

***Bacillus megaterium'* dan PROTEAZ ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**Mustafa İŞMARCI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ŞUBAT 2014  
ANKARA**

Mustafa İŞMARCI tarafından hazırlanan “*Bacillus megaterium*’dan  
PROTEAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU”  
adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Elif LOĞOĞLU .....  
Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans  
tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ümmühan Şebnem HARPUT .....  
Farmakognozi Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Prof. Dr. Elif LOĞOĞLU .....  
Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Fatma ARSLAN .....  
Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 07/02/2014

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini  
onamıştır.

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU .....  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Mustafa İŞMARCI

***Bacillus megaterium'* dan PROTEAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI  
VE KARAKTERİZASYONU  
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Mustafa İŞMARCI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Şubat 2014**

**ÖZET**

Bu çalışmada *Bacillus megaterium'*dan proteaz enziminin kısmi olarak saflaştırılması ve karakterizasyonu araştırılmıştır. *Bacillus megaterium* ağırlık/hacim olarak % 0,5 maya eksrakıtı, %1 pepton , %1 glukoz, %1 tripton içeren besiyerinde 37 °C'de 24 saat süresince çoğaltılmıştır. Proteaz enzimi, %80 amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE selüloz anyon değişim kromatografisiyle %7,68 verimle ham ekstrakta göre 5,18 kat saflaştırılmıştır. Enzimin spesifik aktivitesi 1136 U/mg'dır. Enzimin optimum pH ve sıcaklığı sırası ile 12 ve 70 °C'dir. Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi incelendiğinde Ca<sup>2+</sup> , Mg<sup>2+</sup> ve Fe<sup>+3</sup> enzim aktivitesini arttırırken K<sup>+1</sup>, Sn<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup> ve Al<sup>+3</sup> varlığında aktivitede kayıp gözlenmiştir. Co<sup>+2</sup> ve Sr<sup>+2</sup> iyonlarının ise enzim aktivitesi üzerine bir etkisi olmamıştır. Enzim kazein, jelatin, soya fasulyesi unu, BSA ve ovalbumin (Yumurta albumini), gibi doğal substratlar karşısında en yüksek aktiviteyi kazeine karşı göstermiştir. DMSO, 2-propanol, toluen, metanol enzim aktivitesini arttırırken Etanol herhangi değişikliğe sebep olmamıştır. Aseton ve asetonitril çok az miktarda aktiviteyi düşürmüştür. Deterjan katkı maddelerinden olan SDS aktiviteyi %31 oranında arttırmıştır. TritonX-100 aktiviteyi %40 oranında azaltırken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nin %2'lik ve %5'lik her iki çözeltisinde aktiviteyi %25 oranına kadar düşürmüştür. Enzim alkali proteaz inhibitörü olan PMSF tarafından inhibe edilmiştir. EDTA

varlığında ise aktivitesinde çok az düşüş gözlenmiştir. Bu inhibisyon profili enzimin serin alkali proteaz olduğunu ve aktif merkezinin yakınında serin kalıntılarının bulunduğunu göstermiştir. Saflaştırılan enzimin Km ve Vmaks Kinetik parametreleri kazein substratı kullanılarak sırasıyla 0,77 mg/ml, 3,58  $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{dak}^{-1}$  olarak bulunmuştur.

**Bilim Kodu** : 201.1.020  
**Anahtar Kelimeler** : Alkalın proteaz, Bacillus megaterium, saflaştırma, karakterizasyon  
**Sayfa Adedi** : 74  
**Tez Yöneticisi** : Prof. Dr. Elif LOĞOĞLU

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEASE FROM***Bacillus megaterium*

(M.Sc. Thesis)

**Mustafa İŞMARCI****GAZİ UNIVERSITY****GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES****February 2014****ABSTRACT**

**In this study, partially purification and characterization of protease from *Bacillus megaterium* was investigated. *Bacillus megaterium* who is produce Protease enzyme was grown in %1 tryptone, %1 peptone, %0,5 yeast extract, %1 glucose at 37 °C and 24 hour. Enzyme which is protease was purified by %80 ammonium sulfate precipitation. Protease was purified by with DEAE cellulose anion exchange chromatography %7,68 yield, 5,18 fold and specific activity was 1136 U/mg. The optimum pH and temperature of protease was 12 and 70 °C, respectively. While  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{+3}$  increased protease activity, some other metals such as  $\text{K}^{+1}$ ,  $\text{Sn}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  and  $\text{Al}^{+3}$  decreased enzyme activity,  $\text{Co}^{+2}$  and  $\text{Sr}^{2+}$  showed no effect on protease activity. Protease showed highest activity towards casein among other native proteins such as ovalbumin, gelatin, BSA, soy bean. While enzyme activity increased in the presence of DMSO, 2-Propanol, Toluene, Methanole but in the presence of acetone and acetonitrile enzyme activity has been decreased slightly, enzyme activity maintained in the presence of ethanol. Enzyme activity increased %31 in the presence of Detergent additive material SDS, on the other hand enzyme decreased %40 and %75 in the presence of Detergent additive material TritonX-100 and oxidation material  $\text{H}_2\text{O}_2$ (%2 and %5), respectively. Enzyme was inhibited by alkalinprotease inhibitor PMSF. This inhibition profile showed that us enzyme was serin alkalinprotease. The kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$  of the**

**purified protease were determined by measuring the protease activity casein as a substrate 0.77 mg/ml, 3,58  $\mu\text{mol.ml}^{-1}$  .dak<sup>-1</sup> respectively.**

**Science Code : 201.1.020**

**Key Words : Alkaline protease, *Bacillus megaterium*, purification, characterization**

**Page Number : 74**

**Supervisor : Prof. Dr. Elif LOĞOĞLU**

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesi sırasında yardımlarını esirgemeyen, beni her konuda destekleyen, gösterdiği ilgi ve emek ile bu çalışmamın sonuca ulaşmasını sağlayan değerli hocam Prof.Dr. Elif LOĞOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımı yürütürken fikir alışverişinde bulunduğum arkadaşım Seda ÖZDEN'e çok teşekkür ederim.

Mesleki açıdan gelişmemi sağlayan, bilgilerini esirgemeyen tüm hocalarıma ve eğitimim boyunca bana destek olan arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Her türlü maddi ve manevi özveride bulunarak bugünlere gelmemde büyük katkıları olan, her konuda daima beni destekleyen aileme minnet ve şükranlarımı sunarım.



## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET.....	iv
ABSTRACT .....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER .....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ .....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ .....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xv
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Proteazlar .....	2
2.1.1. Proteazların adlandırılması ve sınıflandırılması.....	3
2.1.2. Proteaz enzim kaynakları.....	15
2.1.3. Proteazların endüstride kullanım alanları.....	19
2.2. Kaynak Araştırması .....	22
3. DENEYSEL KISIM .....	36
3.1. Kullanılan kimyasallar .....	36
3.2. Kullanılan mikroorganizma .....	36
3.3. Kullanılan alet ve cihazlar .....	36
3.4. <i>Bacillus megaterium</i> 'un çoğaltılması ve proteaz üretimi .....	37
3.5. <i>Bacillus megaterium</i> 'dan alkali proteaz enziminin saflaştırılması .....	37
3.5.1. Amonyum sülfatla çöktürme .....	37

**Sayfa**

3.5.2. DEAE selüloz anyon değişim kromatografisi .....	37
3.6. Proteolitik enzim aktivitesinin tayini .....	38
3.7. Warburg & Christian ve Bradford yöntemleriyle protein miktarı tayini .....	39
3.8. <i>Bacillus megaterium</i> 'dan saflaştırılan alkali proteaz enziminin karakterizasyonu.....	40
3.8.1. SDS poliakrilamid jel elektroforeziyle proteaz enziminin saflık kontrolü ve moleköl kütlesinin belirlenmesi.....	40
3.8.2. Saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH değerenin belirlenmesi... ..	41
3.8.3. Saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığının ve sıcaklık kararlılığının belirlenmesi .....	42
3.8.4. Bazı metal iyonlarının saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesine etkisinin belirlenmesi .....	42
3.8.5. Bazı organik çözücülerin saflaştırılan proteaz enzimi kararlılığına etkisinin belirlenmesi .....	43
3.8.6. Saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlarla spesifitesinin Belirlenmesi .....	43
3.8.7. Bazı inhibitörlerin, deterjan yüzey aktif maddelerinin ve oksidantların saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesine etkisinin belirlenmesi .....	44
3.8.8. <i>B. megaterium</i> 'dan saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratıyla Michealis Menten kinetik parametrelerinin belirlenmesi.....	44
4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....	46
4.1. Bradford Yöntemiyle protein tayini için hazırlanan standart eğri.....	46
4.2. Aktivite testlerinde yararlanılan tirozin standart eğrisi.....	46
4.3. <i>Bacillus megaterium</i> 'dan proteaz enziminin saflaştırılması sonuçları.....	47
4.3.1. İlk adım: amonyum sülfat çöktürmesi.....	47
4.3.2. İkinci adım: DEAE selüloz iyon değişim kromatografisi .....	47

	<b>Sayfa</b>
4.4. <i>Bacillus megaterium</i> 'dan saflaştırılan Proteaz Enziminin karakterizasyonu.....	49
4.4.1. SDS poliakrilamid jel elektroforeziyle proteaz enziminin saflık kontrolü ve moleköl kütlesinin tespiti .....	49
4.4.2. <i>Bacillus megaterium</i> ' dan saflaştırılan proteaz enziminin optimum reaksiyon pH'sı sonuçları .....	49
4.4.3. <i>Bacillus megaterium</i> ' dan saflaştırılan proteaz enziminin optimum reaksiyon sıcaklığı sonuçları .....	50
4.4.4. <i>Bacillus megaterium</i> ' dan saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık kararlılığı sonuçları .....	51
4.4.5. <i>Bacillus megaterium</i> ' dan saflaştırılan proteaz enzime bazı metal iyonlarının etkisi.....	52
4.4.6. Bazı organik çözücülerin <i>Bacillus megaterium</i> ' dan saflaştırılan proteaz enzimi kararlılığına etkisi .....	53
4.4.7. <i>Bacillus megaterium</i> ' dan saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifitesi sonuçları .....	54
4.4.8. Bazı inhibitörlerin, deterjan yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanların proteaz aktivitesine etkileri .....	56
4.4.9. <i>Bacillus megaterium</i> ' dan saflaştırılan proteaz enziminin Michaelis Menten kinetik parametreleri .....	58
5. TARTIşMA VE ÖNERİLER .....	58
KAYNAKLAR .....	65
ÖZGEÇMİş .....	73

**ÇİZELGELERİN LİSTESİ**

<b>Çizelge</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 2.1. Serin alkali proteaz enziminin aminoasit bileşimi.....	8
Çizelge 3.1. Örneklerin gümüş boyama tekniği ile boyanma prosedürü.....	42
Çizelge 4.1. <i>B. Megaterium</i> kaynaklı proteazın saflaştırılma basamakları sonuçları .....	50
Çizelge 4.2. <i>B. megaterium</i> ' dan saflaştırılan proteaz enziminin bazı substratlar varlığında aktivitesindeki durum .....	56
Çizelge 4.3. Bazı inhibitörlerin, deterjan yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanların proteaz aktivitesine etkileri .....	57

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Proteazların genel mekanizmasının şematik olarak gösterimi .....	2
Şekil 2.2. Şekil 2.2. Peptid bağını katalize eden serin proteaz reaksiyon mekanizması (tripsin).....	9
Şekil 2.3. Serin proteaz olan kimotripsin katalitik mekanizma şeması.....	10
Şekil 2.4. Aspartil proteaz mekanizması genel şeması.....	13
Şekil 2.5. Metallo proteaz mekanizması genel şeması.....	14
Şekil 4.1. Protein tayininde kullanılan standart grafik .....	47
Şekil 4.2. Tirozin standart grafiği .....	48
Şekil 4.3. <i>B. megaterium</i> ' dan DEAE selüloz iyon değişim kromatografisiyle saflaştırılan proteaz enziminin aktivite-absorbans grafiği .....	49
Şekil 4.4. Kromatografi cihazından elüsyon sonucu alınan kromatogram .....	49
Şekil 4.5. <i>B. megaterium</i> ' dan saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesine çeşitli pH'ların etkisi .....	51
Şekil 4.6. Saflaştırılan proteaz enzime çeşitli sıcaklıkların etkisi .....	52
Şekil 4.7. Saflaştırılan proteazın 50-80 °C arasındaki sıcaklıklarla inkübasyonu neticesindeki stabilitesi .....	53
Şekil 4.8. <i>B. megaterium</i> ' dan saflaştırılan proteaz enzime bazı metal iyonlarının etkisi .....	54
Şekil 4.9. Saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesine bazı organik çözücülerin etkisi .....	55
Şekil 4.10. <i>B. megaterium</i> ' dan saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratıyla elde edilen Lineweaver-Burk grafiği .....	58

**RESİMLERİN LİSTESİ**

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 2.1.Serin enziminin üç boyutlu yapısının gösterimi .....	7
Resim 2.2.Kimotripsin katalitik mekanizma şeması üç boyutlu gösterimi.....	11
Resim 3.1. Bioplot Pharmacia FPLC ve fraksiyon kolektörü.....	39

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklamalar</b>
<b>AP</b>	Amino peptidaz
<b>Asp</b>	Aspartik asit
<b>BSA</b>	Sığır serum albumini
<b>CP</b>	Karboksi peptidaz
<b>Cys</b>	Sistein
<b>DEAE</b>	Dietilaminoetil
<b>DMSO</b>	Dimetil sülfoksit
<b>DTT</b>	Ditiyoteritol
<b>EDTA</b>	Etilendiamin tetra asetik asit
<b>His</b>	Histidin
<b>KDa</b>	Kilo Dalton
<b>PAGE</b>	Poliakrilamit Jel elektroforezi
<b>PMSF</b>	Fenil metil sülfonil florür
<b>Ser</b>	Serin
<b>SDS</b>	Sodyum dodesil sülfat
<b>Tris</b>	Trihidroksimetil aminometan
<b>TCA</b>	Trikloroasetik asit
<b>Simgeler</b>	<b>Açıklamalar</b>
<b>K<sub>m</sub>, V<sub>m</sub></b>	Michaels Menten kinetik sabitleri
<b>U</b>	Ünite

## 1. GİRİŞ

Enzimler biyokimyasal reaksiyonların hızını artıran ve protein yapısında olan biyokatalizörlerdir. Vücuttaki biyokimyasal reaksiyonlar protein yapısında organik moleküller olan "enzimler" tarafından katalize edilirler. Kelime anlamıyla enzim "maya=ferment" anlamına gelmektedir. İnsanlar çok eski zamanlardan beri enzimatik reaksiyonlardan yararlanmışlardır. Örneğin; şarap, yoğurt, ekmek, sirke, boza yapımında [1].

Bugüne kadar 2000'den fazla enzim tanımlanmış ve bunlardan yaklaşık 100 tanesi ticari olarak kullanıma uygun bulunmuştur. Fakat günümüzde bunlardan sadece 18 tanesi endüstriyel amaçla üretilmektedir [89]. Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbohidrazlar, % 3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Karbohidrazlar grubuna giren  $\alpha$ -amilaz üretimi %13 ile önemli bir yer tutmaktadır [2].

James summer tarafından 1926'da üreazın kristalizlendirilmesi ve izolasyonu ile ilk enzim çalışmalarında yeni bir açılım sağladı. Summer üreaz kristallerinin tamamen proteinlerden oluştuğunu buldu ve bütün enzimlerin protein olduğunu ileri sürdü. Yalnız 1930'larda John Northrop ne Moses Kunitz pepsin, tripsin ve diğer sindirim enzimlerini kristalendirdi ve bunların da protein olduklarını bulmalarından sonra Summer'in fikri geniş bir kabul gördü [3].

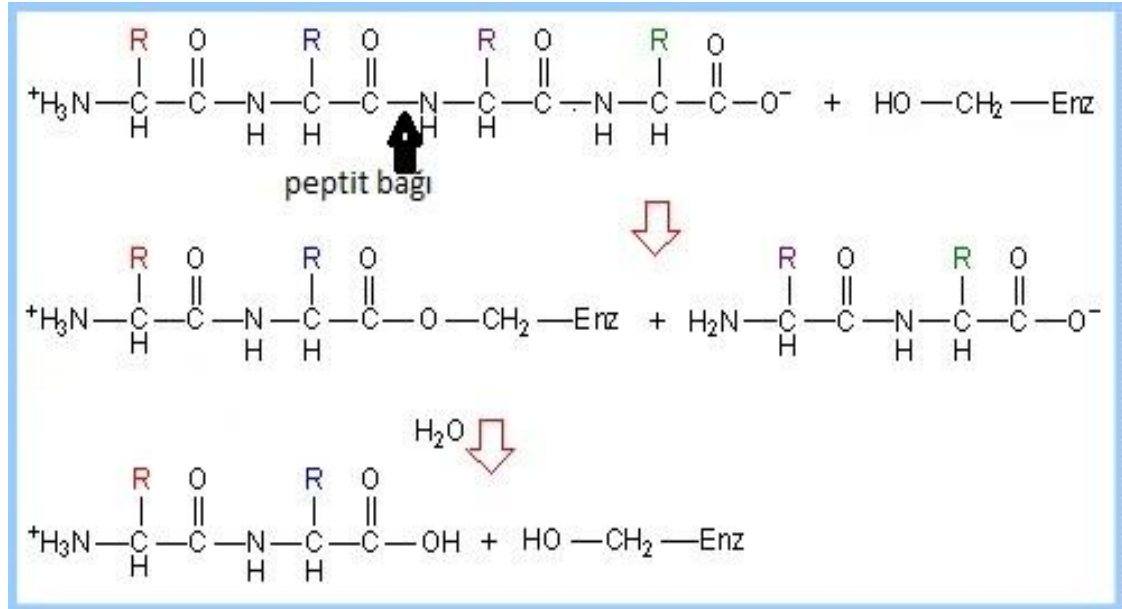
Ekstrasellüler enzimler (ekzoenzimler) hücre içinde sentezlendikten sonra dışarı salınarak buradaki gıda moleküllerinin ayrışmalarını ve hücre duvarından geçebilecek düzeye inmelerini katalize ederler. Bu tarz aktivite gösteren enzimler (hidrolitik enzimler) arasında, başlıca, proteinazlar (peptidaz, jelatinaz, kollajenaz, kazeinaz, fibrinolizin, vs), karbohidrazlar (amilaz, maltoz, laktoz, sukroz, vs), lipazlar ve diğerleri bulunmaktadır.



## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1.Proteazlar

Proteazlar, proteinlerin yapısında bulunan peptit bağlarını hidrolitik olarak parçalanmasına ve kataliz edilmesini sağlayan enzimlerdir. Peptit bağlarının proteazlar tarafından aminoasitlere parçalanmasına proteoliz denir. Proteinlerin parçalanması sonucu peptid parçaları , proteinler ve serbest amino asitler oluşur [4].



Şekil 2.1. Proteazların genel mekanizmasının şematik olarak gösterimi

Proteolitik enzimler tüm canlılarda büyüme, gelişme ve hücre sel bileşenlerin ihtiyaç duyduğu iç dengeyi sağlar. Organizmada sentezlenen proteinlerin kompozisyonunun, büyüklüğünün, biçiminin ve döngüsünün kontrolünde elzem olan bu enzimler kanın pıhtılaşması, kontrollü hücre ölümü, doku farklılaşması, gen ekspresyonu gibi yaşam için önemli biyolojik süreçlerde de rol oynar [5, 6].

Peptid hidrolazları olarak bilinen proteazlara lizozomlarda hücre bölünmesinden protein yıkımına kadar çeşitli biyolojik sistemlerde rastlanmıştır. Ayrıca proteazlar

omurgalılar ve virüsler gibi çeşitli organizmalarda bulunmaktadır. Proteaz mekanizmaları, 10 kda'lık monomerlerden multimerik komplekslere kadar olan peptidlerin ve proteinlerin amid bağlarının kırılmasını katalizlemektedir. Bu özellikleri proteazların biyolojik katalizörler olarak önemini açıklamaktadır [7].

Proteolitik enzimler, hücrel metabolik süreçlerde önemli rol oynamalarının dışında endüstriyel çevrelerde de oldukça çok kullanılmaktadır. Endüstride çeşitli alanlarda kullanılan enzimlerin dünya genelindeki toplam satışının 1 milyar doların üzerinde olduğu tahmin edilmektedir. Proteazlar ise endüstride en çok kullanılan üç enzimden biridir. Proteazlar yaklaşık %60'lık pazar payıyla en üst sırada bulunmaktadır [6]. Proteazlar endüstrinin deterjan, protein, bira, fotoğraf, deri ve süt alanlarında oldukça çok kullanılmaktadır [8].

Proteazlar, doğada bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kalıntıların bozunmasında önemli rol oynamakta ve böylece besin döngüsünü sağlamaktadır. Ayrıca bitkilerin besinleri alabilmelerini sağlamaktadır [9]. Proteazlar kompleks enzimler grubunda bulunurlar. Proteazlar farklı fizikokimyasal ve katalitik özelliklere sahiptirler. Proteaz sentezinin hücrel kontrolünden sorumlu mekanizma henüz tam olarak bilinmemekle beraber alkali proteazların üretimi amino asit veya amonyum gibi etkenlerle hızlı bir şekilde metabolize edilebilen azot kaynakları ile baskılanmaktadır. Diğer ortam bileşenleri küçük şekerler ve mineraller enzim sentezini etkilemektedir. Potansiyel proteaz kullanımı ve maksimum enzim üretimi ile endüstriyel işlemlerin maliyetini düşürmek amaçlanmaktadır [9,10].

### **2.1.1. Proteazların adlandırılması ve sınıflandırılması**

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (International Union of Biochemistry) - Numaralandırma Komitesine göre proteazlar 3. sırada bulunan hidrolazlar sınıfındadır. Bununla birlikte proteazların, sahip oldukları geniş etki ve yapı farklılıklarından dolayı enzimlerin sınıflandırıldığı genel sistem ile sınıflandırılmaları da zordur. Sonuç olarak, katalizledikleri reaksiyon tipine göre,

aktif bölgelerinin kimyasal doğasına göre ve referans alınan yapıyla evrimsel ilişkisine göre 3 ana başlık altında sınıflandırılırlar [6].

