatının öncelikle klasik mikrobiyolojik ve moleküler teknikler ile tanımlanması yapılmalıdır. Üretilen alkalin proteazın da ileri saflaştırma teknikleri ile saflaştırılarak karakterizasyonunun tamamlanması gerekmektedir.

## 6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abou-Elela, G.M., Ibrahim, H.AH., Hassan, S.W., Abd-Elnaby, H. and El-Toukhy, N.M.K., 2011, Alkaline protease production by alkaliphilic marine bacteria isolated from Marsa-Matrouh (Egypt) with special emphasis on *Bacillus cereus* purified protease, African Journal of Biotechnology, 10 (22), 4631-4642.
- Ahmed, I., Irfan, M., Nadeem, M., Zia, M.A., Ahmad, B.M. and Iqbal, H.M.N., 2010, Optimization of media and environmental conditions for alkaline protease production using *Bacillus subtilis* in submerged fermentation process, International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences, 4, 105-113.
- Ali, S., Huang, Z., QeZang, W. and Ren, S.X., 2011, Production and regulation of extracellular proteases from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Cordycipitaceae; Hypocreales) in the presence of diamondback moth cuticle, Pakistan Journal of Zoology, 43 (6), 1203-1213.
- Aunstrup, K. and Andresen, O., 1972, Preparation of proteolytic enzymes having a maximum activity at high alkalinity. United States Patent 3674643
- Azeredo, L.A.I., Freire, D.M.G., Soares, R.M.A., Leite, S.G.L. and Coelho, R.R.R., 2004, Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil, Enzyme Microbial Technology, 34, 354–358.
- Baran, S., Bielinska, J.E. and Oleszczuk, P., 2004, Enzymatic activity in an airfield soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons, Geoderma, 221-232.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Barredo, J.L., 2005, Methods in biotechnology 17: microbial enzymes and biotransformations, Human Press., Totowa, New Jersey, 1-27
- Bayouhd, A., Gharsallah, N., Chamkha, M., Dhouib, A., Ammar S. and Nasri, M., 2000, Purification and characterization of an alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* MN1, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 24 (4), 291-295.
- Bhatiya, R. and Jadeja, G.R., 2010, Optimization of environmental and nutritional factors for alkaline protease production, Electronic Journal of Enviromental Agricultural and Food Chemistry, 9 (3), 594-599.
- Bnarjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W. and Soni, R., 1999, Thermostabile alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive, Process Biochemistry, 35, 213-219.
- Boyce, S. and Tipton, K.F., 2005, Enzyme classification and nomenclature, John Wiley & Sons, Ltd.,
- Brady, D., Duncan, J.R. and Russell, A.E., 1994, Partial purification of an extracellular protease produced by *Proteus vulgaris*, Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists, 78 (5), 153-156.
- Breddam, K., 1986, Serine carboxypeptidases: a review, Carlsberg Research Communications, 51, 83-128
- Bulut, Ş., 2007, Marinal bakteri *Teredinobacter turnirae*' den proteaz üretimi, Doktora Tezi, Fırat Ü. Fen Bil. Ens., 188s.
- Chakraborty, R. and Srinivasan, M., 1993, Production of a thermostable alkaline protease by a new *Pseudomonas* sp. by solid substrate fermentation, Journal of Microbial Biotechnology, 8, 7-16.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Chandrasekaran, S. and Dhar, S.C., 1983, A low cost method for the production of extracellular proteinase using tapioca starch, *Journal of Fermentation Technology*, 61, 511-514.
- Chang, S.J., Kim, Y.S., Yang, H.C., Sung, H.C. and Choi, Y.J., 1988, A study on the alkaline protease produced from *Bacillus subtilis*, *Journal of the Korean Agricultural Chemical Society*, 31, 356-360.
- Charles, P., Devanathan, V., Anbu, P., Ponnuswamy, M.N., Kalaichelvan, P.T. and Hur, B., 2008, Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10, *Journal of Basic Microbiology*, 48, 347–352.
- Cheetham, P.S.J., 1995, Principles of industrial biocatalysis and bioprocessing in: handbook of enzyme biotechnology, Ellis Harwood, U.K., 88 p.
- Cheong, C., Chun, S.S. and Kim, Y.H., 1993, Production and properties an alkaline protease from *Pseudomonas sp.* SJ-320, *Korean Biochemistry Journal*, 26, 479-484.
- Chopra, A.K. and Mathur, D.K., 1984, Isolation, screening and characterization of thermophilic *Bacillus* species isolated from dairy products, *Journal of Applied Bacteriology*, 57, 263–271.