- i. katalizledikleri reaksiyon tipi
- ii. katalitik bölgenin kimyasal yapısı
- iii. yapılarıyla ilgili evrimsel ilişki [11].

## 1. Katalitik Bölgedeki İşlevlerine Göre

### 1.1 Ekzopeptidazlar

#### 1.1.1 Aminopeptidazlar

#### 1.1.2 Karboksipeptidazlar

##### 1.1.2.1 Serin tipi

##### 1.1.2.2 Sistein tipi

##### 1.1.2.3 Metallo tipi

### 1.2 Endopeptidazlar

#### 1.2.1 Serin proteazlar

#### 1.2.2 Sistein proteazlar

#### 1.2.3 Aspartil proteazlar

#### 1.2.3 Metallo proteazlar

## 2. Aktif Bölgedeki Fonksiyonel Gruplara Göre

### 2.1 Serin proteazlar

### 2.2 Sistein proteazlar

### 2.3 Aspartil proteazlar

### 2.4 Metallo proteazlar

## 3. Kaynağına Göre

### 3.1 Bitkisel proteazlar

### 3.2 Hayvansal proteazlar

### 3.3 Mikrobiyal proteazlar

## Katalitik bölgedeki işlevlerine göre proteazlar

### *EKZOPEPTİDAZLAR*

Ekzopeptidazlar; peptit bağlarını substratın amino (- NH<sub>2</sub> ) veya karboksi (- COOH ) ucuna yakın bir yerden parçalar. Ekzopeptidazlar amino ucundan aminopeptidazlar (AP) ve karbonil ucundan karboksipeptidazlar (CP) katalizleyen türleri olmak üzere 2 alt sınıflara ayrılırlar.

Aminopeptidazlar (AP) amino ucundaki ilk iki kalıntıyı katalizleyen enzimler dipeptidil peptidaz, üç kalıntıyı katalizleyen enzimler tripeptidil peptidaz olarak sınıflandırılır. Aminopeptidazlar bitkisel, hayvansal ya da mikroorganizma kaynaklı olabilirler. Buldukları kaynaklarda sindirim, protein bağlanması, sinyal iletimi, peptid hormonlarının düzenlenmesi gibi fizyolojik ve patofizyolojik işlevlere sahiptirler. AP'lerin büyük çoğunluğunun optimum pH'sı nötral pH olup, optimal sıcaklıkları 37–50 °C civarında değişmektedir. Bazı AP'ler 100 kD'dan daha büyük molekül ağırlıklarına sahiptirler [12].

*Esheria coli*'den Aminopeptidaz I adlı enzim büyük bir proteazdır (400 kDa). Bu enzim ortam pH'ı 7,5'tan 10,5'e kadar geniş bir aralıkta aktivite gösterirken optimum aktivitesini ise Mg<sup>2+</sup> veya Mn<sup>2+</sup> varlığında gösterir. Bununla birlikte *Bacillus licheniformis* aminopeptidazının moleküler kütlesi 34 kDa'dır. Enzimin aktivitesi Co<sup>2+</sup> iyonları varlığında artar. Başka bir bakteri olan *B. stearothermophilus* 'tan saflaştırılan aminopeptidaz II enziminin molekül kütlesi 80 ile 100 kDa arasında değişen bir dimer yapıdır ve aktivitesi Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> veya Co<sup>2+</sup> iyonları varlığında artar.

Karboksipeptidazlar karboksil uçtaki son peptid bağına hidrolize ederler. Karboksipeptidazlar, metallo CP, sistein CP ve serin CP olmak üzere aktif bölgelerine göre üç gruba ayrılırlar. Serin CP ve AP aktif bölgelerinde tüm serin proteazlarda bulunan; Ser, Asp ve His amino asitlerinden oluşan bir katalitik üçlü grup içermektedir. Bunun yanı sıra; metallo CP ve AP, bir kofaktör olarak, çinko atomuna sıkıca bağlıdırlar [13].

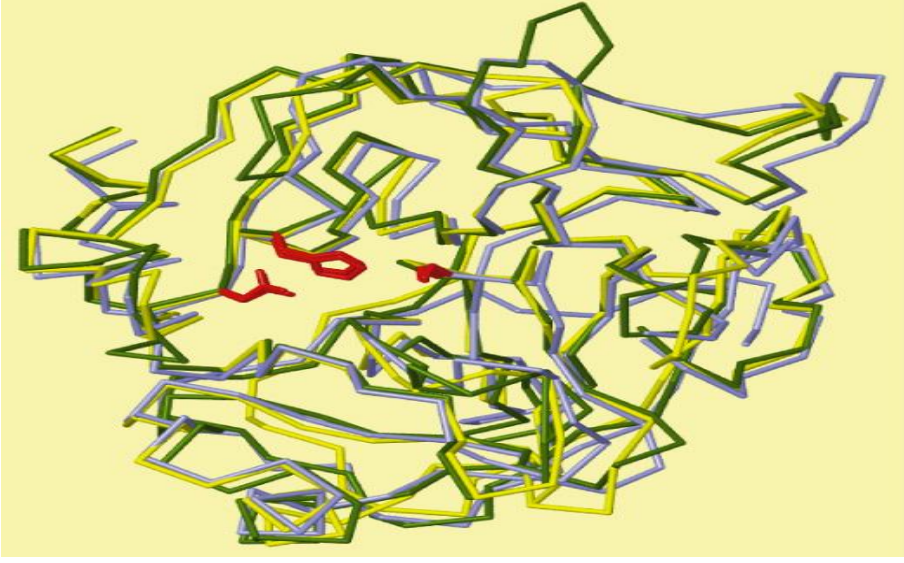
## *ENDOPEPTİDAZLAR*

Endopeptidazlar N ve C uçlarından uzak polipeptid zincirinin daha iç bölgelerinin peptid bağlarındaki işlevleriyle karakterize edilir. Endopeptidazlar, katalitik mekanizmalarına göre serin proteazlar (E.C. 3.4.21), sistein proteazlar (E.C.3.4.22), aspartat proteazlar (E.C.3.4.23) ve metallo proteazlar ( E.C.3.4.24 ) olmak üzere 4 ana grupta toplanmıştır [6].

### *Serin Proteazlar (E.C.3.4.21)*

Serin proteaz enzimlerinin aktif konumlarında, tepkimenin katalizlenmesini sağlayan serin grupları bulunur. Birçok substrata karşı spesifik olarak aktif olan serin proteaz enzimlerinin molekül ağırlıkları düşüktür. Serin proteazlar genellikle nötral veya alkali pH'larda aktiftirler. Birçoğunun izoelektronik noktası pI=4,4-6,2 arasındadır [15]

Serin proteazlar (EC 3.4.21), substrat tercihlerine göre 3 grupta toplanır. Tripsin benzeri serin proteazlar, pozitif yüklü amino asitten sonraki peptid bağına hidrolizlerler. Kimotripsin benzeri serin proteazlar, büyük hidrofobik aminoasitten sonraki peptid bağına hidrolizlerler. Elastaz benzeri serin proteazlar ise küçük hidrofobik aminoasitten sonraki peptid bağına hidrolizlemektedirler [6].



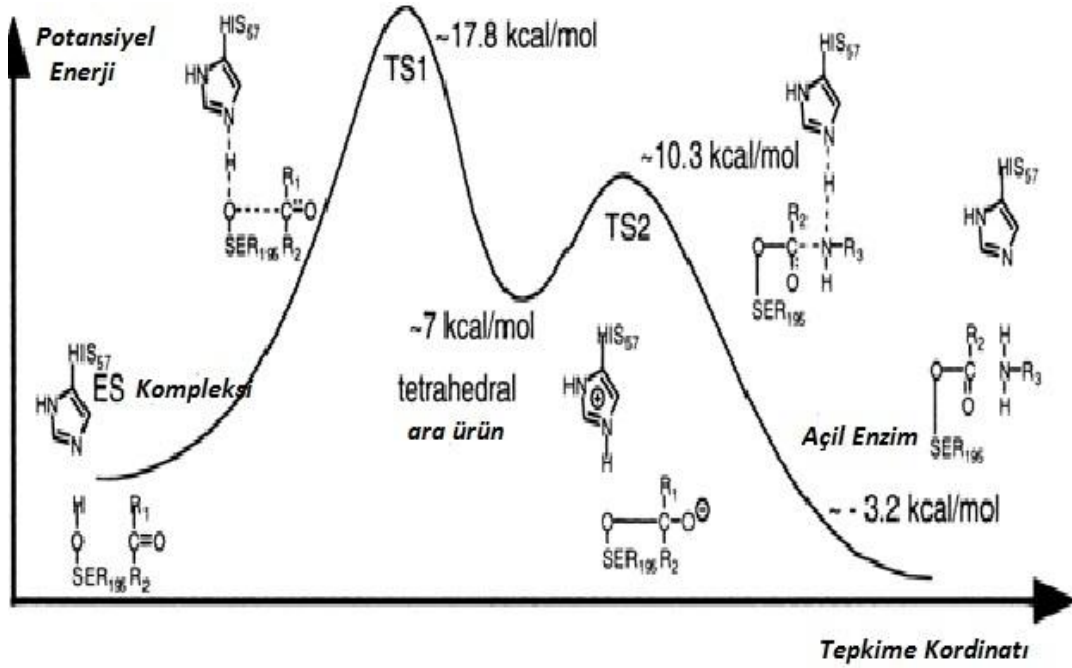
Resim 2.1.Serin enziminin üç boyutlu yapısının gösterimi ( Trypsin (sarı), Elastaz (yeşil) ve kimotripsin (mavi) omurgaları süperpozisyonu)

Kan pıhtılaşmasında serin proteazlar; Kan pıhtılaşması ve sindirim olaylarındaki bir peptit bağının yıkılması sırasında proteolitik enzimlerden en sık kullanılanı aktif bölgedeki serin protezdir. Kan pıhtıları, kanda inaktif bir öncül olan fibrinojen halinde bulunur. Fibrinojen ise bir fibrin proteindir. Serin proteaz türünde olan trombin fibrinojendeki peptit bağını kırarak aktif fibrin oluşur. Trombin kimotripsinde bulunan aynı aspartat-histidin-serin katalitik üçlüsüne sahip olup esas olarak aynı etkiyi yapar. Trombin aktif olmayan öncülü olan protrombin halinde de bulunmakta olup bu öncül, bir diğer kan pıhtılaşma aracı serin proteaz tarafından proteolitik kırılma ile aktive edilir [14].

Serin alkali proteaz enzimi endüstride daha çok *B.subtilis*, *B.amyloliquenfaciens* ve *B.licheniformis* bakterileri tarafından üretilmektedir. *B.licheniformis* tarafından üretilen enzim yaklaşık 270 tane amino asit içermektedir ve yapısında sistein amino asiti bulunmamaktadır. Serin alkali proteaz enziminin üretilmesini sağlayan SAP geni (subC) 1588 bp'den oluşmaktadır [15].

Çizelge 2.1. Serin alkali proteaz enziminin amino asit bileşimi

Amino asit	Amino asit sayısı	Amino asit bileşimi (%)
Alanin (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> )	40	14,59
Arginin (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	4	1,459
Asparajin(C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	18	6,569
Aspartik asit (C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub> )	9	3,284
Sistein (C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> NS)		0,000
Glutamin (C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	7	2,554
Glutamik asit (C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub> )	5	1,824
Glisin (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	35	12,773
Histidin (C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )	5	1,824
İzolözin (C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> )	10	3,649
Lözin (C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> )	16	5,389
Lizin (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )		3,284
Metionin (C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub> NS)	5	1,824
Lözin (C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> )	16	5,389
Fenilalanin (C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> )	4	1,459
Pirolin (C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> )	10	3,649
Serin (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> )	32	11,678
Treonin (C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> )	20	7,299
Triptofan (C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	1	0,365
Tirozin (C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	13	4,744
Valin (C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> )	31	11,313
<b>Toplam amino asit sayısı</b>	<b>274</b>	<b>100</b>

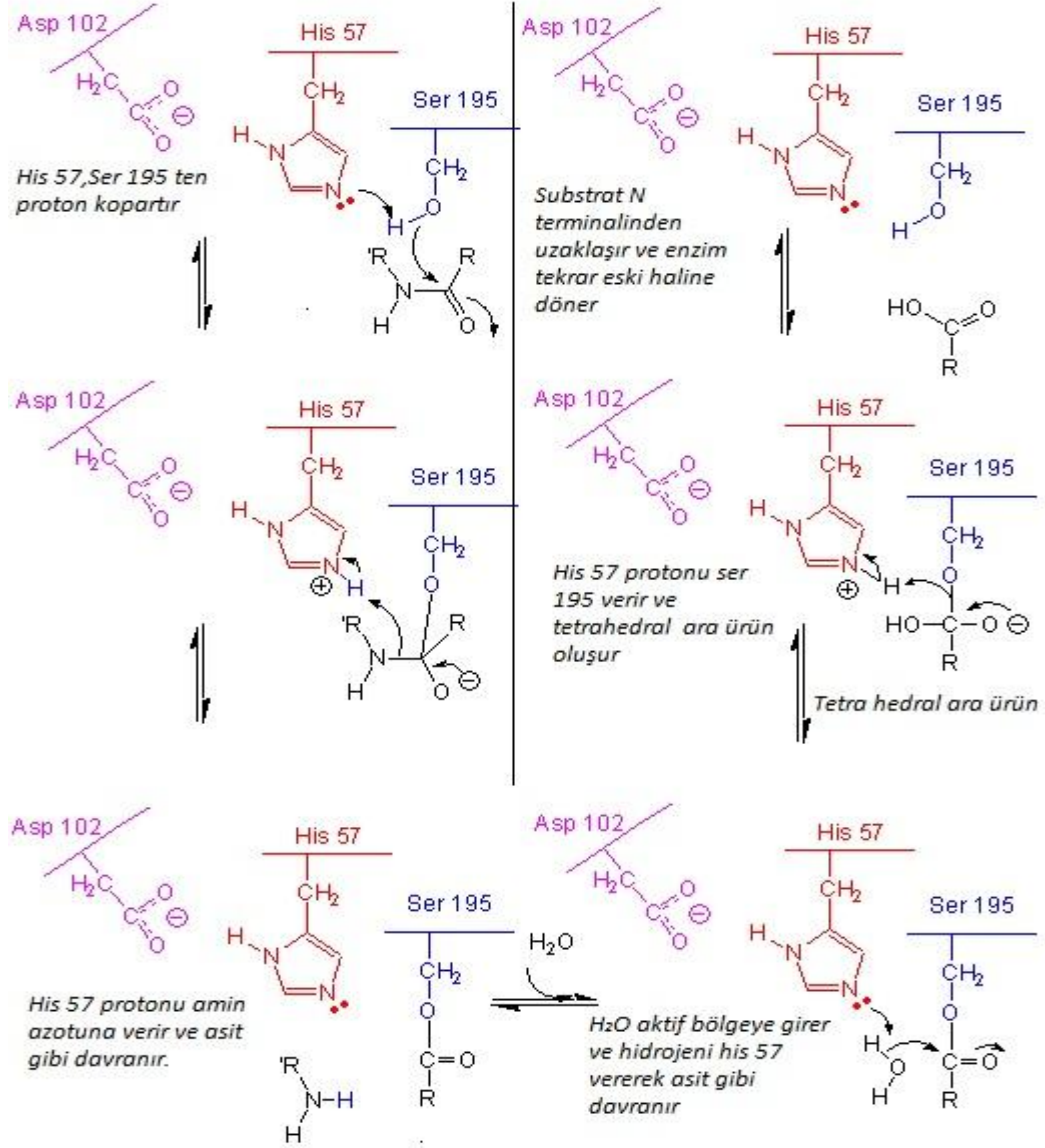


Şekil 2.2. Peptid bağı katalize eden serin proteaz reaksiyon mekanizması (tripsin)[84]

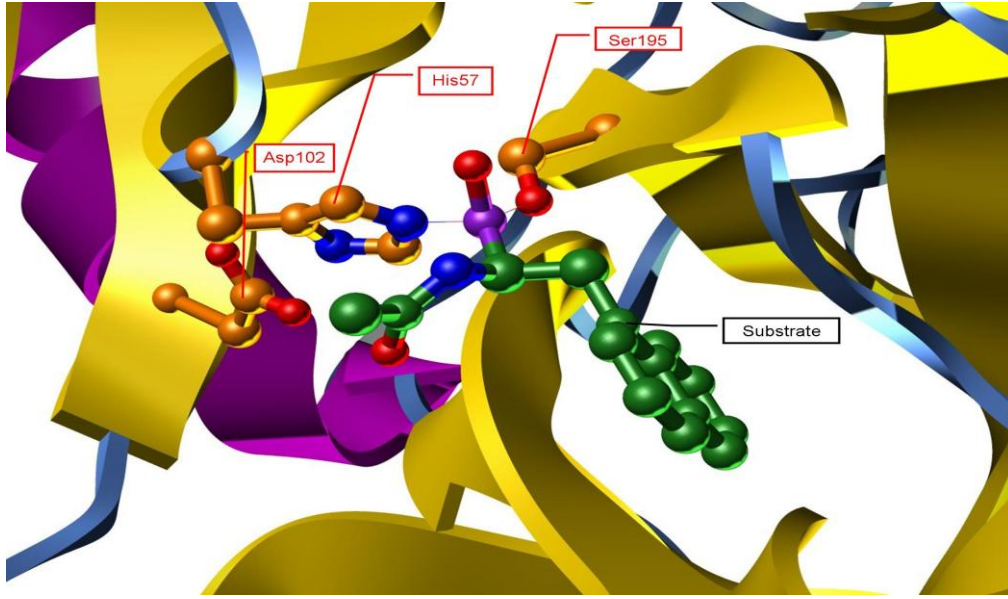
Mekanizmaya göre hesaplanan aktivasyon serbest enerji 17,8 kcal/mol ve bu reaksiyonun ekzotermik bir reaksiyon olduğu görülmektedir. Ser195 den His57 ye proton transferi ve substratın bölünebilir bağ karbonil grubuna Ser195'in nükleofilik katılma ile katıldığı gösterilmiştir. Bu reaksiyonda, protein ortamında ES kompleksi ile iştirakleştirildiğinde tetrahedral ara ürün tarafından aktivasyon serbest enerjisini düşürmek için önemli bir rol oynamaktadır. Polarizasyon enerji hesaplamaları enzim aktif bölge için protein kutup ana zinciri katkıları çok polar ortamda olduğunu göstermektedir. En önemli katalitik faktör aktif bölge içindeki protein parçaları ile tetrahedral ara ürün arasındaki elektro statik çekimdir.



Serin proteaz olan Kimotripsin katalitik mekanizması aşağıda verilmiştir [83].



Şekil 2.3. Serin proteaz olan Kimotripsin katalitik mekanizma şeması



Resim 2.2. Kimotripsin katalitik mekanizma şeması 3D gösterimi

#### Sistein proteazlar (E.C.3.4.22)

Sistein proteazlar hem ökoryatlarda hem de prokaryotlarda bulunur. Yaklaşık 20 tane sistein proteaz ailesi tanımlanmıştır. Sistein proteazların katalitik aktivitesi sistein ve histidin kalıntıları buldurmasına bağlıdır. Bu sistein ve histidin yapılarının düzenlenmesi her ailede farklılık göstermektedir. Genellikle sistein proteazlar sadece HCN veya sistein varlığında aktiftirler. Yan zincirlerinin spesifitesine göre 5 ana gruba ayrılırlar;

- (i) Papain benzeri
- (ii) Tripsin benzeri olanlar
- (iii) Glutamik asite özgü olanlar
- (iv) Legumin tipi kaspazlar
- (v) Katalitik bölgelerinde His, Glu/Asp, Gln, Cys kalıntıları içerenler.

Sistein proteazlar genellikle nötral pH'ya sahip olmalarına rağmen, lizozomal proteazlar asidik pH'ta aktiftir. PCMB gibi sülfhidril ajanlara karşı hassastırlar ama DFP ve metal şelatlaştırıcı ajanlardan etkilenmezler. Papain benzeri birçok sistein proteazlar molekül ağırlığı 20–35 kDa olan bağıl olarak küçük proteinlerdir [6, 16].

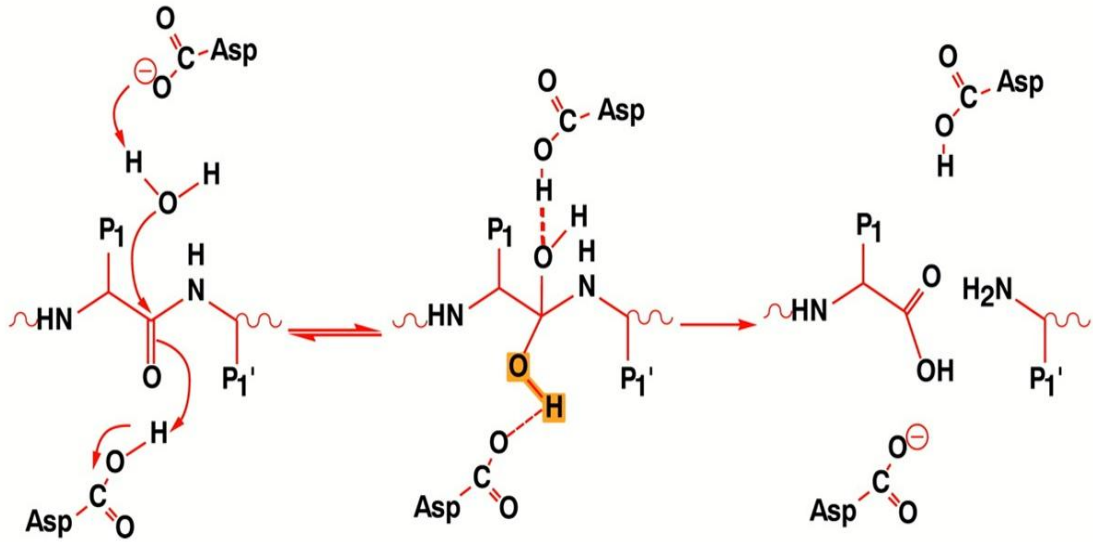
Papain (EC 3.4.22.2) en iyi bilinen sistein proteazdır. 1879 yılında Carica papaya'nin meyvelerinden izole edilmiştir ve aynı zamanda kristalografik yapısı belirlenen ilk proteazdır. Papaya meyvesinin kurutulmuş ham lateksi en az dört sistein proteazın (papain, kimopapain, karikain ve gisil endopeptidaz) ve diğer enzimlerin bir karışımını içermektedir. En kaliteli ve yüksek aktiviteli ham papainler yıl boyunca sürekli güneşli ve nemli bölgelerde bulunur. Papain 212 amino asidin üç disülfüd köprüsüyle birleşmesiyle oluşur ve 23,4 kDa molekül ağırlındadır. 8,75 izoelektronik noktasıyla nispeten basit bir proteindir.

#### Aspartik proteaz (E.C.3.4.23)

Aspartik proteazlar çeşitli substrat spesifikliği sergilerler fakat çoğunlukla iki hidrofobik amino asit kalıntısı arasındaki peptid bağlarının parçalanmasında en yüksek aktiviteyi gösterirler. Örneğin pepsin, parçalanacak olan peptid bağının her iki tarafında da aromatik kalıntılar içeren substratları tercih eder. Bir çok aspartik proteaz 323-340 amino asit kalıntısından oluşur. Aspartik proteaz polipeptidleri; yaklaşık iki kat simetriyle iki benzer lobun birleşmesiyle üçüncül bir yapı üretmek için katlanan iki homolog etki alanından oluşur. Bu loblardan ya da etki alanlarından her biri iki  $\beta$ - yapraktan ve iki kısa  $\alpha$ -heliksten oluşur. Altı sarmallı, antiparalel bir  $\beta$ -yaprağı tarafından iki etki bölgesine bir köprü kurularak ve birleştirilir. Aktif bölge; yan yana iki etki bölgesi tarafından oluşturulmuş ve yaklaşık yedi aminoasit kalıntısını içine alabilecek büyüklükte derin ve geniş bir çukurdur. Örneğin domuzlarda bulunan pepsinde iki katalitik aspartat kalıntısı, 32 ve 215 kalıntısı, aktif bölgedeki çukurun merkezinde bulunmaktadır. N-terminal etki alanında; aktif bölgeye kadar uzanan ve aktif bölgede substratın immobilize edilmesine yardımcı olabilecek bir " flap " oluşturur. Kimotripsin, tripsin ve diğer serin proteazlarla karşılaştırılmasına dayanarak; aspartik proteazların, aktif bölgede aspartat kalıntıları içeren kovalent enzim-substrat araürününün oluşmasıyla fonksiyon gösterebileceği varsayılmaktadır

Genelde asidik proteazlar olarak bilinen aspartil proteazlar katalitik aktiviteleri için aspartik asit kalıntılarına bağlı olan endopeptidazlardır. Bitki, bitki virüsleri ve

retrovirüslerde bulunurlar. Asidik proteazların doğada bulunabilirliği serin proteazlardan daha azdır. Asidik proteazlar 3 gruba ayrılırlar. Bunlar pepsin (A1) , retropepsin (A2), pararetrovirüslerden (A3) elde edilen enzimlerdir. A1 ve A2 nin birbirleriyle yakın ilgisi vardır fakat A3 bunlardan farklıdır. Aspartik asitler maksimum aktiviteyi pH 3-4 izoelektrik noktayı ise 3 ile 4,5 civarında gösterir. Molekül kütleleri 35-40 arasındır. Aspartik proteazlar pepsatin tarafından inhibe edilirler. Ayrıca; bakır iyonları varlığında diazoasetil-DL-norlösin metil ester (DAN) ve 1,2 epeoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan (EPNP) gibi diazoketon bileşiklerine karşı da hassastırlar [6].



Şekil 2.4. Aspartil proteaz mekanizması genel şeması

#### Metalo Proteazlar (EC.3.4.24)

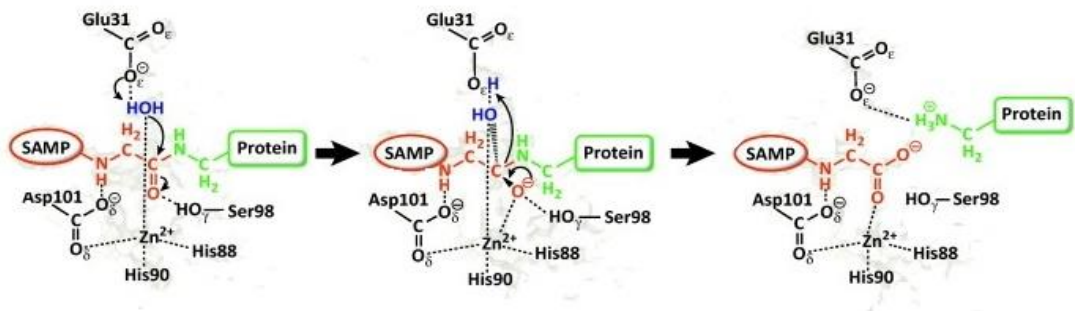
Metalo proteazlar, proteazların belki de en eski sınıfıdır. Diğer proteazlardan protein dizilimleri ve yapılarıyla ayrılmalarının yanı sıra aktiviteleri için çinko iyonuna gereksinim duymalarıyla karakterize edilirler. Bazı durumlarda, çinko; kobalt veya nikel gibi metallerle aktivitesini kaybetmeden yer değiştirebilir [17]. Yaklaşık otuz sınıfı tanımlanmıştır ve bunların on yedisi sadece endopeptidaz, on ikisi sadece ekzopeptidaz, biri hem endo hem de ekzopeptidaz içerir. İşlev spesifisitetlerine göre; nötral, alkali, *Myxobacter* I ve *Myxobacter* II olmak üzere dört gruba ayrılırlar.

Alkali metalo proteazlar çok geniş bir spesifisite gösterirken, nötral metalo proteazlar hidrofobik amino asitlere karşı spesifisite gösterirler. *Myxobacter* I, ayrılan bağın her iki tarafındaki küçük amino asit kalıntılarına karşı spesifik iken, *myxobacter* II peptid bağının amino tarafındaki lizin kalıntılarına spesifiktir. Genellikle EDTA gibi şelatlayıcı ajanlar tarafından inhibe olurlar, sülfhidril ajanlardan ve DFP'den etkilenmezler.

Matriks metalo proteazlar, doku morfogenezi ve farklılaşması sırasında hücre dışı matriks degradasyonunda önemli rol oynarlar ve kanser ve arthritıs gibi hastalıkların tedavisinde kullanışlı olabilirler [6].

Metallo proteazın katalitik etki mekanizması diğer proteazlardan farklılık gösterir. Aktivite göstermeleri için aktif bölgesinde metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar [31].

Metallopeptidazlarda çinko metal iyonu su molekülünü yerinde tutar ve yüklü aminoasit yan zincirleri metal iyonunun ligantları olarak iş görür. His, Glu, Asp ya da Cys kalıntıları ile oluşturulan kombinasyon aktif çinko bölgesinde üç çatalı (trident) bir yapı oluşturur ve aktif su molekülü koordinasyon küresini doldurarak tamamlar [18].



Şekil 2.5. Metallo proteaz mekanizması genel şeması

Metallo proteazlar yüksek organizmalarda kollogenaz, yılan zehirindeki hemorhagic toksin ve bakterilerde termolizin gibi proteazlar olarak canlılar arasında geniş yayılım göstermektedirler.

### 2.1.2. Proteaz enzim kaynakları

Proteazlar kaynağına göre, bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal olmak üzere üç farklı grupta incelenir. Bitki alemi, %43,85 proteaz bulundurmasıyla en yüksek sınıfa oluşturur. Bitkileri; %18,9'la bakteriler, %15,08'le mantarlar, %11,15'le hayvanlar, %7,42'le algler ve %4,41'le virüsler takip eder.

#### Bitkisel Kaynaklar

Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanılmasını, bitkinin yetiştiği iklim koşulları ve kültivasyon toprağının uygunluğu gibi farklı faktörler belirlemektedir. Ayrıca bitki tarafından proteazın üretilmesi zamana bağlı bir süreçtir. Papain, bromelain, keratinaz ve fisin en iyi bilinen bitki kaynaklı proteazlardır. Bitkisel kaynaklı proteazlar özellikle tropikal bitkilerden elde edilmektedir.

Bilinen en güçlü bitkisel proteaz kaynakları; papaya (*Carica papaya*), Ananas comosus, bazı incir türleri (*Ficus carica*, *Ficus glabrata*), enginar (*Cynara cardunculus*) ve soya fasulyesi (*Soya hispida*) dir [6].

Papain geleneksel bir bitki proteazıdır ve uzun bir kullanım geçmişine sahiptir. Bu enzim, subtropikal bölgelerin batısında ve orta Afrika-Hindistan'da yetişen *Carica papaya* bitkilerinin lateksinden elde edilir. Enzimin performansı; bitki kaynağına, büyüme için gerekli olan iklim koşullarına, enzimin elde edilmesi ve saflaştırılması için kullanılan yöntemlere bağlıdır [19].

Bromelain ananasın özsuyundan ve kökünden elde edilen proteolitik enzimdir. Bromelain de papain gibi etin yumuşatılmasında kullanılır. Modern terapide anti-inflamatuar, anti-trombotik ve fibrinolitik aktivite gösterir[20]. Sistein proteaz olarak da karakterize edilir ve pH 5-9 arasında aktiftir. İnaktive olduğu sıcaklık 70 °C' dir [6].

### Hayvansal Kaynaklar

Proteazların bir diğeri ve belki de çok öncelerden beri bilinen kaynağı hayvanlardır. En çok bilinen hayvansal kaynaklı proteazlar, pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve renindir.

Hayvanlardan elde edilen proteazların dağılımı;

2,38%	Metallo Proteaz
14,28%	Aspartik Proteaz
23,81%	Sistein Proteaz
26,19%	Serin Proteaz
33,33%	Karakterize Edilmemiş Proteazlar

Tripsin (EC 3.4.21.4), üç temel sindirim proteazından biridir. Sindirim sürecinde; tripsinle birlikte diğeri proteinazlar diyetle alınan protein moleküllerini, peptid ve amino asit bileşenlerine parçalarlar. Tripsin; (midede başlayan) sindirim işlemine, hafif alkali ortamıyla maksimum enzim aktivitesinin gösterilmesini sağlayan ince bağırsakta devam eder. Proteolitik bir enzim olan kimotripsin (ya da protein sindirim enzimi) memelilerin bağırsaklarında aktivite gösterir. Saf kimotripsin pahalı bir enzimdir ve sadece diyagnostik ve analitik uygulamalarda kullanılmaktadır. Son zamanlarda güvenli ağrı kesiciler olarak kullanılmakta olan kimotripsin tabletleri bulunmaktadır. Pepsin, protein yıkımı için mide mukozasında üretilen bir enzimdir. Pepsin bir aspartik proteazdır ve İnsan immünyetmezlik virüsü tip-1'in (HIV1) olgunlaşmasından sorumlu olan proteaza benzer. Rennin, tüm emziren memelilerin midelerinde inaktif prekürsörü olan prorennin şeklinde üretilen, pepsin benzeri bir proteazdır [19].

Kimotripsin (EC 3.4.21.1), memelilerin bağırsaklarında aktif olan proteolitik bir enzimdir. Karboksil gruplarındaki peptid bağlarının hidrolizinin katalizlenmesi 3 aromatik amino asidin biriyle (fenilalanin, tirozin ve triptofan) sağlanır. Saf kimotripsin pahalı bir enzimdir ve analitik uygulamalar için kullanılır [21].

Pepsin, (EC 3.4.23.1) gıda proteinlerini parçalamak için hemen hemen tüm omurgalıların midelerinde ana hücreler tarafından salgılanan asidik proteazdır. Keşfedilen ilk hayvansal enzimdir, ayrıca kristalize edilen ilk enzimler arasındadır. Aktif enzim, zimojen formu olan pepsinojenden HCl varlığında salınır. Pepsin bir aspartil proteazdır ve midenin pH'sı 2-4 arasındayken enzim pH 1-2 arasında optimum aktivite gösterir, pH 6'nın üzerinde inaktive olur ve iki hidrofobik amino asit arasındaki peptid bağlarının hidrolizini katalizler [6, 22].

### Mikrobiyal Kaynaklar

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir [23]. Bu mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmiştir.

Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin kullanımında, mikroorganizma kullanımını artırmıştır [24].

Mikroorganizmalar proteazları hücre içi ve/veya hücre dışı olarak üretebilmektedir. Hücre içi proteazlar sporlanma ve farklılaşma, enzimler ve hormonların olgunlaşması gibi çeşitli hücrel ve metabolik süreçler için önemlidir. Hücre dışı proteazlar hidrolitik ürünlerden yararlanmak ve hücre çevresindeki proteinlerin hidrolizi için önemlidir. Aynı zamanda çeşitli endüstriyel işlemlerde protein yıkımına yardımcı olması açısından da önemlidir [25].

Mikrobiyal proteazlar; bakteriyel, fungal ve viral proteazlar olarak üç grupta incelenebilirler.



Bakteri kaynaklı mikrobiyal proteazlar, başlıca nötral ve alkali ticari proteazların çoğu *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilirler. Bakteriyel nötral proteazlar, pH 5-8 arasında ve düşük sıcaklıklarda aktiftirler ve bağıl olarak düşük termotoleransa sahiptirler. Hidrofobik amino asit çiftlerine yüksek afiniteleriyle karakterize edilirler. Bazı nötral proteazlar metalloproteazlar grubuna üyedirler ve aktivite gösterebilmek için iki değerlikli metal iyonlarına ihtiyaç duyarlarken serin proteazlar şelat yapıcı ajanlar tarafından etkilenmezler [6].

Mantarlar geniş bir çeşitlilikte, geniş bir pH aralığında ve yüksek substrat spesifikliğinde proteazlar üretirler. Örneğin; *Aspergillus oryzae* asidik, nötral ve alkalın proteaz üretir. Ancak mantarlardan elde edilen enzimler, bakteriyel enzimlere göre daha düşük bir reaksiyon hızına ve daha kötü ısı toleransına sahiptirler. Viral proteazlar; virüslerin proteinlerinin işlenmesinde fonksiyonel tutulmalarının AIDS ve kanser gibi bazı ölümcül hastalıklara neden olmasından dolayı önem kazanmıştır. Serin, aspartik ve sistein peptidazlar çeşitli virüsler bulunmuştur. Virüsler tarafından kodlanan bütün peptidazlar endopeptidazdır; bunların hiçbiri metallopeptidaz değildir. Çoğu ticari proteazlar, özellikle nötral ve alkalın, *Bacillus* cinsine ait organizmalar tarafından üretilir [6].

Viral proteazlar AIDS ve kanser gibi ölümcül hastalıklara sebep olan virüslerin proteinlerinin işlenmesinde fonksiyonel tutulumlarından dolayı önem kazanmışlardır. Serin, aspartik ve sistein proteazlar çeşitli virüslerde bulunurlar. Virüslerin kodladığı peptidazların hepsi endopeptidazdır. Bunların hiçbiri metallopeptidaz değildir. Viral proteazlar, viral replikasyon ile birleşimi koordine etmek ve düzenlemek için optimize edilmişlerdir. Yapılan araştırmalarda en önemli nokta viral proteazların üç boyutlu yapısı ve sentetik inhibitörler ile etkileşimidir [6].

Ekstremofilik mikroorganizmalar; volkanların yüksek sıcaklıklarında, kutupların düşük sıcaklıklarında, çok düşük ve çok yüksek pH değerlerinde (pH 0-3 veya pH 10-12) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5-30) yaşamak için adapte olmuşlardır [26].

Bu şekilde farklı ekolojik koşullarda yaşayan mikroorganizmalar termofilik, asidofilik, alkalofilik ve halofilik bakteriler şeklinde sınıflandırılmıştır [28]. Buralarda yaşayan termoasidofilik ve alkalofilik bakterilerden elde edilen enzimler ekstrem pH ve sıcaklık koşullarına dayanıklı olduğu için endüstriyel alanda yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır [27].

Alkalofilik mikroorganizmalar yüksek alkali koşullara adapte olmuş mikroorganizmalardır ve alkalofiller ve alkalotolerantlar olarak iki ana gruba ayrılırlar. Alkalofiller terimi pH 10 ve üzerinde yaşayabilen optimal büyümesi pH 9 civarında olan ve pH 7 ve altında büyüemeyen organizmalar için kullanılır. Alkalotolerantlar ise pH 10'nun çok üzerinde büyüeyebilirler ama optimal büyüme pH'ları nötralite civarındadır. Alkalofilik mikroorganizmaların çoğu alkali proteaz üretir ve endüstrinin çeşitli alanlarında uygulama imkanı bulunur [78]. Bununla birlikte *Bacillus* türleri yüksek aktivitede çok büyük oranlarda enzim saklama yeteneğine sahiptirler ve çok çeşitli ortamlardan izolasyonları nispeten kolaydır [79]. Bakteriyel alkali proteazlar, geniş substrat spesifisitesi ve alkali pH'daki yüksek aktivitesiyle karakterize edilirler. Optimum sıcaklığı 60°C civarındadır ve pH 10'da optimuma sahiptirler. Bakteriyel alkali proteazların bu özellikleri onları deterjan endüstrisinde kullanmak için uygun kılar [6].

### **2.1.3 Proteazların endüstride kullanım alanları**

Proteazlar enzimlerin oldukça kompleks bir grubunu oluşturular ve oldukça farklı fizikokimyasal ve katalitik özelliklere sahiptirler. Proteaz sentezinin hücresel kontrolünden sorumlu mekanizma henüz tam olarak bilinmemekle beraber alkali proteazların üretimi amino asit veya amonyum gibi hızlı bir şekilde metabolize edilebilen azot kaynakları ile baskılanmaktadır. Diğer ortam bileşenleri küçük şekerler ve mineraller enzim sentezini etkilemektedir. Potansiyel proteaz kullanımı ve maksimum enzim üretimi ile endüstriyel işlemlerin maliyetini düşürmek amaçlanmaktadır [10, 29].

Proteazlar, toplam endüstriyel enzim ticaretinin yaklaşık % 60'ını oluşturmaktadır. Proteazlar, çamaşır deterjanları, deri, et, süt, ilaç, bira, fotoğraf, organik sentezlerde ve atıkların muamelesinde kullanılmaktadır. Proteazlar arasında bakteriyel proteazlar, hayvan ve fungal proteazlar ile karşılaştırıldığı zaman daha etkin olduğu görülmektedir [31]. Bu nedenle ticari ilgiden dolayı endüstriyel olarak uygun proteazları üreten mikroplar çok çeşitli habitatlardan araştırmacılar tarafından çalışılmıştır [30].

Alkali proteazlar, bakteri, küf, maya gibi çeşitli kaynaklardan elde edilse de [32], alkalifilik *Bacillus* biyoteknolojide en fazla kullanılan mikroorganizmadır, çünkü çok geniş çeşitli ortamlardan izolasyonu nispeten kolaydır. Bununla birlikte *Bacillus*, hem kompleks hem de sentetik mediumda gelişebilmektedir. Termofilik ve alkalifilik *Bacillus* tarafından üretilen alkalifilik proteazlar yüksek sıcaklık ve pH'ya dayanmaktadır [33,34,35].

Ayrıca *Bacillus* türleri post-eksponansiyal ve durgunluk fazlarında da ekstrasellüler proteazlar üretebilmektedir [10].

Mikroorganizmalardan elde edilen proteolitik enzimler dünya çapında deterjan endüstrilerinde en fazla kullanım bulan enzimlerdir. 30 yıl boyunca deterjanlardaki proteazların önemi küçük katkı maddesinden, anahtar bileşenlere değişmiştir. İyi bir deterjan enzimi oksitleme ajanı ve ağartıcılarla beraber stabilitesini koruyabilmelidir. Ticari olarak kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı ağartma/oksitleme ajanlarının varlığında stabilitesini koruyamamaktadır. Bu nedenle enzim tabanlı deterjanların daha iyi stabilizeye sahip olması için rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır. Bununla birlikte mikrobiyal çeşitliliği derinlemesine inceleyerek ticari olarak daha kullanışlı enzimler üretebilen mikroorganizmaların bulunma şansı da daima vardır [36]. Klasik olarak deterjanlar yüksek yıkama sıcaklıklarında kullanılmaktadır. Şimdilerde alkalik proteazların tanımlanmasında geniş sıcaklık aralıklarında etkili olması oldukça ilgi çekmektedir. Diğer taraftan günümüzde deterjan endüstrisi, yıkama sıcaklığının düşürülmesi ve deterjan kompozisyonunun değişmesi yönünde

çalışmalar yapmakta, fosfat tabanlı deterjanları uzaklaştırarak, deterjan uygulamaları için daha uygun yeni alkali proteazlar üzerinde durmaktadır [37].

Proteazların diğer ilginç bir kullanım alanı ise deniz Crustacea atıklarının deproteinizasyonudur. Kimyasal işlemlerin üstesinden gelmek için mikroorganizmaların veya proteolitik enzimlerin kullanılması üzerine çalışmalar yapılmaktadır [38]. Kitin ve türevleri çok yönlü biyolojik aktiviteleri ve ziraikimyasal uygulamalarından dolayı büyük ekonomik değere sahiptir. Deniz crustaceanları ise kitin bakımından oldukça zengindir. Klasik olarak deniz atık materyallerinden kitinin hazırlanması güçlü asit ve bazları kullanarak demineralizasyonu ve deproteinizasyonu gerektirmektedir. Bununla beraber kimyasalların kullanılması kitinin deasetilasyonunu kısmi olarak gerçekleştirmektedir. Kimyasal uygulamalar aynı zamanda atıksularda nötralizasyon ve detoksifikasyon yapılmasını gerektirmektedir. Bu nedenle kimyasal uygulamalardan doğan zararların üstesinden gelmek için alternatif olarak mikroorganizmaların kullanılması veya proteolitik enzimlerin kullanılması gündemdedir [39].

Deterjan endüstrisinde en fazla proteaz enzimleri kullanılır. Deterjanın raf ömrünün uzatılmasında da kullanılmaktadır. Yine deterjanlarda, yıkama veriminin artırılmasında ve elbiselerin yıpranmasının önüne geçilmesinde de büyük oranda kullanılmaktadır. Özellikle alkalın proteazlar bulaşık makinalarında kullanılan deterjanlarda kullanımında son zamanlarda hızlı bir şekilde artmıştır. Ve bu deterjanlarda değişik proteazlarda kullanılmaktadır.