- Çelik, N., 2007, *Bacillus clausii* GMBAE 42'den saflaştırılan alkalen proteazın termal inaktivasyon kinetiğinin belirlenmesi ve Cu<sup>2+</sup> iyonları ile termostabilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Ü. Fen Bil. Ens., 92 s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Deane, S.M., Robb, F.T. and Woods, D.R., 1987, Production and activation of a SDS-resistant alkaline serine exoprotease of *Vibrio alginolyticus*, *Journal of General Microbiology*, 133, 391–398.
- Debette, J., 1991, Isolation and characterization of an extracellular proteinase produced by a soil strain of *Xanthomonas maltophila*, *Current Microbiology*, 22, 85–90.
- Dhandapani, R. and Vijayaragavan, R., 1994, Production of a thermophilic extracellular alkaline protease by *Bacillus stearothermophilus* AP-4, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33-35.
- Durham, D.R., Stewart, D.B. and Stellwag, D.J., 1987, Novel alkaline and heat-stable serin proteases *Bacillus sp.* strain GX 6639, *J. Bacteriol.*, 169: 2762-2768
- Ekici, Ö.D., Paetzel M. and Dalbey R.E., 2008, Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration, *Protein Science*, 17 (12), 2023–2037.
- Feng, Y. and Xue, Q., 2006, The serin carboxypeptidase like gen family of rice (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*), *Functional and Integrative Genomics*, 6, 14-24.
- Ferrero, M.A., Castro, G.R., Abate, C.M., Baigori, M.E. and Sineriz, F.E., 1996, Thermostabil alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 327-332.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Fincan, S. ve Okumus, V., 2007, *Citrullus lanatus l.* (karpuz) ve *Cucumis melo l.* (kavun) kabuğu kullanılarak katı-faz fermentasyon tekniği (ssf) ile topraktan izole edilen *Bacillus sp.*' den alkalın serin proteaz eldesi, Dicle Ü. Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Dergisi, 9, 104-114.
- Fujiwara, N. and Yamamoto, K., 1987, Production of alkaline protease in a low cost medium by alkalophilic *Bacillus sp.* and properties of the enzymes, Journal of Fermentation Technology, 65, 345-348.
- Gaiju, H., Bhalla, T.C. and Agarwal, H.O., 1996, Thermostable alkaline protease from thermophilic *Bacillus coagulans* PB-77, Indian Journal of Microbiology, 36, 153-155.
- Geok, L.P., Razak, C.N.A., Zaliha, R.N., Abd Rahman, R.N.Z., Basri, M. and Salleh, A.B., 2003, Isolation and screening of an extracellular organic solvent-tolerant protease producer, Biochemical Engineering Journal, 13, 73-77
- Gessesse, A. and Gashe, B.A., 1997, Production of alkaline protease by an alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline soda lake, Biotechnology Letters, 19, 479-481.
- Gidamo, G.H., 2009, Alkaline protease production by new alkaliphilic microbial isolate under solid state fermentation, Master Thesis, Addis Ababa U.,
- Harley, J. P., 2005, Laboratory exercises in microbiology, 6th ed. McGraw Hill, New York, NY.
- Hedstrom, L., 2002, Serine protease mechanism and specificity, Chemical Reviews, 102, 4501- 4523.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Heineken, F.G. and O'Conner, R.J., 1972, Continuous culture studies on the biosynthesis of alkaline protease, neutral protease and alpha amylase by *Bacillus subtilis* NRRL B-3411, *Journal of General Microbiology*, 73, 35-44.
- Illanes, A., 2008, *Enzyme biocatalysis*, Springer, 391p.
- Ishihara, Y., 1960, *Studies on crystalline whale pepsin*, Hokkaido University, Hakodate, Japan, Faculty of Fisheries.
- Johannes, T., Simurdiak, M.R. and Zhao, H., 2006, *Biocatalysis*, *Encyclopedia of Chemical Processing*, Marcel Dekker Inc., New York, 101-109.
- Joo, H.S., Ganesh, C., Kumar, A. and Gun-Chun, P., 2002, Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2, 35-48.
- Kalaiarasi, K. and Sunitha, P. U., 2009, Optimization of alkaline protease production from *Pseudomonas fluorescens* isolated from meat waste contaminated soil, *African Journal of Biotechnology*, 8 (24), 7035-7041.
- Kaul, R.H., *Enzyme production, Biotechnology*, Vol. V.
- Khan, M.A., Ahmad, N., Zafar, A.U., Nasir, I.A. and Qadir, M.A., 2011, Isolation and screening of alkaline protease producing bacteria and physio-chemical characterization of the enzyme, *African Journal of Biotechnology*, 10 (33), 6203-6212
- Kıran, Ö.E., Çömlekçiöğlü U. ve Dostbil N., 2006, Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1)