Deniz solucanlarından saflaştırılan proteazlar lens solüsyonları ve kontak lenslerin temizlenmesini sağlar.

Deri sanayisinde de proteaz enzimleri kullanılır. Kullanılmasının sebebi kılların ve derinin proteinlerden oluşmasıdır. Bu nedenle proteazlar hayvan derisinin hidrolizlenmesini sağlarlar. Derilerin işlenmesinin hemen hemen her tabakasında

enzimler kullanılmaktadır. Özellikle derinin yünden arındırılması işleminde nötr proteazlar daha çok kullanılmaktadır.

İlaç sanayisi ise enzimlerin kullanım alanlarından en fazla olduğu alanlardan birisidir. Özellikle vücuttaki eksik enzim ihtiyacını karşılamak üzere kullanılır. Preteazlar ise sindirim sistemini destekleyecek ilaçlarda daha fazla kullanılmaktadır.

Yine saç bakım ve kozmetik ürünlerde her geçen gün ihtiyaç artmaktadır. Ayrıca diş diş sağlığı ve cilt bakımında da geniş bir kullanım alanları vardır. Tekstil sanayisinde yün ve ham ipeğin işlenmesi aşamalarında proteazlar büyük bir öneme sahiptir.

X-ray filmleri büyük oranda gümüş metali içermektedir. Bu filmlerin doğada bulunması çevrede büyük sorunlara yol açmaktadır. Bu nedenle bu filmlerdeki gümüş alkalin proteazlar kullanılıp hidrolizlenerek gümüş eldesi mümkündür.

Gıda endüstrisinde ise balık, bitki veya hayvan proteinlerini hidrolizlemede alkalin proteazlar kullanılmaktadır. Özellikle bağ doku proteinlerini ve kas lifi proteinlerini hidralizlemesinden dolayı etin ve bifteğin yumuşatılmasında kullanılır. Yine son zamanlarda gıda sanayisinde peynir üretiminde kullanılırlar. Yine bira yapımında serbest amino azot miktarını arttırmada proteaz enzimleri kullanılmaktadır. Bu sayede biranın kullanım ömrü uzatılmaktadır.

Doğada bol miktarda vücut atıkları mevcuttur. Bu atıklar bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen proteaz enzimleri sayesinde çevreye yararlı hale getirilmektedir [88].

## 2.2. Kaynak Araştırması

Siriporn ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada Tai balık sosunun mayalanmış ortamından izole edilen *Bacillus megaterium*'dan üretilen alkalin proteazı jel filtreleme teknikleri ile saflaştırmış ve son saflaştırmada enzimi 148 kat saflaştırarak spesifik aktivitesini 13,33 U / mg bulmuşlardır. Enzimi denatüre edici

ortamlarda molekül kütlesini 27kda bulmuşlardır. Proteaz aktivitesi için en uygun pH 10 ve sıcaklık 50 °C olarak bulunmuş. Kararlılık çalışmalarında ise 30-45°C arasında aktivitesinin %80'ni koruduğunu ayrıca pH 7,5-9,5 arasında stabil kaldığını gözlemlemiştir. Diizopropil florofosfat (DFP) ile tamamen inhibe olmasını serin protez olmasına bağlamışlardır. Fenilmetilsülfonil florid (PMSF), p-kloromercuribenzoik asit (PCMB), etilendiamintetraasetik asit (EDTA), 1, 10-fenantrolin ve Fe<sup>3+</sup> 'dan daha düşük güçlü bir şekilde aktivitesini % 15 inhibe etmiştir Enzimin aktivitesinin Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> ve Mg<sup>2+</sup> ve doğal substratlar varlığında artış gösterdiğini karakterize etmişlerdir [40].

Renganathan Rajkumar ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada kırmızı alg'den izole edilen *Bacillus megaterium* RRM2 tarafından üretilen alkalin serin proteazı saflaştırmışlardır. *B. megaterium* RRM2 elde edilen hücre dışı proteaz, amonyum sülfat çökeltmesi, jel filtrasyonu (Sephadex G100) ve Q-Sepharose sütun kromatografisi içeren üç aşamalı bir proses ile saflaştırılmıştır. Enzimi 36 kat saflaştırarak spesifik aktivitesini 3591,5 U / mg ve proteinin molekül kütlesini 27 kda olarak bulmuşlardır. Metal iyonlarından Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> ve Na<sup>+</sup> enzim aktivitesini artırırken Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> enzim aktivitesini azalmıştır. Enzim pH 9-10 aralığında ve sıcaklık 60°C kadar aktif kalmıştır. Fenilmetilsülfonil florid (PMSF) tamamen inhibe olduğundan alkalin serin proteaz olmasına bağlamışlardır. Aynı zamanda DTT'de enzimi inhibe etmiştir. Enzim, sodyum dodesil sülfat (SDS) varlığında yüksek derecede tolerans sergilediği için ticari bir deterjan enzimi olarak kullanılabilir olduğu bulunmuştur [41].

D.J. Mukesh Kumar ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları çalışmada süs bitkisi fidanlığından izole edilen *Bacillus subtilis* EAG-2 den hücre dışı proteaz saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir. Saflaştırma adımları olarak, amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE sefaroze anyon değişim kromatografisi yollarını takip etmişlerdir. Sonuçta %29 verimle enzimi 11 kat saflaştırmışlardır. %10 luk SDS PAGE ile enzimin molekül kütlesini 27 kDa bulmuşlardır. Saf proteazın optimum proteolitik aktivitesini pH 8,5 ve 65°C olarak tayin etmişlerdir. Kararlılık çalışmalarında ise 30-50°C arasında 1 saat boyunca aktivitesinin %80'nini koruduğunu ayrıca pH 6,5-9,0

arasında 4 saat boyunca stabil kaldığını gözlemlemişlerdir. PMSF inhibitörüyle enzimin neredeyse tamamen inhibe olmasını serin proteaz olmasına bağlamışlardır. Enzimin aktivitesinin  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ve  $\text{Ba}^{2+}$  ve doğal substratlar varlığında artış gösterdiğini karakterize etmişlerdir [ 42].

Ashis K. Mukherjee ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada çim ve patates kabuğu kullanarak katı hal fermantasyon (SSF) koşullar altında bir termofilik *Bacillus subtilis* tarafından üretilen alkalın protez enzimini saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir. Patates kabuğu ve *L.cylindrica* çim 1:1(W/W) oranındaki karışımdan *B. subtilis* üretmişlerdir. Proteaz üretimi için karışımın pH'ı 8,0 ayarlandı ve nemlendirici olarak en etkili damıtılmış su kullanıldı. Tabakalar arasında substrak olarak en çok tercih edilen kazein kullanılmıştır. Ham proteaz 37-45°C sıcaklık ve pH 8,0-9,0 aralığında optimum aktivite göstermiş. Enzim 60°C'de 15 dakika ısıtılması sonucu aktivitesini %67 korumuştur. Ham proteaz test edilen ticari çamaşır deterjanlarının çoğu ile önemli bir kararlılık ve uyum göstermiştir [43].

Ishtiaq Ahmed ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada batık fermantasyon tekniği ile *Bacillus subtilis* üretilen bir Alkali Proteaz saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmıştır. Pirinç kabuğu fermentasyon ortamında %4 (4mL/100mL) inokulum büyüklüğü, % 7 substrat konsantrasyonu, %2 melas ve pH 11'de 48 saat süra sonunda maksimum alkali proteaz aktivitesi  $216 \pm 4,32 \text{U/mL}$  olarak elde edilmiş. Alkalın proteaz amonyum sülfatla çökeltilme, diyaliz ve Sephadex-G-100 kolon kromatografisi ile 1,49 kat saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi 74,66 U/mg olarak bulunmuş. Enzim, sodyum dodesil sülfat poli-akrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile molekül ağırlığı 27kDa tesbit edilmiş. Optimum koşul olarak pH 10 ve sıcaklık 45°C olarak bulunmuş. Substrak olarak kazein kullanıldığında enzimin  $V_{\text{max}}$  148U/mL ve  $K_m$  değeri 58 $\mu\text{M}$  olduğu kayıtlara geçmiş. Enzim aktivitesini EDTA ve  $\text{Ca}^{2+}$  artırırken SDS, Tween-80,  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Hg}^{2+}$  değişken derecelerde azalmasına sebep olmuş. Bu nedenle, endüstriyel amaçlar için potansiyel olarak yararlı olabileceği sonucuna varılmış [44].

Qasim Khalil Beg ve Rani Gupta 2002 yılında yaptıkları çalışmada, *Bacillus mojavensis* üretilen ve oksidasyona dayanıklı serin alkali proeaz üretmişlerdir. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile moleküler kütlesi 30 kDa olarak bulunmuştur. pH 10,5 tamponu ile önceden dengelenmiş hızlı akış Q-sefaroze kolon anyon değişim kromatografisi kullanılarak 17 kat saflaştırılmıştır. N-terminal ucundan 15 amino asit ile alkalik proteazlar %91 benzerlik göstermiş. Enzim pH=10,5'da, sıcaklık optimumu 60°C'de gözlemlendi ve 48 saat için pH 7,0 – 11,5 olan geniş bir aralıkta kararlıymış. Proteazın yarı ömrü 60,65 ve 70°C'de sırasıyla 150,15 ve 7 dakikaydı. Çeşitli stabilizatörler ve katkı maddeleri proteazı 60°C'de 4 saatte ve 65°C'de 45 dakikada sabitledi. Fenilmetil, sülfonil florid(PMSF), bestatin,kimostatin,iyodoasetik asit ve N-bromosüksinimid gibi spesifik proteaz inhibitörleri, enzim aktivitesini tamamen inhibe ederken, tiol-bağımlı serin proteaz, enzim aktivitesi, 2-merkaptoetanol,glutatyon ve ditiyotreitolda mevcut olanın iki katındanda fazlasına yükseldi. Metal iyonları arasında, Cu<sup>2+</sup> ve Mn<sup>2+</sup> iyonları enzim aktivitesini % 36'ya kadar yükselmiştir. Bu enzim, piyasada mevcut bir çok laboratuvar ağartıcılar (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sodyum perborat), yüzey aktif maddeler (tweens, Triton X-100, sodyum kolat) ve çamaşırhanelerde kullanılan piyasadaki diğer deterjanlara karşı da kararlıydı. Bu proteaz , jelatin,elastin,albümin,hemogloblin ve yağsız süt gibi bir çok doğal protein yüzeyleri hidrolize etti, böylece etkili bir deterjan katkı maddesi olarak kullanım için uygun hale getirdi. Enzimin yıkama performansı analizi kan, böcek ve çim lekesi gibi çeşitli lekeleri 60°C'de en etkin şekilde temizlediğini gösterdi [45].

Aihua Deng ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada Yeni izole edilen alkalofilik *Bacillus sp* B001. den üretilen proteaz yüksek bir aktivite (34277 U / ml) göstermiştir ve saflaştırılan enzinmin molekül kütlesi 28kDa olarak bulunmuştur. Kısmi aminoasit dizileri tandem spektrometresi (MS / MS) ile elde edilmiş ve dejenere primer çifti bit 467-bp genomik diziyi çoğaltmak için geliştirmişler. Gözlenen ve tahmin edilen amino asit sekansları yüksek alkalik proteaz dizileri ile benzerlik göstermiş. Optimum pH 10 ve optimum sıcaklık 60°C olarak bulmuşlardır [46].



Amina Benkiar ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları çalışmada, yeni izole edilen *Bacillus circulans* suşu DZ100 den hücre dışı üretilen proteaz keratinolitik (SAPDZ) enzimini saflaştırmışlardır. Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon kütle spektroskopisi ile molakül kütlesi 32019,10 Da olarak bulunmuş. *Bacillus* proteazlar SAPDZ bölgesinin 25 N-terminal kalıntılarını dizisini ile yüksek bir benzerlik göstermiştir. Optimum aktivitesi pH 12,5 ve sıcaklık 85°C olarak bulmuşlardır. Bu enzim fenilmetansülfonil florid (PMSF) ve diiyodopropil florofosfat (DFP) ile tamamen inhibe edilmiş ve bu yüzden serin alkalın proteaz ailesine ait olduğunu bulmuşlardır. Üretilen proteaz keratinolitik (SAPDZ) enzimi diğer proteazlara göre daha geniş substrat özgülüğü ve daha katalitik verimlilik elde etmişlerdir. Hücre-dışı saflaştırılmış rekombinant enzim (rSAPDZ) ile *Escherichia coli* tarafından sergilenen özellikler ile benzerdir. Üretilen enzim deterjan formülasyonları içinde çevre dostu olarak kullanılabileceğini bulmuşlardır [47].

Anshu Gupta ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada, Hindistan'ın batı kıyısındaki bir alkalın proteaz üreticisi olan haloalkaliphilic bakteriden (Vel izole) izole edilmiş. Bu bakteri 16S r RNA gen sıralama, lipid profili ve diğer biyokimyasal özellikleri bakımından *Bacillus pseudofirmus* ile benzerdir. Bu bakterilerin salgıladığı proteaz hızlı akış Fenil Sepharose 6 kolonu üzerinde tek aşamalı bir yöntem ile % 82 verim ile 10 kat saflaştırılmıştır. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) göre molekül kütlesi 29 000 Da olarak bulunmuş. Enzimin Km ve Vmax sırasıyla 2mg/ml ve 289,8µg/dakika olarak bulunmuş. Enzim aktif pH aralığı 8,5- 12 iken optimum pH aralığı 10-11 olarak bulunmuş. Saflaştırılan enzim 45°C ve 50°C'de 40 dakikada sırasıyla %92 ve %95 aktivite göstermiş. Enzim yüksek NaCl konsantrasyonunda inhibe olmuş. PMSF tarafından tamamen inhibe olduğundan enzimin serin alkali olduğunu düşünülmüş. Aktivite SDS (% 0,1) ve Triton X-100 (% 0,1) ile hafif değişirken Tween 80 (% 0,1) ile sabit kalmış. Enzim Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> ve Mn<sup>2+</sup> İyonları ile aktivite göstermezken Ca<sup>2+</sup> (1 mM) ve Ca<sup>2+</sup> (5 mM) iyonları ile aktivite göstermiş. Deterjan bileşenleri ve yüzey aktif maddeler varlığında enzim kararlılığını korumuş [48].

Satya P. Singh ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada haloalkaliphilic *Bacillus sp* den izole ettikleri hücre dışı alkalın proteazın molekül kütleini 30-32kDa olarak bulmuşlar. Bakteri 16S rRNA gen sıralama yönünden *Bacillus pseudofirmus* ile benzer özellikler göstermiştir. Enzim pH 8,5 -12 arasında etkin ancak optimum pH 10-11 arası bulunmuş. Enzim 37°C oldukça kararlı iken 45°C de %50 aktivite, 55°C'den sonraki sıcaklıklarda ise çok kararsız olduğu tesbit edilmiş. Bununla birlikte enzimin NaCl ve CaCl<sub>2</sub> varlığında yüksek sıcaklıkta stabil özellik göstermiş. Farklı sürfaktanlar ile stabil iken SDS ve Triton X-100 küçük bir değişiklik gösterdiği tesbit edilmiş. Aktivite tek ve iki değerlikli metaller ile değişen ölçüde etkilenmiş. Proteaz invitro koşullarda üre ile denatüre olurken tekrardan denatüre olmuş protein üre ile renatüre olduğu kayıtlara geçmiştir [49].

Kemel Jellouli ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada *Bacillus licheniformis* MP1'den deterjan stabil alkalın serin-proteaz üç adımda saflaştırılmış: ultrafiltrasyon kullanılarak 10kDa ayırma membranı, Sephadex G-100 jel filtrasyonu ve MonoQ-Sefaroz iyon değişim kromatografisi ile 3,9 kat % 48,2 saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış enzimin ilk 14 amino asit N-terminal amino asit dizisi AQTVPYGIPLIKAD. Enzimin molekül kütlesi 30kDa olarak bulunmuş. Substrat olarak kazein kullanılarak enzimin optimum pH 10 ve optimum sıcaklık 70°C olarak bulunmuş. Enzim Tunus pazarındaki çeşitli çamaşır deterjanları ile yüksek kararlılık göstermiş ve enzimin (40 U / ml) çözeltisi kan lekesini temizlediği vurgulanmıştır. DNA dizisi belirlenmiştir. Saflaştırılan bu enzim amino asit dizisi olarak serin proteaz genleriyle benzerlik göstermiş ancak karakterizasyon olarak farklılıklar ortaya çıkmıştır [50].

Fatemeh Moradian ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada, İran topraklarında bulunan *Bacillus sp.* HR-08 bakterisinden alkalın proteaz saflaştırmışlardır. Proteazların biri amonyum sülfat çöktürme, DEAE-Sefaroz iyon değişimi ve Sephacryl S-200 jel filtrasyon kromatografisi ile üç adımda saflaştırılmış. SDS-PAGE ile enzimin molekül kütlesi 29kDa olarak bulunmuş. Optimum pH 10,0 ve optimum sıcaklık 60°C olarak bulunmuş ve enzim PMSF ile inhibe olurken sistein inhibitörlerinden etkilenmemiş bu nedenle enzimin alkalın

protez olduğunu düşünmüşler. Enzim 10mM CaCl<sub>2</sub> varlığında 50,60 ve 70°C sıcaklıklarında denatüre olmuş. Bu enzim, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, iyonik olmayan yüzey aktif madde ve yerel deterjanlar içinde iyi bir kararlılık göstermiş ve aktivitesi %20 dimetil sülfoksit (DMSO), dimetil formamid (DMF) ve izopropanol varlığında artmıştır. Enzim bu çözücülerin % 20 varlığında oda sıcaklığında 1 saat ön-inkübasyon sonrası başlangıç aktivitesinin % 90'dan daha fazlasını korumuş. Ayrıca, enzim DMF ve DMSO yüksek bir konsantrasyon (en az %50 v/v), ölçülebilir aktivite göstermiş[51]. M. Mala ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları çalışmada, topraktan izole edilen basillüs türlerinden alkalın proteaz saflaştırmışlar ve deterjan ve biyoyoumluluk için çalışmalar yapmışlar. Enzim amonyum sülfat (% 50-70doygunluk) ile kısmı olarak 8 kat saflaştırılmış. Kazein zimografi ve Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi(SDS-PAGE) ile kısmen saflaştırılmış enzimin Moleküler kütlesi sırasıyla yaklaşık 66 kDa ve 18 kDa olarak iki bant gözlenmiş. Enzim pH 12 ve sıcaklık 50°C 'de en yüksek aktivite göstermiş. Enzim pH 12 de 5 saat boyunca inkübasyona bırakılmış ve aktivitesinin %60' nı korumuş. Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA) varlığında proteaz aktivitesi artış göstermiş. Saflaştırılan proteaz enzimi yerel üç deterjanla (Kite, Tide ve Aerial) 3 saat inkübasyon sonrası aktivitesinin yaklaşık %70-80'ni, 30 ve 50°C'de sırasıyla %10, %20 aktivitesinin koruduğu belirtilmiş [52].

Wei Shen ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada, *Bacillus licheniformis*, AP-1 tarafından üretilen bir hücre-dışı alkalın proteaz, 76-kat saflaştırılmış ve SDS-PAGE ile molakül kütlesi 28 kDa olarak bulunmuş. Enzimin optimum pH 11 ve optimum sıcaklık 60°C (10 dakika boyunca test) olarak bulunmuş. Proteaz enziminin aktivitesi Ca<sup>2+</sup> ve Mg<sup>2+</sup> iyonları ile az bir artış gösterirken, fenilmetilsülfonil florid (PMSF) ve diizopropil florofosfat ile aktivite tamamen kaybolmuş [53].

Muhammad Nadeem ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları çalışmada, Mutant suşu *B. licheniformis* UV-9 tarafından üretilen alkalın proteaz saflaştırılmış ve karakterize edilmiş. Enzim amonyum sülfat çökeltme ve Sephadex G-100, jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak sipesifik aktivitesinde 36,84 kat artışla ve %11 geri kazanım ile saflaştırılmış. Molekül kütlesi SDS-PAGE ile 36,12 kDa olarak

bulunmuş. Substrat olarak kazein kullanılmış ve  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri sırasıyla, 5 mg / ml ve 61,58iM/ml/min olarak bulunmuş. Enzimin optimum pH 11 ve optimum sıcaklık 60°C kayıtlara geçmiş. Kararlılık çalışmalarında pH 8-11 ve sıcaklık 30-50°C'de aktivitesinin %80 koruduğunu ancak 10 mM  $Ca^{2+}$  varlığında pH 11 ve 60°C sıcaklıkta %90 dan fazla aktivite göstermiş. Fenil metil sülfonil florür (PMSF) varlığında aktivitesi tamamen kaybolduğundan serin alkalın proteaz olduğu kayıtlara geçilmiş. Metal iyonları arasında,  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  iyonları ile sırasıyla % 128 ve % 145 aktivite kazanmış. Saflaştırılan enzim, Tween-20, Tween-45, Tween-65 ve Triton ® X-45 gibi çeşitli yüzey aktif maddeler karşı aşırı kararlılık göstermiştir. Buna ek olarak, oksitleyici maddeler,  $H_2O_2$  ve sodyum perborat varlığında %100'den fazla aktivite göstermiş. Bu biyokimyasal özellikler *B. licheniformis* UV-9 'dan üretilen enzimin çamaşır deterjanları olarak potansiyel kullanımını olduğu yorumuna varmışlardır [54].

D.P.N. Rama Krishna ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada, *Bacillus subtilis* KHS-1'den ürettikleri enzimi amonyum sülfat ile çökeltme ve Sephadex G-200, jel adsorpsiyon kromatografisi ile iki aşamalı bir prosedür ile homojen bir hale getirilmiş. Molekül kütlesi SDS-PAGE ve 2D jel elektroforezi ile 26,3 kDa olarak belirlenmiş. Amino asit sıra dizisi tandem kütle spektrometrisi (MS / MS) ve MALDI TOF-TOF ile tayin edilmiş. Bu aminoasit sıra dizisi BSn5 from *Bacillus subtilis*, str.168, *B.subtilis*, BPN, *Bacillus amyloliquefaciens*, BAJ ,*Bacillus sp.* (41479) ve ADK from *Bacillus sp.* (11043) bakterilerinden saflaştırılan serin proteaz enzimleri ile benzerlik göstermiştir [55].

R. Agrawal ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları çalışmada, topraktan izole edilen *Bacillus sp.* Alkalın proteaz saflaştırılmış ve karakterize edilmiş. *Bacillus* S5 ve C3 izolatları çökeltme ve diyaliz ile saflaştırılmış. Hücre içi alkali proteaz enzimi izole S5 için 4 kat % 9,8 verim ile C3 ise yaklaşık 2 kat % 18 bir verim ile saflaştırılmış. Enzim için optimum koşullar pH 9 ve 40°C olarak belirlenmiş. Bu proteaz enziminin deri ve diğer sanayi kirliliğinin oluşturduğu ekonomik ve çevresel etkiyi azaltacağını düşünmektedirler [56].

Tanskul ve arkadaşı 2013 yılında yaptıkları çalışmada, *Bacillus subtilis* izolatlarının batırılma fermantasyonu (pH 10) ile hücre dışı üretilen serin alkali proteazın saflaştırılması karakterizasyonunu yapmışlar. Bu saflaştırma amonyum sülfat çökeltmesi, jel filtrasyonu ile iki basamaklı bir aşamada gerçekleşmiş. Molekül kütlesi Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile yaklaşık 30kDa olarak bulunmuş. Enzim 20-60°C'de aktif olup optimum pH 10,5 optimum sıcaklık ise 55°C olarak tespit edilmiş. Belirli katyonlarda  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  varlığında en yüksek aktivite göstermiş. PMSF ile tamamen inhibe olduğundan serin alkali proteaz olduğu kayıtlara geçilmiş. Bu alkali enzimin bu özellikler açısından endüstriyel uygulamalarda bir potansiyel olduğunu savunmuşlar [57].

C.G. Kumar 2002 yılında yaptığı çalışmada, *Bacillus pumilus* MK6-5' den ürettiği alkalın protez saflaştırılmış ve karakterize edilmiş. Bir alkalofilik olan *Bacillus pumilus* MK6-5 laboratuvar ortamında % 1 ters osmoz konsantre peynir altı suyu tozu, % 0,25 mısırlıkör, % 1 glukoz, % 0,5 tripton, % 1 sodyum sitrat, % 0,02  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ve %0,65  $Na_2CO_3$  içeren 35°C sıcaklıkta pH 9,6 250 devir/ dakika ve 1 vvm havalandırma ile 60 saat boyunca fermantasyon işlemi yapılmış. Enzim amonyum sülfat ile çöktürme, iyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografileri ile 36,6 kat %26,2 verim elde edilmiş. Saflaştırılmış enzimin molekül kütlesi SDS-PAGE ile 28kDa olarak bulunmuş. Enzim pH 11,5 ve sıcaklık 55-60°C en yüksek aktivite göstermiş. Sıcaklık 37°C ve pH 8'de  $K_m$  ve  $k_{cat}$  değerleri sırasıyla Glu-Gly-Ala-Phe-pNA için 1,1 mmol l-1 ve 624 s-1, Glu-Ala-Ala-Ala-pNA için 37 mmol l-1 ve 826 s-1 olarak bulunmuş. PMSF ile tamamen inhibe olması enzimin alkali proteaz olduğu yorumuna varmışlardır [58].

J Singh ve arkadaşları 2001 yılında yaptıkları çalışmada, İki yeni hücre dışı serin proteaz alkalofilik *Bacillus sphaericus*'den ultrafiltrasyon, amonyum sülfat çökeltme ve kromatografik yöntemlerin bir kombinasyonu ile homojen olarak saflaştırılmış. Enzimlerin substrat özellikleri benzerdi, ama hidrofobik ve moleküler kütle farklılık göstermiş. Enzim molekül kütleleri proteaz A 28kDa ve proteaz B 68kDa olarak bulunduğu için iki farklı alt birimden oluştuğunu düşünmüşler. Proteaz A'nın aktivitesi 5,1 U/mg, Proteaz B'nin ise 40,9 U/mg olarak bulunmuş. PMSF ile her iki

alt birimde inhibe olup tripsin ve kimotripsin inhibitörleri (TPCK ve TLCK) veya tiyol reaktifler (PCMB ve iyodoasetik asit) ile çok az inhibe olması enzimin serin proteaz ailesine ait olduğunu göstermektedir [59].

Dilek Kazan ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada, Bir hücre dışı alkali serin proteaz *Bacillus clausii* GMBAE 42'den pH 10,5 ve 37°C'de 3 gün boyunca proteince zengin şişe kültür ortamında üretilmiş. Proteaz saflaştırılması (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çökeltmesi ve DEAE-selüloz kromatografisi ile 16 kat %58 verimle saflaştırılmış. SDS-PAGE ile molekül kütlesi 26,50kDa olarak bulunmuş. Enzimin optimum sıcaklığı 60°C olarak bulunmuş ancak 5 mM Ca<sup>2+</sup> varlığında 70°C'ye kadar çıktığı gözlenmiştir. Enzim 30-40°C arasında pH 10,5 te 2 saat kararlıyken 50°C sadece %14 aktivite kaybı gözlenmiştir. Optimum pH 11,3 olarak bulunmuş. Enzim pH 9-12 arası ve sıcaklık 30°C 'de 24 saat kararlı iken pH 12,7'de %38 pH 13 te %76 aktivite kaybı gözlenmiştir. Saflaştırılmış enzim tarafından Hammarsten kazein hidrolizinin aktivasyon enerjisi 10,59 kcal olduğu bulunmuş. Enzim % 1 (w / v) Tween-20, Tween-40, Tween-60, Tween-80, ve % 0,2 (w / v) SDS varlığında pH 10,5 ve sıcaklık 30°C'de 1 saat kararlılık gösterirken aynı koşullar altında 1% sodyum perborat varlığında %10'un altında aktivite kaybı gözlenmiştir. Enzim iyodoasetat, etilasetimidat, fenilglioksal, iyodoasetimidat, n-etilmaleimidat, N-bromosüksinimid, dietilpirokarbonat ya da N-etil-5-fenil-iso-xazolium-3-sülfonat varlığında inhibe olmadığı vurgulanmaktadır. Enzim PMSF tarafından tamamen inhibe olduğundan alkalın proteaz olduğunu düşünmüşler.  $K_m$  ve  $k_{cat}$  değerleri sırasıyla 0,655 µM N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ve  $4,21 \times 10^3$  /dakika olarak bulunmuş [60].

Mukesh kumar ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada. Toprakta elde edilen amilolitik ve proteolitik bakteri olan *Bacillus sp.* HPE 10 dan saflaştırma işlemi yapılmış. Bergey'in manuel ve 16S rDNA dizi analizi kullanılarak *Bacillus sp* karakterize edilmiş. Besi yeri olarak glikoz ve pepton kullanılarak pH 9 ve sıcaklık 45°C olarak ayarlanmış ve 120 saat inkübasyona bırakılmış. Enzim kolon kromatografisi ile saflaştırılmış ve molekül kütlesi SDS-PAGE ile 30kDa olarak bulunmuş. Enzim pH 9 ve sıcaklık 45°C en yüksek aktivite gösterdiği belirtilmiş [61].

B Lalitha Kumari ve arkadaşı 2013 yılında yaptıkları çalışmada, *B. licheniformis* B18 den saflaştırdıkları proteaz enziminin optimum koşullarını pH 10 ve sıcaklık 50°C olarak bulunmuş, ancak enzimin pH 5-12 sıcaklık 30-70°C arasında kararlı olduğunu vurgulamışlar. PMSF enzimi inhibe ettiğinden dolayı alkaline proteaz olarak düşünülmüş.  $Ca^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  enzim aktivitesi az miktarda arttırmış. Proteaz  $CaCl_2$ , glisin ve temizlik maddeleri varlığında kararlılığını sürdürdüğü ve çoğu deterjan ile 3 saat sonra bile aktivitesini %20-40 koruduğu bildirilmiş. Deterjanlara enzim ilavesiyle kumaştaki kan lekesini tamamen temizlediği bildirilmiş. Enzim Michaelis-Menten kinetik ve görünür  $K_m$  değeri  $3,2 \text{ mg ml}^{-1}$  olarak saptanmış [62].

Ibrahim ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada, *Bacillus pumilus* TMS55 tarafından üretilen ve kofaktör olarak  $Mn^{2+}$  iyonunu kullanan bir alkaline serin proteazının saflaştırılması ve karakterizasyonu incelenmişler. Enzim amonyum sülfat çökeltme ile ardından ham enzim jel filtrasyon ve katyon-değişim kromatografisi kullanılarak, üç adımda saflaştırılmış. Molekül kütlesi 35kDa olarak tespit edilirken pH 7-12 arasında aktif olduğu kayıtlara geçilmiş. Ancak pH 7,5-11,5 arasında kararlılığını korurken optimum sıcaklık 60°C olduğu belirtilmiş. PMSF ve 1 mM AEBSF ile inhibe olduğundan serin alkali proteaz olduğu kayıtlara geçilmiş.  $Mn^{2+}$  iyonu enzimin aktivitesini ve kararlılığını arttırmış. Buna ek olarak saflaştırılmış proteaz oksidanlar ( $H_2O_2$ , % 2) ve organik çözücülerle (% 25) (benzen, heksan ve toluen gibi) kararlılığını koruduğu bildirilmiş. Bu nedenle ticari uygulamalarda geniş bir yer kaplayacağını vurgulamaktadırlar [63].

Fujiwara ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada, bir alkaliphilic termofilik *Bacillus sp* B18 'DEAE ve CM-Toyopearl 650M sütun kromatografisi . kullanılarak ısıya dayanıklı alkaline proteaz saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ve jel filtrasyonu ile belirlenen enzimin moleküler kütleleri sırasıyla 30 000 Da ve 28 000 Da olarak bulunmuş. Kazein substratına optimum pH 11-12 sıcaklık ise 85°C olarak bulunmuş. pH 5-12 arasında kararlılığını korurken, pH 10 ve sıcaklık 70°C 1 saat inkübasyona bırakıldığında aktivitesinin %60'ını koruduğu bildirilmiş.  $Ca^{2+}$  iyonu ilave edildiğinde ısıya karşı dayanıklılığı artmış. Enzim aktivitesi DFP ile inhibe

edildiğinden enzimin, bir serin proteaz olduğunu öne sürülmüş. NH<sub>2</sub>-terminal ucundaki 20 amino asit kalıntıları alkaliphiles (%40-50) , *Bacillus sp.* No. AH-101 (95%) ve *Thermoactinomyces sp.* HS682 (95%) den üretilen alkali proteazlar ile benzerlik gösterdiği kayıtlara geçmiş [64].

Laura Dipasquale ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları çalışmada, *Bacillus thermantarcticus* M1'den hücre dışı proteaz saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Molekül kütlesi yaklaşık olarak 42kDa olarak bulunmuş. Fenil metil sulphonylfluoride (PMSF) ile tamamen inhibe olduğundan enzim, serin proteaz ailesine ait olduğu düşünülmüştür. Enzim geniş bir pH aralığında stabil iken optimum pH 7 ve optimum sıcaklık 70°C olarak bulunmuş. 24 saat boyunca 70°C stabil olduğunu ve CaCl<sub>2</sub> varlığında 4 katına çıktığı tesbit edilmiş. Proteaz çeşitli ticari deterjanlar ile CaCl<sub>2</sub> varlığında, 3 saat inkübasyondan sonra, aktivitesinin yaklaşık % 50'si korunmuş. Saflaştırılmış proteaz DMSO, metanol, etanol, asetonitril, izopropanol mevcudiyetinde bir hafta boyunca kararlı olduğu bulunmuştur [65].

Raja Noor Zaliha Abd. Rahman ve arkadaşlarının 1994 yılında yaptıkları çalışmada, çürümüş palme dallarından izole edilen bir termofilik *Bacillus stearothermophilus* F1'den proteaz saflaştırılmış ve karakterize edilmiş. İzole edilen proteaz, ısı işlem, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi ile 128-kat spesifik aktivitesinde artış ve % 75 geri kazanım ile homojen bir hale getirilmiştir. Bir serin-tipi enzim olan proteaz, Molekül kütlesi sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi 33 500, jel filtrasyon kromatografisi ile 20 000 arasında bir bağlı moleküler kütleye sahip olduğu bulunmuş. Enzim pH da en yüksek aktiviteyi gösterirken 70°C'de ve pH 8-10 arasında 24 saat kararlı olduğu vurgulanmış. Birçok çözünür ve çözünmez protein maddelerinin hidroliz yeteneğine sahip olmasına rağmen hiçbir esteraz aktivite göstermediği tespit edilmiş. Enzim Co<sup>2+</sup> ve Hg<sup>2+</sup> iyonları ile inhibe olurken, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> ve Sr<sup>2+</sup> iyonları ile çok az yada hiç inhibüsyona uğramamış. Ancak Mn<sup>2+</sup> aktiviteyi kuvvetli bir şekilde arttırmış. Yüksek sıcaklıktaki kararlılığı ise t<sub>1/2</sub> (85° C) = 4 saat , (90° C) = 25 dakika olarak bulunmuş. Daha yüksek



sıcaklıklarda (85 ° C üstünde)  $Ca^{2+}$  iyonu varlığında kararlı olduğu kayıtlara geçmiş [66].

Shui-Tein Chen ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları çalışmada, *Bacillus stearothermophilus strain* TLS 33'den S,N ve B olmak üç farklı proteaz enzimi saflaştırılmış. Bu enzimler lizin afinite kromatografisi, güçlü anyon değişimi Q-HyperD kromatografisi ve Ultra jel AcA44 jel filtrasyon ile saflaştırılmış. Enzimlerin moleküler kütleleri SDS-PAGE ve zimografi sırasıyla yaklaşık 36, 53 ve 71 kDa olarak tesbit edilmiş. S proteaz lizin afinite kolonuna sıkı bir şekilde bağlandığından tek basamakta saf olarak elde edilmiş. Optimum pH S,N ve B için sırasıyla 8,5 7,5 ve 7,0 olarak bulunmuş. Optimum sıcaklık ise sırasıyla 75, 80 ve 90 olarak bulunmuş. Bu S,N,B üç enzimde pH 7,0'da sırasıyla 72, 78 ve 90°C sıcaklıklarda 30 dakikada aktivitelerinin yarısını kaybetmişler. Her üç termo proteazlar metal şelatlar EDTA ve 1,10-fenantrolin ile güçlü bir şekilde inhibe edilmiştir ve proteolitik aktiviteleri  $ZnCl_2$  ilavesi ile geri kazanılmıştır [67].

Bassem Jaouadi ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan çalışmada, *Streptomyces sp.* strain AB1'den keratinolytic alkalın proteaz (KERAB) izole edilmiş. MALDI-TOF kütle spektrometresi analizi sonucuna göre saf enzimin moleküler kütlesi 29,85kDa olarak tesbit edilmiş. Enzimin,  $NH_2$ -terminal dizisi TQANPPSWGLDDIDQTAL olduğu tespit edilmiştir. Fenilmetansülfonil florür (PMSF) ve diiyodopropil florofosfat (DIFP) tarafından tamamen inhibe olmasından serin proteaz ailesine ait olduğunu göstermektedir. Substrat olarak keratin kullanılmış ve optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 11,5 ve 75°C olarak bulunmuş. KERAB organik çözücülere karşı ve deterjanlara karşı yüksek direnç ve istikrar sergileyip ve tüyleri tamamen parçalamış. Bu özellikler enzimin deterjan formülasyonlarında, deri işleme sanayisinde ve susuz peptid biyokatalizinde gelecekteki uygulamalar için potansiyel olabileceği düşünülmüş [68].

Folasade M. Olajuyigbe ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada, Nijerya da sıcak kaynaktan izole edilen *Bacillus licheniformis* LHSB-05 üretilen bir alkalın proteaz, amonyum sülfat çökeltmesi ile Sefarsil S-300 jel filtrasyon kromatografisi

ile, 2 aşamalı bir prosedürde saflaştırılmıştır. Enzim % 6,6 'lık bir verim ile 13.4 kat saflaştırılmış ve , SDS-PAGE ile molekül kütlesi 16 kDa olarak bulunmuş. Optimum sıcaklık 50°C ancak enzim 60 ° C 'de aktivite % 90'ını, 70° C ise % 45 aktiviteye sahip bulunmuş. Bu enzim, 60 dakika inkübasyon süresince 50° C'de % 100 termal kararlılık sergilerken ve 60°C'de %80 istikrar sağlamış. Proteaz optimum pH değeri 9,0 ve pH 10,0-12,0 arasında % 71-81 arasında nispi aktivite göstermiştir. Enzim, Al<sup>3+</sup>, Zn<sup>2+</sup> ve etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) mevcudiyetinde aktivitesinin stabil olduğunu, ancak Ca<sup>2+</sup> ilavesi %27, Mg<sup>2+</sup> ilavesinin %9 arttırdığı bulunmuş. Hg<sup>2+</sup> eklendiğinde enzim aktivitesinin %83 kaybolduğu gözlenmiş. Bu özellikler *B. Licheniformis* LHSB-05'den üretilen proteaz enziminin deterjan sektörlerinde kullanım için uygunluğunu göstermektedir [69].

### **3. DENEYSEL KISIM**

#### **3.1. Kullanılan Kimyasallar**

Tez çalışması boyunca kullanılan kimyasallar; MERCK (Darmstadt, Almanya) Riedel-de Haen (Almanya), Sigma-Aldrich ( USA ), Schering-Kahlbaum (Berlin, Almanya) firmalarından temin edildi.

#### **3.2. Kullanılan Mikroorganizma**

Kullanılan bakteri Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Biyolojik Ürünler Araştırma-Geliştirme laboratuvarından temin edilmiştir. Mikroorganizma 1973 yılında dondurularak koleksiyona dahil edilmiştir.

#### **3.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar**

- Hassas Terazî (shimadzu)
- Soğutmalı Santrifüj (sigma 3-30K)
- Manyetik Karıştırıcı (Heidolph MR 3001 K)
- pH metre (Hanna Instrument pH300)
- Buzdolabı (vestel)
- Spektrofotometre (optizen)
- Kromatografi Kolonu (Bioplot Pharmacia FPLC)
- Elektroforez Tankı (Bio-Rad Protean Iixi Cell)
- Vorteks (FISONS)
- Çalkalamalı İnkübatör (Shel-Lab)
- Otoklav (Alp)
- Çalkalamalı Su Banyosu (Clifton)
- Otomatik pipetler (Ependorf)

### 3.4. *Bacillus megaterium*'un Çoğaltılması ve Proteaz Üretimi

Bakterinin çoğaltılması ağırlık/hacim olarak %0,5 maya ekstraktı,%1 pepton , %1 glukoz %1 tripton kullanılarak hazırlanan besi yerinde gerçekleştirilmiştir. Besi yerinin pH'sı 8 olarak ayarlanmıştır. Besi yeri 121 °C de,1 atmosfer basınçta, 15 dakika steril edildikten sonra ilk ekim yapılmış ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Protez üretimi için 250 ml'lik erlenlere 50 ml besi yeri içerecek şekilde hazırlanan kültür ortamına 0,5 ml aşı kültürü ilave edilmiş ve 37°C'de 135 rpm'de 24 saat inkübe edilmiştir.

### 3.5. *Bacillus megaterium*' dan Alkali Proteaz Enziminin Saflaştırılması

Fermentasyon sonrasında *Bacillus megaterium* +4°C 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek hücre izolatlarının ortamdan uzaklaşması sağlandı. Ham ekstratın toplam protein miktarı kısım 3.7'de anlatılan Bradford yöntemiyle belirlendi. Ham ekstratın proteaz aktivitesi ise kısım 3.6'da anlatılan yöntemle göre tayin edildi.

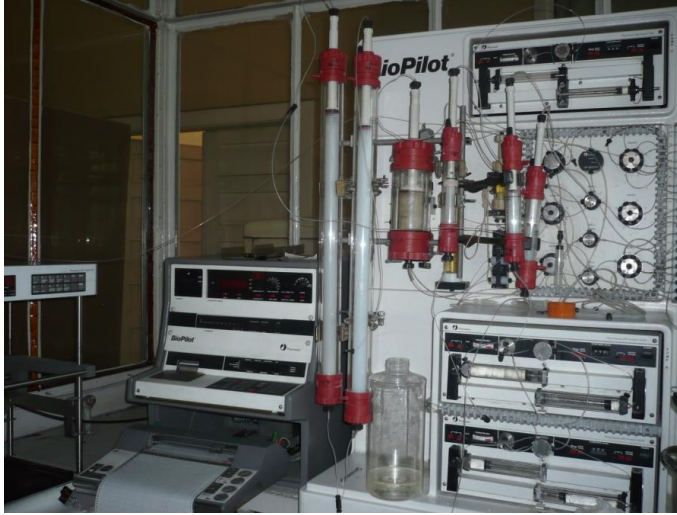
#### 3.5.1. Amonyum sülfatla çöktürme

Santrifüjde üst fazda kalan sıvıya +4 °C'de %80 amonyum sülfat ilave edilerek çözünmesi sağlandı. Çözündükten sonra +4 °C'de gece boyu bekletildi Bekletilen sıvı, 13000 rpm'de 15 dakika +4 °C'de santrifüjlendi ve çökelti 50mM pH 12 glisin-NaOH tamponuyla mümkün olan en düşük hacimde çözüldü. Elde edilen çözelti por çapı 32000 Da olan diyaliz torbalarına konuldu ve aynı tampona karşı gece boyu diyalizlendi. Amonyum sülfatla çöktürülüp diyalizlenmiş enzim örneğinin aktivite testi kısım 3.6'da anlatıldığı yapıldı. Örneğin toplam protein miktarı ise kısım 3.7'de anlatılan Bradford yöntemine göre belirlendi [70, 71].

#### 3.5.2. DEAE selüloz anyon değişim kromatografisi

1,6×20 cm'lik DEAE (dietilaminoetil) selüloz kolonu, kolon hacminin 5 katı miktarda 50 mM pH 12 glisin-NaOH tamponunun geçirilmesiyle dengelendi (Resim

3.2).Dengelenmiş olan DEAE selüloz anyon değiştirici kolona, % 80 amonyum sülfat çöktürmesi yapılıp gece boyu tamponda diyalizlenmiş örnek yüklendi. 5 ml örnek, 3 ml/min akış hızında kolondan elüe edildi ve fraksiyonlar 90 saniye aralıklarla toplandı. 1 M NaCl eşliğinde lineer gradient uygulandı ve tuz 25. dakikadan itibaren geçirilmeye başlandı. Fraksiyonlardaki protein miktarı kısım 3.7'de anlatıldığı gibi 280 nm'de ölçüldü, fraksiyonlara kısım 3.6'da anlatıldığı gibi enzim aktivitesi testi uygulandı ve aktivite gösteren fraksiyonlar toplanarak enzim havuzu oluşturuldu. Toplanan fraksiyonlardaki toplam protein miktarı kısım 3.7'de anlatılan Warburg & Christian yöntemiyle belirlendi.