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Kobayashi, T., Ogasawara, A., Ito, S. and Saitoh, M., 1985, Purification and some properties of alkaline proteinase produced by *Pseudomonas maltophilia*, *Agricultural Biology and Chemistry*, 49, 693-698.
- Kraut, J., 1977, Serin proteases: structure and mechanism of catalysis, *Annual Review of Biochemistry*, 46, 331-358.
- Kuddus, M. and Ramteke, P.W., 2011, Production optimization of an extracellular cold-active alkaline protease from *Stenotrophomonas maltophilia* MTCC 7528 and its application in detergent industry, *African Journal of Microbiology Research*, 5 (7), 809-816.
- Kumar, C.G., 2002, Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*, *Applied Microbiology*, 34 (1), 13-17.
- Kwon, Y.T., Kim, J.O., Moon, S.Y., Lee, H.H. and Rho, H.M., 1994, Extracellular alkaline protease from alkalophilic *Vibrio metschnikovii* strain RH530, *Biotechnology Letters*, 16, 413-418.
- Labud, V., Garcia, C. and Hernandez, T., 2007, Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil, *Chemosphere*, 66, 1863-1871
- Liese, A., Seelbach, K. and Wandrey, C., 2000, *Industrial biotransformations*, Wiley VCH Verlag, Weinheim, 422 p.
- Long, S., Mothibelli, M.A., Robb, F.T. and Woods, D.R., 1981, Regulation of extracellular alkaline protease by histidine in a collagenolytic *Vibrio alginolyticus* strain, *Journal of General Microbiology*, 127, 193-199.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- MacFaddin, J., 1972, Biochemical tests for the identification of medical bacteria, Williams and Wilkins Company, Baltimore, MD.
- Mahmoud, M.A., Al-Agmay, M.H.M., El-loboudy, S.S. and Ashour, M.S., 2005, Production and properties of an extra-cellular neutral protease from *Bacillus* species, Research Bulletin F. of Science, Al Azhar University, 211-215
- Mao, W., Pan, R. and Freedman, D., 1992, High production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in a fed-batch fermentation using a synthetic medium, Journal of Industrial Microbiology, 11, 1-6.
- Margesin, R., Walder, G. and Schinner, F., 2000, The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil, Acta Biotechnologica, 20, 313-333.
- Mathew, J., 1999, Microbial proteases, isolation, purification and characterization, PhD Thesis, Mahatma Gandhi U., 151 p.
- McDonald, K.J., 1985, An overview of protease specificity and catalytic mechanisms aspects related to nomenclature and classification, The Histochemical Journal, 17, 773-785.
- Mehrotra, S., Pandey, P.K., Gaur, R. and Darmwal, N.S., 1999, The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate, Bioresource Technology, 67, 201-203.
- Miller, S.B., 1992, Simple enzyme experiments, Tested studies for laboratory teaching, Volume 6