Resim 3.1. Bioplot Pharmacia FPLC ve fraksiyon kolektörü

### 3.6. Proteolitik Enzim Aktivitesinin Tayini

Proteaz aktivitesi, Takami ve ark. (1989) daha önce rapor ettikleri yöntemin kısmen modifiye edilmesiyle belirlendi. Seyreltik 0,5 ml enzim örneği çözeltisi, 50 mM pH 12 glisin-NaOH tamponunda hazırlanmış %0,6 (w/v) 2,5 ml kazein çözeltisi ile karıştırıldı ve 40 °C'lik su banyosunda 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda, tüpteki karışıma TCA çözeltisi (0,11 M trikloroasetik asit, 0,22 M sodyum asetat ve 0,33 M asetik asit) ilave edildi ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek reaksiyonun durması sağlandı. Daha sonra karışım süzgeç kağıdı ile süzüldü ve süzüntüden 0,5ml alınarak üzerine 2,5 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi ve %50 (v/v) 0,5

ml Folin-Ciocalteu çözeltisi eklendi. Karışım oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi ve daha sonra absorbans değerleri 660 nm’de köre karşı (50 mM pH 12,0 glisin-NaOH tamponu) ölçüldü. Enzim aktivitesi daha önce oluşturulmuş tirozin standart grafiğinin eğimi yardımıyla hesaplandı. Bir ünite proteaz enzimi aynı şartlarda 1  $\mu\text{g min}^{-1}$  tirozin açığa çıkartan enzim miktarı olarak tanımlandı [72].

### 3.7. Warburg & Christian ve Bradford Yöntemleriyle Protein Miktarı Tayini

Kromatografi işlemleri sonunda kolondan alınan elüsyonların protein tayini Warburg & Christian yöntemine göre yapıldı. Bu yöntemde 280 ve 260 nm’de absorbanslar alınıp sırasıyla 1,5 ve 0,76 düzeltme katsayılarıyla çarpılıp birbirinden çıkarılır. Bu metodun esası, 280 nm’de proteinlerin yapısında bulunan fenilalanin, triptofan ve tirozinin maksimum absorbans göstermelerine dayanır [73].

Kromatografi işlemleri dışındaki tüm adımlarda protein tayini Marion M. Bradford’un 1976’da önerdiği, Coomassie Blue G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinde değişik şiddette mavi renk ortaya koymasına yönelik yöntemle gerçekleştirildi. Coomassie G-250 boyası fosforik asitli ortamlarda proteinlere bağlanır ve oluşan kompleks 595 nm’de maksimum absorbans verir. Coomassie G-250 boyasının 2 dakika gibi kısa bir sürede proteine bağlanıp renk vermesi, 1 saat stabil kalabilmesi ve bazı katyonların varlığında kararlılığını koruması yöntemin avantajları arasındadır [74].

Çalışmanın her aşamasında protein miktarının tayin edilebilmesi için standart protein olarak sığır serum albuminin kullanıldığı bir standart grafik hazırlandı. 0,2 mg/ml standart serum albumin çözeltisinden, 15, 30, 60, 90, 120  $\mu\text{l}$  alınarak saf su ile 2400  $\mu\text{l}$ ’ye tamamlandı. Her bir tüpe 600  $\mu\text{l}$  Coomassie Blue reaktifinden eklendi. Kör olarak ise 2400  $\mu\text{l}$  saf su üzerine 600  $\mu\text{l}$  Coomassie blue reaktifi eklenmesiyle hazırlanan çözelti kullanıldı. 595 nm’de köre karşı absorbansları okundu ve okunan değerlerle standart grafik hazırlandı. Protein miktarı tayin edilirken ise, protein miktarı bilinmeyen numuneden 150  $\mu\text{l}$  alınıp, saf su ile 2400  $\mu\text{l}$ ’ye tamamlandı ve üzerine 600  $\mu\text{l}$  Coomassie Blue reaktifi eklendi. 5 dakika içerisinde 595 nm dalga

boyunda köre karşı okundu ve protein miktarı yukarıda bahsedildiği gibi hazırlanan kalibrasyon grafiğinin eğiminden yararlanılarak hesaplandı [75].

### **3.8 *Bacillus megaterium*' dan saflaştırılan proteaz enziminin karakterizasyonu**

#### **3.8.1. Sodyum dodesilsülfat (SDS) poliakrilamid jel elektroforeziyle proteaz enziminin saflık kontrolü ve molekül kütesinin belirlenmesi**

Saflaştırılan enzimin molekül kütesi ve saflık kontrolünün tespiti için ham ekstrakt, amonyum sülfatla sonrasu örnek ve DEAE selüloz kolonundan elüe edilen enzim havuzu, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde yürütüldü [76].

#### Ayrırma Jelinin Hazırlanması ( %12 )

Literatür bilgileri ışığında [19], enzimin molekül kütesine göre en uygun jel konsantrasyonun %10 olduğu tespit edildi. Ancak ticari amaçla kullanılan %12 hazır jel kullanıldı. Hazırlanan numuneler ayırırma jeline eklendi ve uygun bir tarak yavaşça jele yerleştirildi. Bu polimerizasyon için ise yaklaşık 4 saat beklendi. Bu sırada numuneler hazırlandı.

#### Numunelerin Elektroforez için Hazırlanması

Ham Ekstrakt örneği, amonyum sülfatla presipite edilip diyalizlenmiş örnek ve DEAE selüloz kolonundan alınan örneklerin belli miktardaki hacimleri denatürasyon çözeltisinin (5 ml %25 gliserol, 5 ml %10 SDS, 5 ml merkaptotanol, 2,5 ml pH 6,8 Tris-HCl tamponu, 12 ml H<sub>2</sub>O, bromofenol mavisi) 25 µl'si ile karıştırılıp kaynayan suda 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra örnekler ve markerlar kuyucuklara tatbik edilip 350 V 200 miliamperde örnekler yürütüldü. Yürütme (running) tamponu ise 14,4 g glisin, 3 g Tris ve 1 g SDS'in 1 litre suda çözülmesiyle hazırlandı. Yaklaşık 4 saatlik yürütmeden sonra jel tanktan çıkarıldı ve fiksasyon aşamasına geçildi.

### Gümüş boyama Tekniği ile Jellerin Boyanması

Dikkatlice çıkartılan jel, Çizelge 3.1’de belirtilen aşamalardan geçirilerek gümüş boyama tekniği ile boyandı.

Çizelge 3.1. Örneklerin gümüş boyama tekniği ile boyanma prosedürü

İşlemin Adı	Hazırlanışı	Süre
Fiksasyon	75 ml etanol + 18 ml asetik asit + 75 µl formaldehit 150 ml’ye dH <sub>2</sub> O ile	Gece boyu çalkalayıcıda fikse edildi.
Etanolla muamele	450 ml %50’lik etanol çözeltisi	20 dakika × 3 kere tekrarlandı.
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O muamelesi	30 mg Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O 150 ml suda çözüldü.	Jel 1 dakika çalkalandı.
dH <sub>2</sub> O	Distile su	2×20 saniye yıkandı
Gümüş boyama	300 mg AgNO <sub>3</sub> + 112,5 µl formaldehit + 150 ml dH <sub>2</sub> O	20 dakika
dH <sub>2</sub> O	Distile su	2×20 saniye yıkandı
Geliştirme Fazı	9 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + tek kristal Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> +75 µl formaldehit 150 ml’ye dH <sub>2</sub> O ile.	Bantlar görülene dek çalkalandı.
dH <sub>2</sub> O	Distile su	2×2 dakika yıkandı.
Durdurma Fazı	75 ml metanol + 18 ml asetik asit 150 ml’ye dH <sub>2</sub> O ile.	10 dakika.

### **3.8.2. Saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH belirlenmesi**

*Bacillus megaterium* saflaştırılan proteazın optimum pH’sının belirlenmesi için, 500 µl seyreltik enzim çözeltisi ile pH 4,0 ile 12,0 arasındaki tamponlarda hazırlanan %0,6 (w/v) 2500 µl kazein çözeltisi karıştırıldı ve kısım 3,6’da belirtildiği gibi aktivite tayini yapıldı. pH 4,0, 5,0 için 50 mM glisin-HCl tamponu, pH 6,0 , pH 7,0 ve 8,0 için 50mM Tris –HCl tamponu, 9,0, 10,0, 11,0, 12,0, 12,5 ve 13 için ise 50 mM glisin-NaOH tampon sistemi hazırlandı. Enzimin optimum pH’sını tayin etmek için çizilen grafikte en yüksek aktivitenin olduğu pH değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer değerler de buna göre konumlandırıldı [77, 78].



### 3.8.3. Proteaz enziminin optimum sıcaklığının ve sıcaklık kararlılığının belirlenmesi

*Bacillus megaterium*'dan saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için 500 µl seyreltik enzim çözeltisi ile 50 mM pH 12,0 glisin-NaOH tamponunda hazırlanan %0,6 (w/v) 2500 µl kazein çözeltisi karıştırıldı ve 20–80°C aralığındaki su banyolarında 30 dakika inkübasyona bırakılıp her bir sıcaklık değeri için kısım 3.6'da belirtilen yöntemle göre aktivite tayini yapıldı. Enzimin optimum sıcaklığını tayin etmek için çizilen grafikte en yüksek aktivitenin olduğu sıcaklık değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer değerler de buna göre konumlandırıldı [77].

Enzimin sıcaklık kararlılığını belirlemek içinse, 50 µl enzim çözeltisi 950 µl 50 mM pH 12,0 glisin-NaOH tamponuyla seyreltildi ve 50°C de 3 saat inkübasyona bırakıldı ve her 30 dakikada bir kısım 3.6'da belirtildiği gibi aktivite tayini yapıldı. 60°C 1,5 saat inkübasyona bırakıldı ve her 15 dakikada bir aktivitesine bakıldı. 70°C'de ise 25 dakika inkübasyona bırakıldı ve 5 dakikalık periyotlarla aktivite tayini yapıldı. 80°C de ise 25 dakika inkübasyona bırakıldı ve her 5 dakikada bir aktivitesi ölçüldü. Sıcaklık kararlılığı grafiği çizilirken, inkübasyondan önceki değerler 100 olarak kabul edildi ve inkübasyon sonrasında elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi olarak konumlandırıldı [79].

### 3.8.4. Bazı metal iyonlarının saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesine etkisinin belirlenmesi

*Bacillus megaterium*'dan saflaştırılan proteaz enziminin bazı metal iyonlarının varlığında aktivitesindeki durumu incelemek adına bir dizi test yapıldı. Bunun için, tek değerlikli metal iyonlarından K<sup>+</sup> iki değerlikli metal iyonlarından; Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Sn<sup>2+</sup> ve ayrıca Fe<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup> iyonları denendi. Tüm metallerin klorürlü tuzları kullanıldı ve 50 mM pH 12,0 glisin-NaOH tamponuyla son konsantrasyonları 2 ve 5mM olacak şekilde çözeltileri hazırlandı. 50 µl seyreltik enzim çözeltisi hazırlanan çözeltilerin 450 µl'si ile karıştırılıp ve 40°C de 45 dakika inkübasyona bırakıldı. İçinde metal iyonu bulundurmayan bir örnek ise "kontrol"

olarak aynı şartlarda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında aktivite tayini kısım 3.6'da anlatıldığı gibi yapıldı. İnkübasyondan sonra kontrol numunesinin aktivitesi 100 olarak alındı ve diğer örneklerin aktivitesi kontrol grubuna göre konumlandırıldı [78, 80].

### **3.8.5. Bazı organik çözücülerin saflaştırılan proteaz enzimi kararlılığına etkisinin belirlenmesi**

*Bacillus megaterium*'dan saflaştırılan proteaz enziminin bazı organik çözücüler varlığında aktivitesindeki durum tayin edildi. Bunun için organik çözücüler olarak DMSO (dimetil sulfoksit) , etanol, aseton, heptan, oktanol, toluen, metanol, asetonitril ve 2-propanol çözücülerinin 1 ml'si ile 0,05 M pH 12 Glisin-NaOH tamponunun 3 ml'si karıştırıldı. 50 µl enzim çözeltisinin üzerine 450 µl organik çözücülerin olduğu tampon çözelti eklendi. 40 °C de yarım saat inkübasyona bırakıldı. İçinde organik çözücü bulundurmayan bir örnek ise "kontrol" olarak aynı şartlarda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kısım 3.6'da belirtilen yöntemle göre aktivite tayini yapıldı. İçinde organik çözücü bulunmayan kontrol numunesinin aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğer örneklerin bağlı aktiviteleri buna göre konumlandırıldı [80].

### **3.8.6. Saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlarla spesifitesinin belirlenmesi**

*Bacillus megaterium*'dan saflaştırılan proteaz enziminin bazı substratların varlığındaki aktivitesinin tayini için; kazein, sığır serum albumini (BSA), ovalbumin (yumurta albumini), jelatin ve soya fasulyesi unu 50 mM pH 12 glisin-NaOH tamponunda, %0,6 (w/v) konsantrasyonda hazırlandı. 2500 µl substrat çözeltileri, 500 µl seyreltik enzim çözeltisiyle karıştırıldı ve kısım 3.6'da belirtilen yöntemle göre aktivite tayini yapıldı. En yüksek aktivite gösteren substratın (kazein) aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğer substratlarla ölçülen aktiviteler buna göre konumlandırıldı [79].

### 3.8.7. Bazı inhibitörlerin, deterjan yüzey aktif maddelerinin ve oksidantların saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesine etkisinin belirlenmesi

*Bacillus megaterium*'dan saflaştırılan proteaz enziminin katalitik bölgesinde hangi grubun yer aldığını tespit etmek amacıyla enzim; serin proteaz inhibitörü olan PMSF (2 ve 5 mM), metaloproteaz inhibitörü olan EDTA (2 mM ve 5 mM) ile 2-merkaptoetanol ve DTT (ditiyoteritol) inhibitörleri ile test edildi. PMSF haricindeki inhibitörlerin çözeltileri 50 mM pH 12 glisin-NaOH tamponunda hazırlandı. PMSF'nin stok çözeltisi ise %96 (v/v) etanol çözeltisinde hazırlanıp son konsantrasyonu 2 ve 5 mM getirildi. 2-merkaptoetanol %0,1(v/v) konsantrasyonunda hazırlandı. 50 µl enzim çözeltisinin üzerine hazırlanan çözeltilerden 450 µl eklendi ve 40 °C de yarım saat bekletildi. İnhibitör bulunmayan kontrol numunesi de aynı şartlarda inkübe edildi ve inkübasyon sonrası örneklere kısım 3.6'da anlatıldığı gibi aktivite testi uygulandı. İçinde inhibitör bulunmayan kontrol numunesinin aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğer örneklerin aktiviteleri buna göre konumlandırıldı.

*Bacillus megaterium*'dan saflaştırılan proteaz enziminin sodyumdodesil sülfat (SDS), gibi anyonik yüzey aktif maddeleri, Triton X-100, gibi noniyonik yüzey aktif maddeleri, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrojen peroksit) gibi okside edici ajanlar varlığında aktivitesini belirlemek amacıyla %0,2 (w/v) SDS, %1 (v/v) Triton X-100, %2 ve %5 (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hazırlandı. 50 µl enzim çözeltisi üzerine 450 µl hazırlanan çözeltilerden konuldu ve Örnekler 40°C de yarım saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örneklere kısım 3.6'da anlatıldığı gibi proteolitik aktivite testi uygulandı. Kontrol numunesinin aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğer örneklerin aktiviteleri buna göre konumlandırıldı [81].

### 3.8.8. *Bacillus megaterium*' dan saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratıyla Michealis Menten kinetik parametrelerinin belirlenmesi

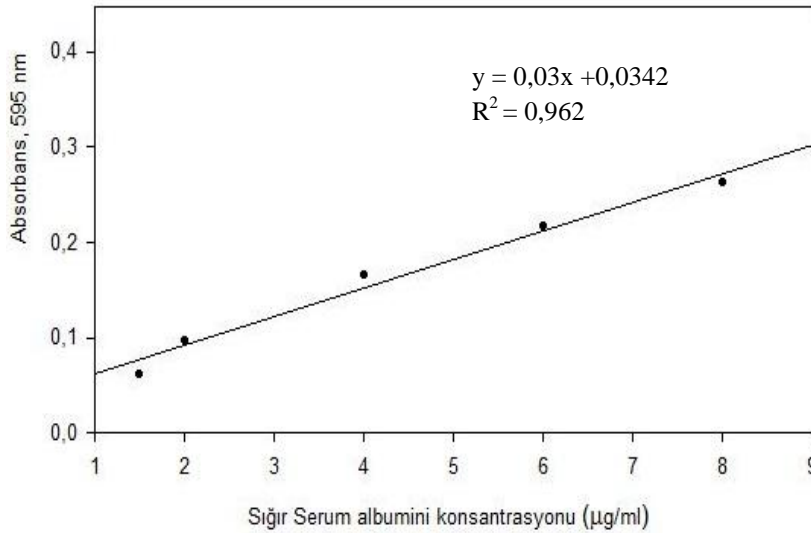
*Bacillus megaterium*' dan saflaştırılan proteaz enziminin Michealis Menten kinetik parametreleri ( $V_{maks}$  ve  $K_m$ ) substrat olarak kazeinin pH 12,0'da 50 mM glisin-NaOH tamponunda, 0,2-1,6 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlanmış kazein

içeren 2,5 ml substrat çözeltisi ile karıştırıldı Enzim substrat çözeltisi, 40°C 'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kısım 3.6'de anlatıldığı gibi aktivite tayini yapıldı. Enzimin başlangıç hızlarının resiprokal değerlerine karşı ( $1/V$ ) başlangıç substrat konsantrasyonlarının resiprokal değerleri ( $1/[S]$ ) Lineweaver-Burk grafiğine yerleştirilerek  $K_m$  ile  $V_{maks}$  sabitleri bu grafik doğrultusunda hesaplandı.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini için Hazırlanan Standart Eğri

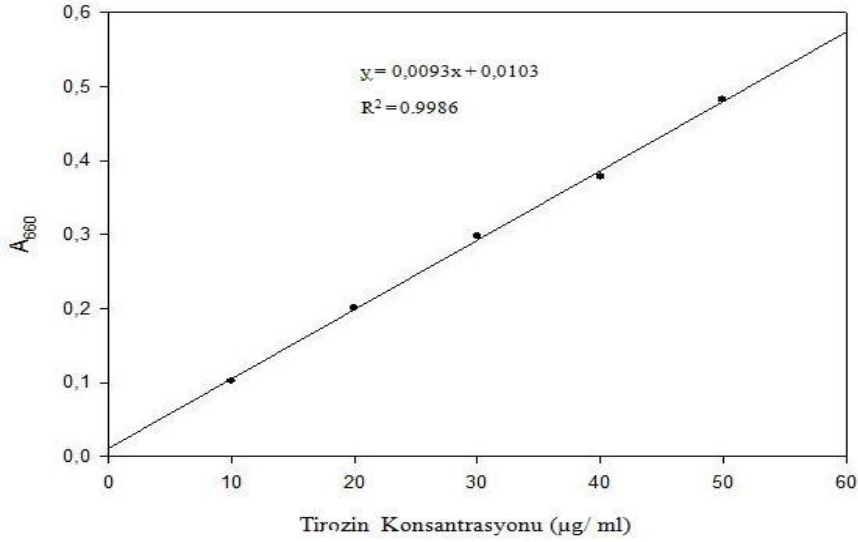
Araştırma boyunca protein tayini sığır serum albuminin standart olarak kullanıldığı Bradford yöntemiyle yapıldı. Tayine ait standart eğri, Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Protein tayininde kullanılan standart grafik

### 4.2. Aktivite Testlerinde Yararlanılan Tirozin Standart Eğrisi

Araştırma boyunca saflaştırmanın her adımında ve karakterizasyon testlerinde saflaştırılan enzime ait aktivite tayini Takami ve arkadaşlarının (1989) belirttiği yönetimin modifiye edilmesiyle belirlendi. Bir ünite proteaz enzimi, aynı şartlar altında dakikada 1 µg tirozin açığa çıkartan enzim miktarı olarak tanımlandı. Aktivite testlerine ait tirozin standart grafiği Şekil 4.2.’de verilmiştir.



Şekil 4.2. Tirozin standart grafiği

### 4.3. *Bacillus megaterium*' dan Proteaz Enziminin Saflaştırılması Sonuçları

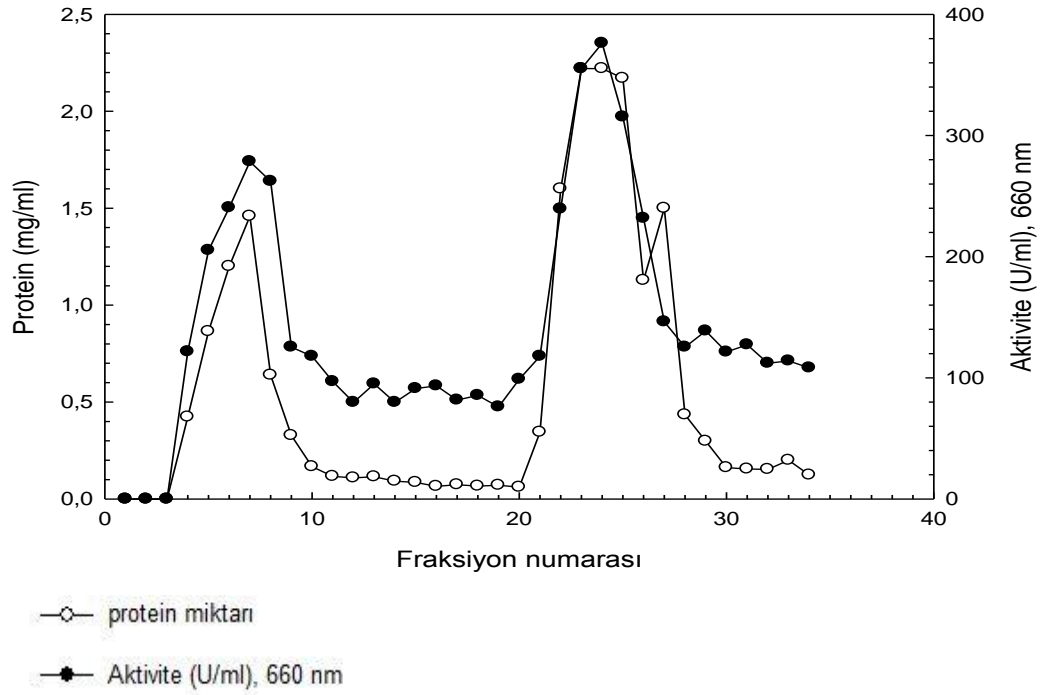
#### 4.3.1. İlk adım: amonyum sülfat çöktürmesi

*Bacillus megaterium*' dan proteaz enzimi saflaştırılması ilk olarak amonyum sülfat çöktürmesi ile gerçekleştirildi. Belirlenen % 80 konsantrasyonunda amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve çökelekler pH 12,0 glisin-NaOH tamponunda çözülüp gece boyu aynı tampona karşı +4°C'de diyalizlendi. Diyalizlenen örneğe kısım 3.6'da anlatıldığı gibi proteaz aktivitesi testi uygulandı. Saflaştırma adımlarına ait sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi ham ekstrat, amonyum sülfat çöktürmesi neticesinde %7,68 verimle ham örneğe göre 5,18 kat saflaştırılmış oldu.

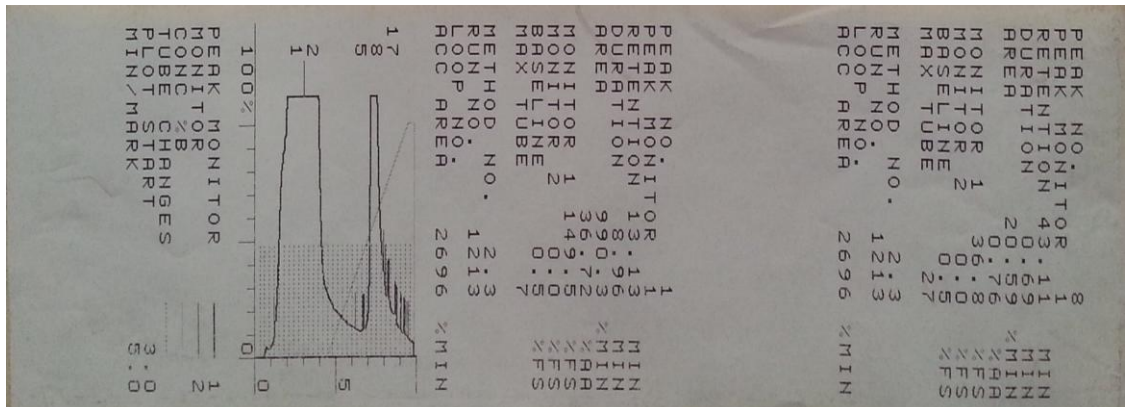
#### 4.3.2. İkinci adım: DEAE selüloz iyon değişim kromatografisi

Amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı diyalizlenen örnek, konsantre olmuş bir şekilde, dengelenmiş DEAE selüloz iyon değişim kromatografisi kolonuna yüklendi. Fraksiyonlar 3 ml/min akış hızı ile 1,5 dakika aralıklarla toplandı. Her bir fraksiyonun protein miktarı 280 ve 260 nm de yapılan ölçümlerle ve aktivitesi de

kısım 3.6'da anlatıldığı gibi tayin edildi. En yüksek aktivitenin görüldüğü fraksiyonlar toplandı. DEAE iyon değişim kromatografisine ait protein-aktivite grafiği ve kromatogram sırasıyla Şekil 4.3 ve Şekil 4.4 de verilmiştir. Saflaştırma adımlarına ait sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.3. *B. megaterium*' dan DEAE selüloz iyon değişim kromatografisiyle saflaştırılan proteaz enziminin aktivite-absorbans grafiği



Şekil 4.4. Kromatografi cihazından elüsyon sonucu alınan kromatogram

Çizelge 4.1. *B.megaterium* kaynaklı proteazın saflaştırılma basamakları sonuçları

Saflaştırma Adımı	Hacim (ml)	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim %	Saflaştırma K.sayısı
Ham Ekstrat	470	121464	554,6	219,01	100,0	1,0
%35-80 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi	35	12122	13,74	882,24	9,98	4,02
DEAE İyon değişim kromatografisi	25	9337	8,21	1136	7,68	5,18

DEAE selüloz iyon değişim kromatografisi sonucunda proteaz enzimi %7,68 verimle ham örneğe göre 5,18 kat saflaştırıldı. Kromatografi işlemi sonucundaki toplam aktivite 9337 U, enzimin spesifik aktivitesi ise 1136 U/mg olarak tayin edildi

#### 4.4. *Bacillus megaterium*'dan Saflaştırılan Proteaz Enziminin Karakterizasyonu

##### 4.4.1. SDS poliakrilamit jel elektroforeziyle enzimin saflık kontrolü ve molekül kütesinin tespiti

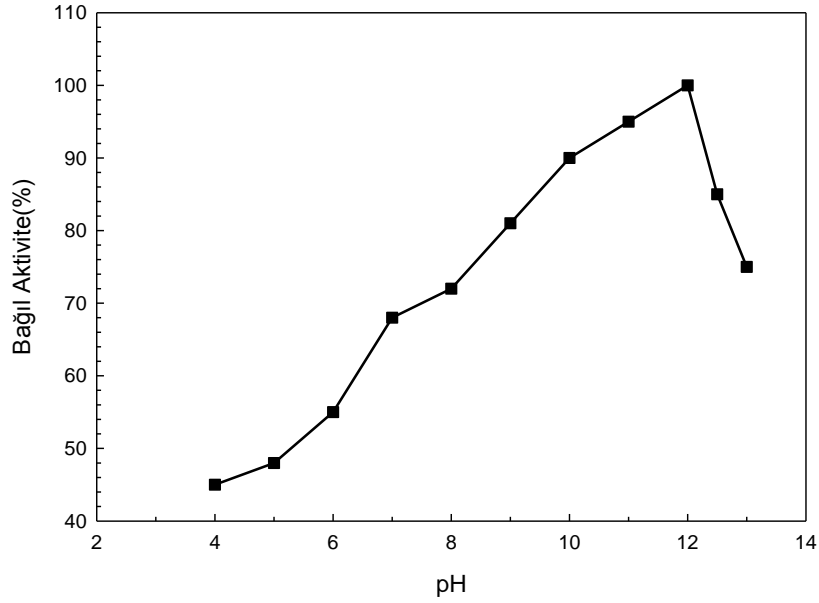
Enzim yüksek bir oranda saflaştırılmadığından elektroforez sonuçlarında belirgin bir pik gözlenmemiştir. Bu yüzden sonuçlar teze konulmamıştır.

##### 4.4.2. *Bacillus megaterium*'dan saflaştırılan proteaz enziminin optimum reaksiyon pH'sı sonuçları

Proteaz enzimlerinin deterjan sanayinde kullanılabilmeleri için alkali pH'larda yüksek ve kararlı aktiviteler göstermeleri gerekir. *Bacillus megaterium*' dan



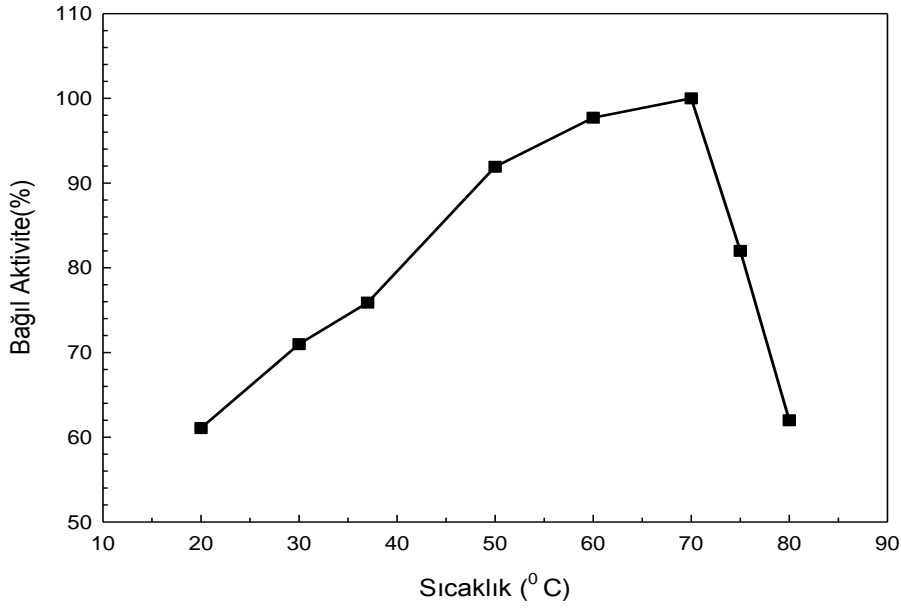
saflaştırılan proteaz enzimi için çeşitli tamponlarda pH 4,0'den 13,0'ye kadar geniş bir aralıkta aktivite tayini yapıldı ve enzimin en yüksek aktiviteyi pH 12,0'da gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. *B.megaterium*'dan saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesine çeşitli pH'ların etkisi

#### 4.4.3. *Bacillus megaterium* 'dan saflaştırılan proteaz enziminin optimum reaksiyon sıcaklığı sonuçları

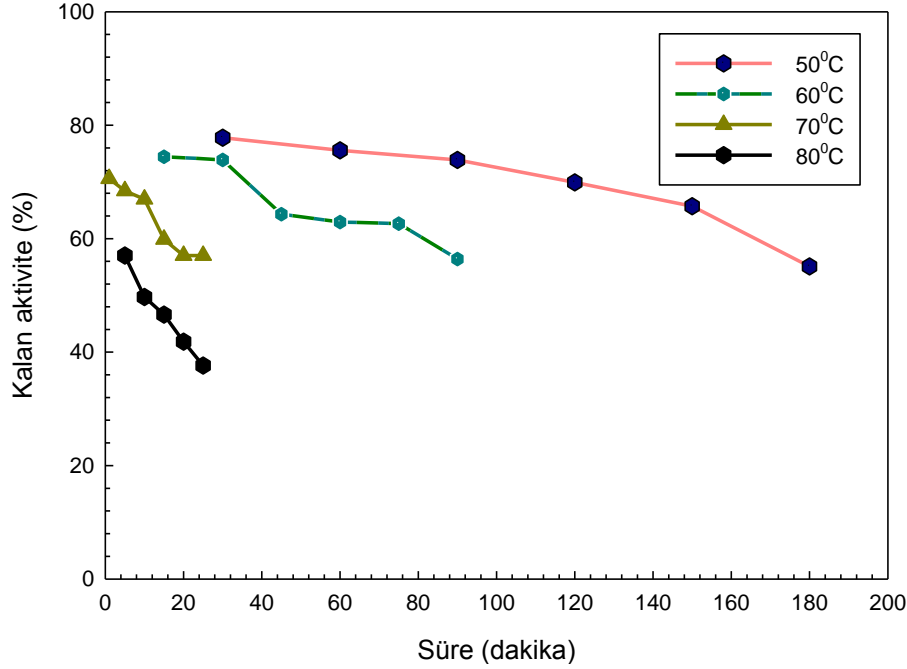
Proteaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın tayini için 20-80°C arasındaki sıcaklıklar denendi ve maksimum aktivite 70°C'de kaydedildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Saflaştırılan proteaz enzimine çeşitli sıcaklıkların etkisi

#### 4.4.4. *Bacillus megaterium* dan saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık kararlılığı sonuçları

Saf proteazın sıcaklık kararlılığını belirlemek amacıyla enzim, 50-80°C arasındaki sıcaklıklarda kısım 3.8.3.'de bahsedildiği gibi inkübasyona bırakıldı. Enzimin 50°C'de 3 saat inkübasyonu neticesinde aktivitesinde %50 varan düşüş gözlenmiştir. Enzimin 50°C'de ilk 140 dakika sonunda aktivitesinde çok az bir düşüş gözlenmiştir. Ancak 140. dakikadan sonra enzimin aktivitesinde % 20 lik bir düşüş meydana gelmiştir. 60°C de ise 40. dakikada aktivitesinin yaklaşık %40'ını koruduğu belirlendi. 70°C'de 5. dakikanın sonunda enzim aktivitesinin %30'unu , 25 dakika sonunda ise %45 kayb olduğu tespit edildi. 80°C'de ilk 5 dakikada enzim aktivitesinin %40'ı kaybolmuş, 25 dakika sonrasında ise %70 aktivite kaybı gözlemlenmiştir (Şekil 4.7.).

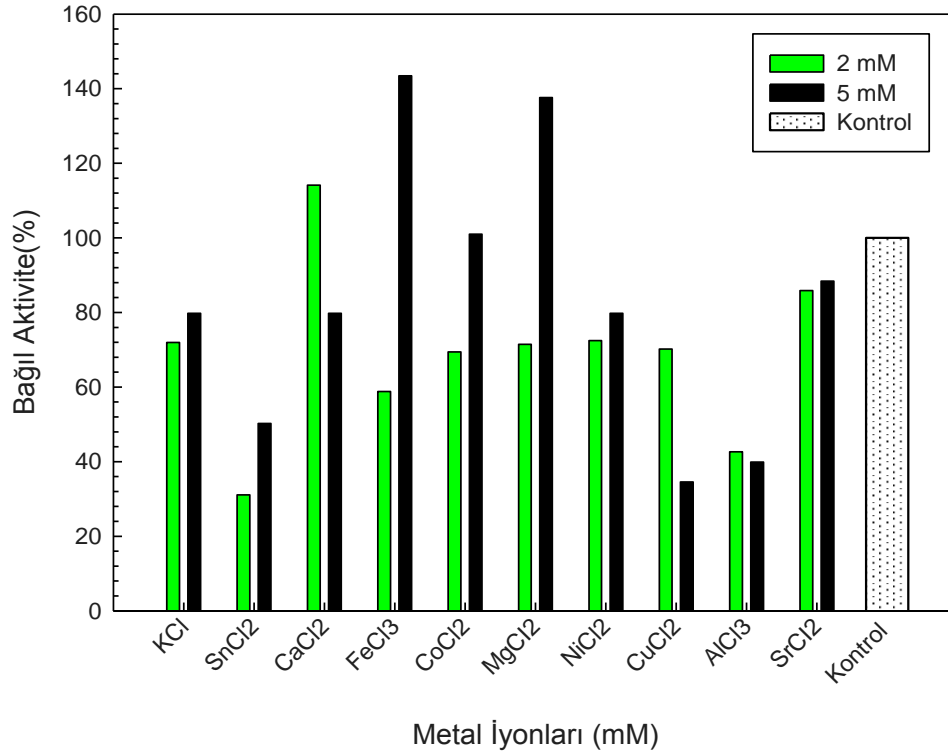


Şekil 4.7. Saflaştırılan proteazın 50-80 °C arasındaki sıcaklıklarla inkübasyonu sonucu kararlılığı

#### 4.4.5. *Bacillus megaterium*' dan saflaştırılan proteaz enzimine bazı metal iyonlarının Etkisi

Saf proteazın aktivitesine metal iyonlarının etkisi incelendi. Bunun için,  $K^+$  ve  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Sn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  ve  $Al^{3+}$  iyonlarının klorürlü ve sülfatlı tuzlarının 2 ve 5 mM çözeltileri hazırlanıp enzimle 45 dakika inkübe edildi. Aynı şekilde inkübe edilen ama içinde metal iyonu bulundurmeyen kontrol numunesinin inkübasyon sonundaki aktivitesi 100 kabul edilip grafik şekillendirildi (Şekil 4.8). Enzimin 5 mM  $FeCl_3$  varlığında aktivitesinin şiddetli bir şekilde yaklaşık %43 arttırdığı tespit edildi. Aynı zamanda  $MgCl_2$ 'nin 5 mM'lık konsantrasyonu varlığında ise enzim aktivitesinde yaklaşık %37 arttırmıştır. Buna rağmen  $MgCl_2$  2 mM'lık konsantrasyonu yaklaşık %30, 2 mM  $FeCl_3$  ise yaklaşık %40 aktivitede düşüş meydana getirdi. 5 mM'lık  $CoCl_2$ 'nin enzim aktivitesini etkilemezken 2 mM'lık çözeltisi yaklaşık %30 azaltmıştır. Yine aynı şekilde 2 mM'lık  $CaCl_2$  aktiviteyi % 115 kadar arttırırken, 5 mM'lık çözeltisi %20 azaltmıştır.

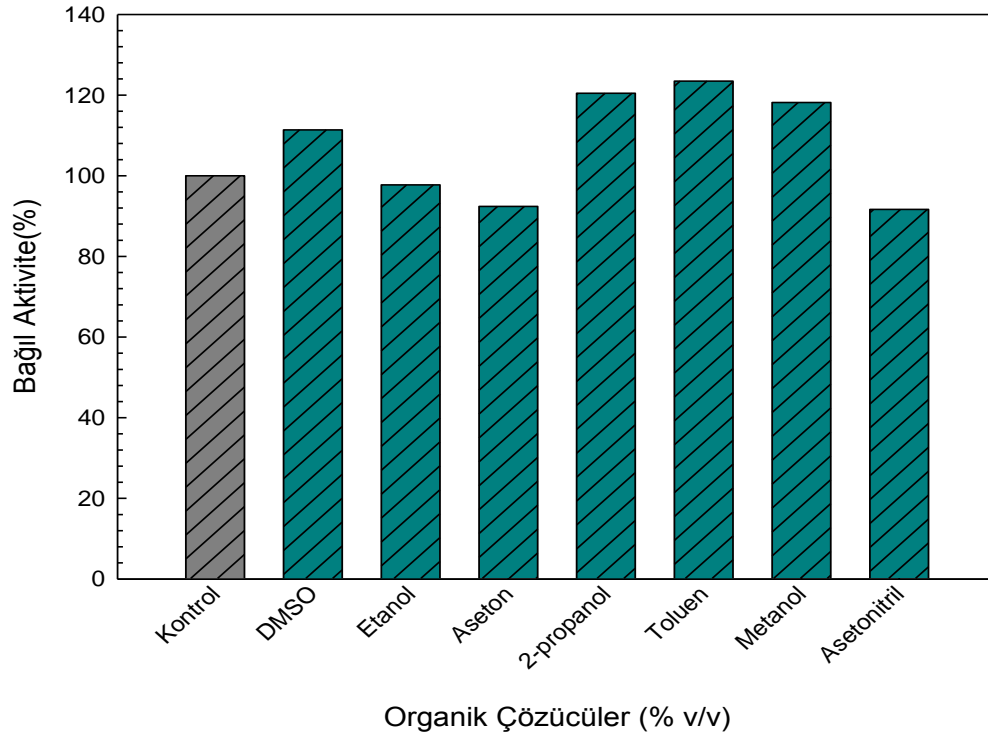
SrCl<sub>2</sub> çözeltisinin her iki derişimide aktivitede önemli bir miktarda değişiklik oluşturmamıştır. AlCl<sub>3</sub> ve SnCl<sub>2</sub> çözeltilerinin her iki konsantrasyonlarının da enzim aktivitesinde önemli düşüşe sebep olmuştur.