### **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Mizusawa, K., Ichishima, E. and Yoshida, F., 1969, Production of thermostable alkaline protease by *Streptomyces*, Applied Microbiology, 366-371.
- Mohapatra, B.R., Bapuj, M., Sree, A., 2003, Production of industrial enzymes (amylase, carboxymethylcellulase and protease) by bacteria isolated from marine sedentary organisms, Acta Biotechnologica, 23 (1), 75 –84.
- Morihara, K., 1963, *Pseudomonas aeruginosa* proteinase: purification and general properties, Biochimica et Biophysica Acta, 73, 113–124.
- Mostert, J.F., Luck, H. and Husmann, R.A., 1979, Isolation, identification, and practical properties of *Bacillus* species from UHT and sterilized milk, South African Journal of Dairy Science, 11, 125-132.
- Muderrizade, A., Ensari, N.Y., Aguloglu, S. and Otludil, B., 2001, Purification and characterization of alkaline protease from alkalophilic *Bacillus* sp., Prikladnaya Biokhimiya i Microbiologiya, 37 (6), 674-677.
- Muhammet, S.M., 2008, Kolesterol tayini için biyosensör hazırlanması, Doktora tezi, Gazi Ü. Fen Bil. Ens., 73s.
- Mukthar, H. and Haq, I.U., 2008, Production of alkaline protease by *Bacillus subtilis* and its application as a depilating agent in leather processing, Pakistan Journal of Botany, 40 (4), 1673-1679.
- Nadeem, M., Shahjahan, B. and Syed, Q.A., 2006, Microbial production of alkaline proteases by locally isolated *Bacillus subtilis* PCSIR-5, Pakistan Journal of Zoology, 38, 109-118.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Nadeem, M., Qazi, J.I., Syed, Q. and Baig, S., 2007, Optimization of process parameters for alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* N-2 and kinetics studies in batch fermentation, Turk Journal of Biology, 32, 243-251.
- Naidu, K.S.B. and Davi, K.L., 2005, Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran, African Journal of Biotechnology, 4 (7), 724-726.
- Öner, K.M.N., 2008, Zorunlu alkalifilik *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan izole edilen alkalin proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, Doktora Tezi, Kocaeli Ü. Fen Bil. Ens., 227 s.
- Özdemir, F.İ., 2003, Purification and characterization of cytoplasmic and proteasome associated chymotrypsin-like proteases from *Thermoplasma volcanium*, PhD Thesis, Middle East Technical University, 130 p.
- Pawar, R., Zambare, V., Barve, V. And Paratkar, G., 2009, Application of protease isolated from *Bacillus sp.* 158 in enzymatic cleansing of contact lenses, Biotechnology, 8, 276-280.
- Perrin, D.D. and Dempsey, B., 1974, Buffers for pH and metal ion control, Chapman Hall, London.
- Phadatare, S.U., Deshpande, V.V. and Srinivasan, M.C., 1993, High activity alkaline protease from *Condiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): enzyme production and compability with commercial detergents, Enzyme and Microbial Technology, 15, 72-76.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Purva, S.K., Gupta, L.K. and Gupta, J.K., 1998, Thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus sp.* IS-3, Indian Journal of Microbiology, 38, 149-152.
- Quadar, S.A.U., Shireen, E., Iqbal, S. and Anwar, A., 2009, Optimization of protease production from newly isolated strain of *Bacillus sp.* PCSIR EA-3, Indian Journal Biotechnology, 8, 286-290.
- Qiu, X.B., Yuan, Y., Dai, H. and Yu, Y., 1990, Study on alkaline proteinase from alkalophilic *Bacillus pumilus* II, research on the selection of high producing strain and the conditions for enzyme production, Acta. Microbiol. Sin., 30, 129-133.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. and Deshpande, V.V., 1998, Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62 (3), 597-635
- Reddy, M.N., Kumar, C.K., Swathi, K., Nagamani, B., Venkateshwar, S. and Rao, L.V., 2011, Extracellular alkaline protease production from isolated *Bacillus subtilis* SVR-07 by using submerged fermentation, International Journal of Pharmaceutical Research and Development, 3 (1), 216-223.
- Rehm, J., Reed, G., Kennedy, J.F., 1987, Biotechnology: 7a, 5-100, Vch. New York.
- Reznik, S.E. and Fricker, L.D., 2001, Carboxypeptidases from A to Z: implications in embryonic development and Wnt binding, Cellular and Molecular Life Sciences, 58, 1790-1804

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Sangeetha, R., Geetha, A. and Arulpandi, I., 2008, Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG 2 isolated from an industrial effluent, The Internet Journal of Microbiology, 5 (2).
- Sedmak, J.J. and Grossberg, S.E., 1977, A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Comassie Brilliant Blue G250, Analytical Biochemistry, 79, 544-552.
- Sen, S. and Satyanarayana, T., 1993, Optimization of alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis* S-40, Indian Journal of Microbiology, 33, 43-47.
- Sengupta, S. and Dasgupta, M., 2006, Industrial and clinical applications excluding diagnostic clinical enzymology, Enzymology, 25 p.
- Sevinç, N., 2010, Türkiye topraklarından izole edilen *Bacillus sp.* suşlarından proteaz üretimi, kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Ü. Fen Bil. Ens., 101 s.
- Shafee, N., Aris, S.N., Rahman, R.Z.N.A., Basri, M. and Salleh, A.B., 2005, Optimization of environmental and nutritional conditions for the production of alkaline protease by a newly isolated bacterium *Bacillus cereus* strain 146, Journal of Applied Sciences Research, 1(1), 1-8.
- Shaheen, M., Shah, A.A., Hameed, A. and Hasan, F., 2008, Influence of culture conditions on production and activity of protease from *Bacillus subtilis* BS1, Pakistan Journal of Botany, 40 (5), 2161-2169.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Sharmin, S., Hossain, T. and Anwar, M.N., 2005, Isolation and characterization of a protease producing bacteria *Bacillus amovivorus* and optimization of some factors of culture conditions for protease production, *Journal of Biological Sciences*, 5 (3), 358-362.
- Shi, J., Coyne, V.E. and Weiner, R.M., 1997, Identification of an alkaline metalloprotease produced by the hydrothermal vent bacterium *Hyphomonas jannaschiana* V.P.3, *Microbios*, 91, 15-26.
- Sinha, N. and Satyanarayana, T., 1991, Alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis*, *Indian Journal of Microbiology*, 31, 425-430.
- Smith, A.C. and Hussey, M.A., 2005, Gram stain protocol, American Society For Microbiology,
- Srividya, S. and Mala, M., 2009, Influence of process parameters on the production of detergent compatible alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. Y., *Turk Journal of Biology*, 35, 177-182.
- Sumantha, A., Larroche, C. and Pandey A., 2006, Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective, *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2), 211–220.
- Takami, H., Akiba, T. and Horikoshi, K., 1989, Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30, 120-124.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

Tortora, J.G., Case, C.L. and Funke, B.R., 2009, Microbiology, Pearson Education, 812p.

Thangam, E.B. and Ranjkumar, G.S., 2002, Purification and characterization of alkaline protease from *Alcaligenes faecalis*, Biotechnology and Applied Biochemistry, 35, 149–154

Thumar, J.T. and Singh, S.P., 2007, Secretion of an alkaline protease from a salt-tolerant and alkaliphilic, *Streptomyces clavuligerus* strain Mit-1, Brazilian Journal of Microbiology, 38, 766-772.

Turk, B., 2006, Targeting proteases: successes, failures and future prospects, Nature Reviews Drug Discovery, 5, 785-799.

Tusijibo, H., Miyamoto, K., Hasegawa, T. and Inamori, Y., 1990, Purification and characterization of two types of serin alkaline protease produced by an alkalophilic actinomycete, Journal of Applied Bacteriology, 4, 520-529.

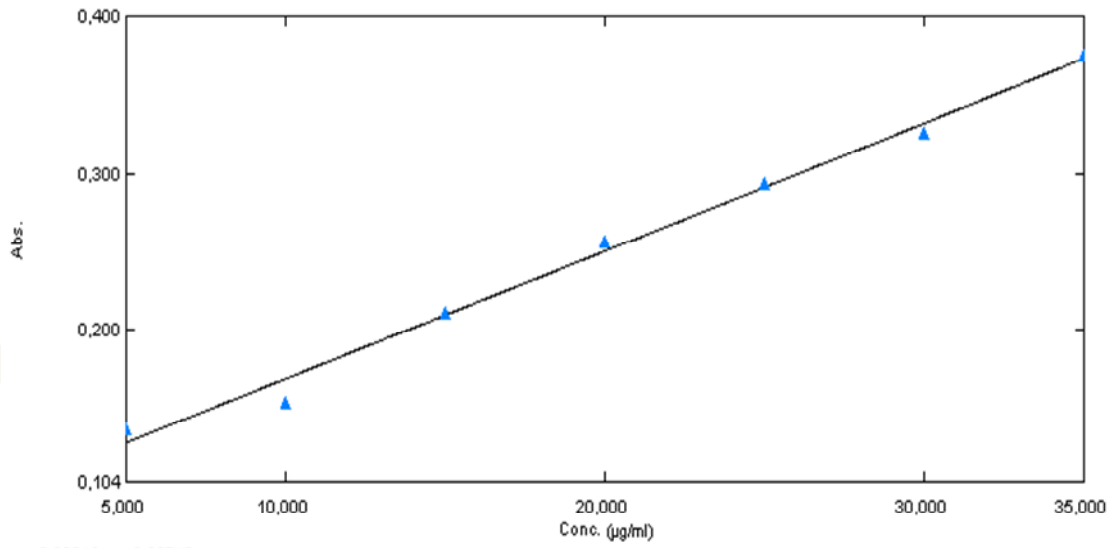
Uhlig, H., 1998, Industrial enzymes and their applications, John Wiley & Sons, USA, 116-144.

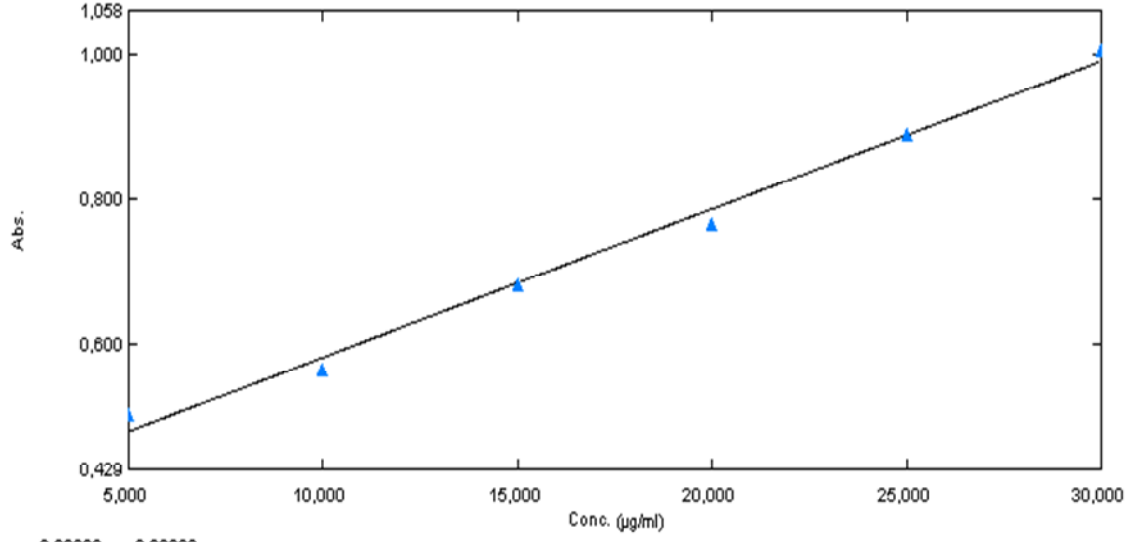
Utkan, G., Denizci, A.A., Öztürk, D.Ç., Öztürk, H.Ü. ve Vardar, E., 2011, Enzim saflaştırmada temel yöntemler- XIII. uygulamalı eğitim kursu, TÜBİTAK-MAM, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü

Uyar, F., Porsuk, I., Kizil, G. and Yilmaz, E.I., 2011, Optimal conditions for production of extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* strain CA15, EurAsian Journal of BioSciences, 5, 1-9.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Vand der Horn, R.A.L., 2008, Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms, *Annual Review of Plant Biology*, 59, 191-223.
- VijayAnand, S., Hemapriya, J., Selvin, J. and Kiran, S., 2010, Production and optimization of haloalkaliphilic protease by an extremophile *Halobacterium* sp. JS1, isolated from Thalassohaline environment, *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 5 (1), 44-49.
- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S. and Higton, G., 2001, *Industrial microbiology: an introduction*, Blackwell Science Ltd., London, 288 p.
- Ward, O.P, 1985, Proteolytic enzymes: in comprehensive biotechnology, Pergamon Press, Great Britain, 789-818.
- Wiseman, A., 1987, The application of enzymes in industry, *Handbook of Enzymes Biotechnology*, Second Edition, Chapter 3, 274-373.
- Yaoyu, F., Wenbo, Y. and Zhimin, H., 1997, Fermentation conditions of engineering strain utilizing starch for production of alkaline proteinase, *Weishengwu Xuebao*, 37, 473-476.
- Zemans, N.W., and McCrea J.M., 1985, Alpha-Amylase production using a recombinant DNA organism, *Cereal Foods World*. 30 (1) : 777-780.
- Zhu, W., Cha, D., Cheng, G., Peng, Q. and Shen, P., 2007, Purification and characterization of a thermostable protease from a newly isolated *Geobacillus* sp. YMTC 1049, *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1592- 1597.

**EKLER****EK A: Tirozin standart eğrisi**

**EK B: BSA standart eğrisi**

$$y = 0,02033 x + 0,38008$$

korelasyon katsayısı =  $r^2 = 0,99192$