Şekil 4.8. *B.megaterium*' dan saflaştırılan proteaz enzime bazı metal iyonlarının etkisi

#### 4.4.6. Bazı organik çözücülerin *Bacillus megaterium*' dan saflaştırılan proteaz enzimi kararlılığına etkileri

Saflaştırılan proteaz enziminin kararlılığına, DMSO (dimetil sulfoksit) , etanol, aseton, otoluen, metanol, asetonitril, 2-propanol gibi organik çözücülerin varlığında bakıldı. Toluene, 2-Propanol, Metanol çözeltilerinin enzim aktivitesini yaklaşık %20 arttırdığı tespit edildi. DMSO %11 aktiviteyi artırırken, etanol önemli bir değişiklik meydana getirmemiştir. Aseton, asetonitril enzim aktivitesini yaklaşık %10 oranında azaltmıştır. Enzimin genel olarak bu organik çözücüler varlığında kararlılığını koruduğu görüldü (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesine bazı organik çözücülerin etkisi

#### 4.4.7. *Bacillus megaterium* ' dan saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifitesi sonuçları

Saf proteaz enziminin, kazein, sığır serum albumini (BSA), ovalbumin (yumurta albumini), jelatin ve soya fasulyesi unu gibi substratlar varlığında aktivitesi test edildi. Enzimin maksimum aktiviteyi kazein substratı varlığında verdiği görüldü ve bağıl aktivitesi %100 kabul etmiştir. Enzimin en az ilgi duyduğu substrat ise jelatin (%21,46) olarak belirlendi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. *B.megaterium* ' dan saflaştırılan proteaz enziminin bazı substratlar varlığında aktivitesindeki durum

Substrat	Bağıl Aktivite ( % )
Kazein	100
Sığır Serum Albumini	89,26
Ovalbumin ( Yumurta Albumini )	54,33
Jelatin	21,46
Soya Fasulyesi Unu	27,39

#### 4.4.8. Bazı inhibitörlerin, deterjan yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanların proteaz aktivitesine etkileri

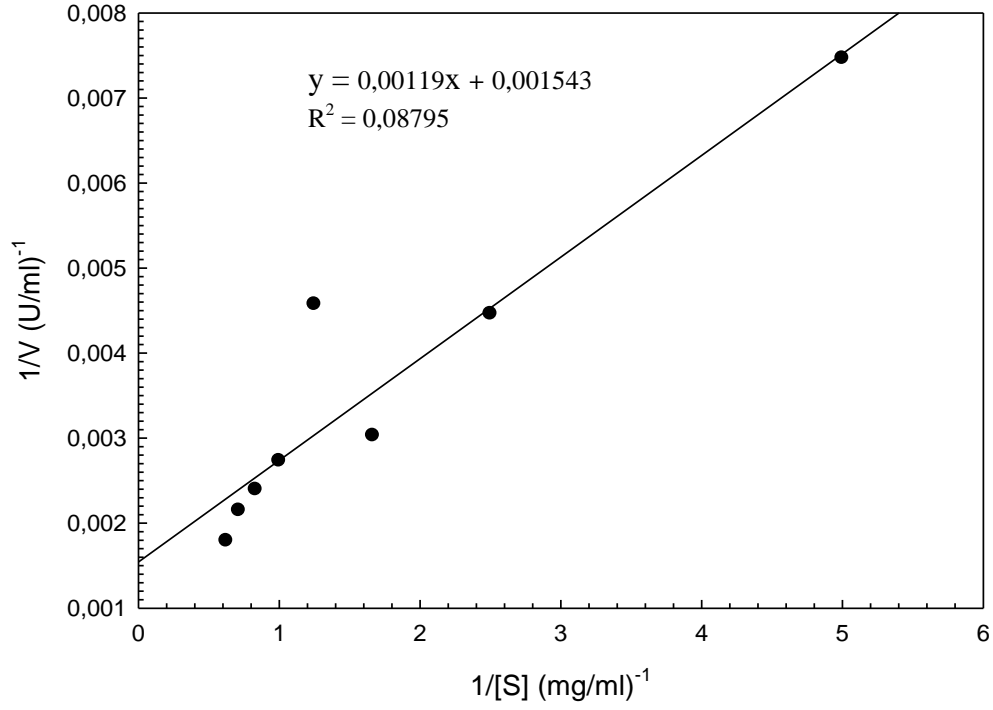
*B. Megaterium* ' dan saflaştırılan proteaz enziminin katalitik bölgesindeki aktif grubu tayin etmek amacıyla, enzim çeşitli inhibitörlerle test edildi. Enzimin 2 mM PMSF varlığında kuvvetlice inhibe olduğu görüldü. Bu sonuç, saflaştırılan proteazın serin proteaz grubundan olduğunu göstermektedir. Enzimin 2 ve 5 mM EDTA varlığında da aktivitesinin yaklaşık %11'ni kaybettiği gözlemlendi. Enzimin 2mM DTT varlığında aktivitesinin değişmediği ancak 5mM DTT varlığında aktivitesinin yaklaşık % 11 kadar arttığı , 2-merkaptoetanol varlığında ise bağıl aktivitesinin %80'ni koruduğu tespit edildi. Enzimin, bir anyonik yüzey aktif maddesi olan SDS (sodyum dodesil sülfat) varlığında bağıl aktivitesi %31 artış göstermiştir. Ağartıcı ajan olarak da kullanılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin %2,0 ve %5,0 (v/v) konsantrasyonunda enzim aktivitesinin kısmi bir azalma ve ancak %20'sini koruduğu tespit edildi. Noniyonik deterjan yüzey aktif maddeleri olan Triton X-100 de proteaz aktivitesinde kısmi bir azalma sağlamıştır. Bahsedilen çözeltiler varlığında enzimin bağıl aktivitesini gösteren değerler Çizelge 4.3.'de verildi. İçinde reaktif bulundurmeyen kontrol numunesinin aktivitesi % 100 kabul edildi.

Çizelge 4.3. Bazı inhibitörlerin, deterjan yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanların proteaz aktivitesine etkileri

Reaktifler	Konsantrasyonlar	Bağlı Aktivite ( % )
PMSF	2 mM	38,50
EDTA	2mM	89,30
EDTA	5 mM	88,23
DTT	2 mM	103,2
DTT	5 mM	111,76
2-merkaptolanol	%0,1 (v/v)	82,35
SDS	%0,2 (w/v)	131,58
Triton X-100	%1,0 (v/v)	59,13
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	%2,0 (v/v)	27,15
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	%5,0 (v/v)	25,13
Kontrol		100

#### 4.4.9. *B. megaterium*' dan saflaştırılan proteaz enziminin Michael Menten kinetik parametreleri

*B. megaterium* dan saflaştırılan proteaz enziminin 0,1 – 2 mg/ml kazein varlığında 30°C'de Michaelis Menten kinetik parametreleri;  $K_m$  ve  $V_{maks}$ , Lineweaver-Burk grafiği çizilerek hesaplandı.  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri sırasıyla 0,77 mg/ml, 3,58  $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{dak}^{-1}$  olarak belirlendi. Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.10'de verilmiştir.



Şekil 4.10. *B. Megaterium*' dan saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratıyla elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



## 5. SONUÇ VE DEĞERLENDİRME

Bu çalışmada, *Bacillus megaterium*'dan hücre dışı yeni bir alkali proteaz saflaştırılıp karakterize edilmiştir. *B. megaterium* uygun besi yerinde çoğaltılmış ve hücre dışı enzim üretimi ve salınımı gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma işleminde %80 amonyum sülfat çöktürmesi ve daha sonra diyaliz işlemi uygulanmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi iyonik gücün artırılmasıyla proteinlerin agrege edilmesidir. Saflaştırma işlemine pH 12 Glisin-NaOH Tamponuyla dengelenmiş DEAE selüloz anyon değiştirici kolon kromatografisiyle devam edilmiştir. Bu işlem sonucu enzim %7,68 verimle 5,18 kat saflaştırılmıştır.

Diğer literatür çalışmaları incelendiğinde;

Renganathan Rajkumar ve arkadaşları *Bacillus megaterium*dan üretilen alkalın proteaz enzimini , amonyum sülfat çökeltmesi, jel filtrasyonu (Sephadex G100) ve Q-Sepharose sütun kromatografisi içeren üç aşamalı bir proses ile 36 kat saflaştırmışlardır [41]. Mukesh Kumar ve arkadaşları *Bacillus subtilis* EAG-2 den hücre dışı proteaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE sefaroze anyon değişim kromatografisi ile %29 verimle enzimi 11 kat saflaştırmışlardır [42]. M. Mala ve arkadaşları amonyum sülfat (% 50-70doygunluk) ile kısmi olarak 8 kat saflaştırılmış [52]. Muhammad Nadeem ve arkadaşları Mutant suşu *B. licheniformis* UV-9 tarafından üretilen alkalın proteaz saflaştırılmış amonyum sülfat çökeltme ve Sephadex G-100, jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak sipesifik aktivitesinde 36,84 kat artışla ve %11 geri kazanım ile saflaştırılmış [54]. Dilek Kazan ve arkadaşları *Bacillus clausii* GMBAE 42'den  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  çökeltmesi ve DEAE-selüloz kromatografisi ile 16 kat %58 verimle saflaştırmışlardır [60]. Folasade M. Olajuyigbe ve arkadaşları *Bacillus licheniformis* LHSB-05 üretilen bir alkalın proteaz, amonyum sülfat çökeltmesi ile Sefarsil S-300 jel filtrasyon kromatografisi ile, 2 aşamalı bir prosedürde saflaştırılmıştır. Enzim % 6,6 'lık bir verim ile 13,4 kat saflaştırılmış [69].

Saflaştırılan enzimin karakterizasyon çalışması yapılmıştır ve bu amaçla enzimin optimum pH ve sıcaklığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda enzime metal iyonlarının,

doğal substratların, organik çözücülerin, deterjan yüzey aktif maddelerin, yükseltgenlerin ve amino asit inhibitörlerinin etkisi incelenmiştir.

Çalışmada pH 12 Glisin-NaOH Tamponuyla dengelenmiş DEAE selüloz anyon değiştirici kolon kromatografisiyle devam edilmiştir. Kolon sonrası enzimlerin karakterizasyonu yapılmış ve enzim için önemli bir faktör olan pH ve sıcaklık değerleri incelendi. Saflaştırılan proteaz enzimin optimum pH 12 olarak bulunurken optimum sıcaklık 70°C olarak tesbit edilmiştir. Endüstriyel deterjan formülasyonunda daha çok, yüksek pH'larda ve yüksek sıcaklıkta aktivite gösteren enzimler kullanılmaktadır. Saflaştırılan bu alkali proteaz enzimi endüstriyel amaçlı kullanımlarda çok rahatlıkla kullanılabilir bir enzimdir.

Qasim Khalil Beg ve Rani Gupta *Bacillus mojavensis* üretilen ve oksidasyona dayanıklı serin alkali proteaz enzim pH=10,5'da, sıcaklık optimumu 60°C'de gözlenmiş ve 48 saat için pH 7,0 – 11,5 olan geniş bir aralıkta kararlılık göstermiştir [6]. Amina Benkiar ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları çalışmada *Bacillus circulans* suşu DZ100 den hücre dışı üretilen proteaz keratinolytic (SAPDZ) enziminin optimum aktivitesi pH 12,5 ve sıcaklık 85°C olarak bulmuşlardır [47].

Kemel Jellouli ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada *Bacillus licheniformis* MP1'den üretilen enzimin optimum pH 10 ve optimum sıcaklık 70°C olarak bulunmuş[50]. Fatemeh Moradian ve arkadaşları *Bacillus sp.* HR-08 bakterisinden üretilen enzimin optimum pH 10,0 ve optimum sıcaklık 60°C olarak bulunmuştur [51]. M. Mala ve arkadaşları saflaştırdıkları proteaz enziminin optimum pH 12 olarak bulmuşlar ve 5 saat inkübasyon sonucunda aktivitesinin %60 ını koruduğunu bulmuşlardır [52]. Wei Shen ve arkadaşları *Bacillus licheniformis* AP-1'den saflaştırılan enzimin pH 11 ve optimum sıcaklık 60°C olarak bulunmuş [53]. Muhammad Nadeem ve arkadaşları *B. licheniformis* UV-9 tarafından üretilen alkalın proteazın optimum pH 11 ve optimum sıcaklık 60°C tesbit edilmiştir [54]. Ibrahim ve arkadaşları *pumilus* TMS55 tarafından üretilen protez enzimin optimum sıcaklık 60°C olarak tesbit edilmiş[63]. N.Fujiwara ve arkadaşlarının *Bacillus sp* B18 den saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH 11-12 sıcaklık ise 85°C olarak

bulunmuş [64]. Laura Dipasquale ve arkadaşlarının *Bacillus thermantarcticus* M1 proteazının optimum sıcaklık 70°C olarak bulunmuş [65].

Kısmi olarak saflaştırılan proteazın katalitik bölgesini belirlemek amacıyla enzim amino asit inhibitörleriyle muamele edilmiştir. Alkalın proteazın Fenilmetil, sülfonil florüd(PMSF) spesifik inhibitörü olan Fenilmetil, sülfonil florüd(PMSF) ile aktivitesinin kaybolması saflaştırılan enzimin alkalın proteaz ailesinden olduğunu göstermiştir. EDTA' dan etkilenmediğinden dolayı enzim metal katyonlarına ihtiyaç duymamaktadır. Yani metallo proteazlar sınıfına dahil değildir. EDTA birçok deterjanda kullanıldığı için kullanılan enzimin EDTA' dan etkilenmemesi gerekir. Bu sebepten dolayı enzim deterjan sektöründe rahatlıkla kullanılabilir.

Renganathan Rajkumar ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada kırmızı alg'den izole edilen *Bacillus megaterium* RRM2 tarafından üretilen alkalın serin proteazın Fenilmetilsülfonil florid (PMSF) tamamen inhibe olduğundan alkalın serin proteaz olmasına bağlamışlardır [41]. Mukesh Kumar ve arkadaşları süs bitkisi fidanlığından izole edilen *Bacillus subtilis* EAG-2 den saflaştırılan proteaz enziminin PMSF inhibitörüyle neredeyse tamamen inhibe olmasını serin proteaz olmasına bağlamışlardır [42]. Amina Benkiar ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları çalışmada *Bacillus circulans* suşu DZ100 den saflaştırılan bu enzim fenilmetansülfonil florid (PMSF) ve diiodopropyl fluorophosphates (DFP) ile tamamen inhibe edilmiş ve bu yüzden serin alkalın proteaz ailesine ait olduğunu bulmuşlardır [47]. Anshu Gupta ve arkadaşları haloalkaliphilic bakteriden saflaştırılan proteaz enziminin PMSF tarafından tamamen inhibe olduğundan enzimin serin alkali olduğunu düşünülmüş [48]. Fatemeh Moradian ve arkadaşları topraklarında bulunan *Bacillus sp.* HR-08 bakterisinden alkalın proteaz saflaştırmışlardır. Bu enzimin PMSF ile inhibe olurken sistein inhibitörlerinden etkilenmemiş bu nedenle enzimin alkalın protez olduğunu düşünmüşler [51]. Muhammad Nadeem ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları çalışmada, Mutant suşu *B. licheniformis* UV-9 tarafından üretilen alkalın proteaz saflaştırılmış ve enzimin Fenil metil sülfonil florür (PMSF) varlığında aktivitesi tamamen kaybolduğundan serin alkalın proteaz olduğu kayıtlara geçilmiş [54]. Tanskul ve arkadaşı 2013 yılında yaptıkları çalışmada, *Bacillus subtilis* proteazın .

PMSF ile tamamen inhibe olduğundan serin alkali proteaz olduğu kayıtlara geçilmiş [18]. Dilek Kazan ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada *Bacillus clausii* GMBAE 42'den üretilen proteaz enziminin PMSF tarafından tamamen inhibe olduğundan alkalın proteaz oğlunu düşünmüşler [60].

*Bacillus megaterium*'dan saflaştırılan hücre dışı yeni bir alkali proteaz metal iyonları varlığında aktivitesi incelendiğinde 2 ve 5 mM'lık  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$  iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde aktivatör etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.  $Co^{+2}$  ve  $Sr^{2+}$  iyonlarının enzim aktivitesi üzerine bir etkisi olmazken  $K^{+1}$ ,  $Sn^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Al^{3+}$  iyonları her iki konsantrasyonda da enzimi inhibe etmiştir. Saflaştırılan proteazın  $Mg^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$  ile aktivitesinin yaklaşık %50,  $Ca^{2+}$  ile %20 artması bu metallerin substratın enzimin bağlanma bölgesine olan ilgisini artırdığını göstermiştir. Siriporn ve arkadaşları *Bacillus megaterium*'dan saflaştırılan alkalın proteazın aktivitesinin  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  varlığında artış gösterdiğini  $Fe^{3+}$  varlığında ise aktivitesinin %15 kaybettiği bildirilmiştir [40]. Renganathan Rajkumar ve arkadaşları *Bacillus megaterium* RRM2 tarafından üretilen alkalın serin proteazın metal iyonlarından  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^{+}$  ve  $Na^{+}$  enzim aktivitesini artırırken  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  enzim aktivitesini azaltmıştır [41]. Anshu Gupta ve arkadaşları haloalkaliphilic bakteriden saflaştırılan protez enziminin  $Ca^{2+}$  (1 mM) ve  $Ca^{2+}$  (5 mM) iyonları ile aktivite gösterirken,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  İyonları ile aktivite göstermemiştir [9]. Wei Shen ve arkadaşları *Bacillus licheniformis* AP-1 tarafından üretilen bir hücre-dışı alkalın proteaz enziminin aktivitesi  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  iyonları ile az bir artış göstermiştir [53]. Tanskul ve arkadaşı 2013 yılında yaptıkları çalışmada, *Bacillus subtilis* saflaştırılan alkalın serin proteazın  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  varlığında en yüksek aktivite göstermiştir [57]. N.Fujiwara ve arkadaşlarının bir alkaliphilic termofilik *Bacillus sp* B18 tarafından üretilen alkalın serin proteazın  $Ca^{2+}$  iyonu ilave edildiğinde ısıya karşı dayanıklılığın arttığını bildirmişlerdir [64]. Folasade M. Olajuyigbe ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada enzim,  $Al^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$  mevcudiyetinde aktivitesinin stabil olduğunu, ancak  $Ca^{2+}$  ilavesi %27,  $Mg^{2+}$  ilavesinin %9 arttırdığı bulunmuş.  $Hg^{2+}$  eklendiğinde enzim aktivitesinin %83 kaybolduğu gözlemlenmiş [69].

Saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara karşı gösterdiği ilgi incelendiğinde en fazla kazeine, sonra sırasıyla sığır serum albumini, ovalbumin(Yumurta albumini), jelatin ve Soya Fasülyesi Unu olarak sıralanmaktadır.

Saflaştırılan proteaz enziminin organik çözücülerin etkisi incelendiğinde DMSO, 2-Propanol, Toluene, Metanol aktiviteyi arttırırken Etanol herhangi değişikliğe sebep olmamıştır. Aseton ve Asetonitril çok az miktarda aktiviteyi düşürmüştür. Diğer literatür çalışmaları incelendiğinde; Fatemeh Moradian ve arkadaşları *Bacillus sp.* HR-08 bakterisinden saflaştırılan alkalın proteaz aktivitesi %20 dimetil sülfoksit (DMSO), dimetil formamid (DMF) ve izopropanol varlığında artmıştır. Enzim bu çözücülerin % 20 varlığında oda sıcaklığında 1 saat ön-inkübasyon sonrası başlangıç aktivitesinin % 90'dan daha fazlasını korumuş. Ayrıca, enzim DMF ve DMSO yüksek bir konsantrasyon (en az %50 v/v), ölçülebilir aktivite göstermiş [51]. İbrahim ve arkadaşları *Bacillus pumilus* TMS55 tarafından üretilen alkalın proteaz ve organik çözücülerle(% 25) (benzen, heksan ve toluen gibi) kararlılığını koruduğu bildirilmiş [63]. Laura Dipasquale ve arkadaşlarını *Bacillus thermantarcticus* M1'den hücre dışı proteaz saflaştırılmış ve proteaz DMSO, metanol, etanol, asetonitril, izopropanol mevcudiyetinde bir hafta boyunca kararlı olduğu bulunmuştur [65]. Sonuç olarak enzimin organik çözücülerde aktivitesini koruması deterjan formülasyonuna kullanılabileceğini göstermiştir.

Saflaştırılan proteaz enziminin yüzey aktif maddeler ve yükseltgenler varlığında etkisi incelemek için SDS, TritonX-100, %2 lik ve %5 lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılmıştır. SDS aktiviteyi %31 oranında arttırmıştır. TritonX-100 aktiviteyi %40 oranında azaltırken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nin her iki çözeltisinde aktiviteyi %25 oranına kadar düşürmüştür.

Renganathan Rajkumar ve arkadaşları *bacillus megaterium* RRM2 tarafından üretilen alkalın serin proteaz enziminin sodyum dodesil sülfat (SDS) varlığında yüksek derecede tolerans sergilediği için ticari bir deterjan enzimi olarak kullanılabilir olduğu belirmişlerdir [41]. Anshu Gupta ve arkadaşları haloalkaliphilic bakteriden üretilen alkalın serin proteaz enziminin aktivite SDS (% 0,1) ve Triton X-100 (% 0,1) ile hafif değişirken Tween 80 (% 0,1) ile sabit kalmış. Deterjan bileşenleri ve

yüzeysel aktif maddeler varlığında enzim kararlılığını korumuş [9]. Satya P. Singh ve arkadaşları haloalkaliphilic *Bacillus sp.*'den izole ettikleri hücre dışı alkalik proteazın farklı sürfaktanlar ile stabil iken SDS ve Triton X-100 küçük bir değişiklik gösterdiği tesbit edilmiş [49]. Muhammad Nadeem ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları çalışmada, Mutant suşu *B. licheniformis* UV-9 tarafından üretilen alkalik proteaz saflaştırılmış ve Saflaştırılan enzim, Tween-20, Tween-45, Tween-65 ve Triton® X-45 gibi çeşitli yüzeysel aktif maddeler karşı aşırı kararlılık göstermiştir. Buna ek olarak, oksitleyici maddeler, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve sodyum perborat varlığında %100'den fazla aktivite göstermiş. Bu biyokimyasal özellikler *B. licheniformis* UV-9 'dan üretilen enzimin çamaşır deterjanları olarak potansiyel kullanımının olduğu yorumuna varmışlardır [54].

Saflaştırılan enzimin kazein substratına karşı K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub>. Değerleri ise sırasıyla 0,77 mg/ml, 3,58 µmol.ml<sup>-1</sup>.dak<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Bir enzimin K<sub>m</sub> değeri ne kadar küçükse enzimin substrata olan ilgisi o kadar fazladır. Diğer literatürler incelendiğinde, Anshu Gupta ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada, Hindistan'ın batı kıyısındaki bir alkalik proteaz üreticisi olan haloalkaliphilic bakteriden (Vel izole) izole edilen serin alkalik proteaz enziminin K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> sırasıyla 2mg/ml ve 289,8µg/dakika olarak bulunmuş [9]. Muhammad Nadeem ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları çalışmada, mutant suşu *B. licheniformis* UV-9 tarafından üretilen alkalik proteaz saflaştırılmış ve karakterize etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda enzimin K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri sırasıyla, 5 mg / ml ve 61,5861,58iM/ml/min olarak bulunmuş [15]. Ishtiaq Ahmed ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada batık fermantasyon tekniği ile *Bacillus subtilis* üretilen bir Alkali Proteaz saflaştırmışlar ve saflaştırılan proteazın K<sub>m</sub> değeri 58µM olarak bulunmuş [5]. Dilek Kazan ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada, Bir hücre dışı alkalik serin proteaz *Bacillus clausii* GMBAE 42'den saflaştırılan alkalik proteazın K<sub>m</sub> değerini 0,655 µM olarak tesbit edilmiş [21]. B Lalitha Kumari ve arkadaşı 2013 yılında yaptıkları çalışmada, *B. licheniformis* B18 den saflaştırdıkları proteaz enziminin K<sub>m</sub> değeri 3,2 mg ml<sup>-1</sup> olarak kayıtlara geçmiş [23].

Sonuç olarak; Alkali Serin Proteaz enzimi *Bacillus megaterium*'dan %80 amonyom sülfat çöktürmesi, diyaliz ve DEAE selüloz anyon değişim kromatografisi saflaştırma basamakları uygulanarak saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Enzimin ayrıca organik çözücüler, anyonik, iyonik olmayan yüzü aktif maddelerle karşı aktivitesi de incelenmiştir. Yapılan tüm çalışmalar sonucunda *Bacillus megaterium*'dan saflaştırılan serin alkali proteaz enziminin deterjan endüstrisinde de kullanılabilir olduğu söylenebilir. Deterjan endüstrisinde yapılacak diğer çalışmalarla bu özellikler incelenip geliştirilebilir.

## KAYNAKLAR

1. Burtis, C. A., Ashwood, E. R., “Klinik Kimyada Temel İlkeler, 5.baskı”, D., Aslan, **Palme Yayıncılık**, Ankara, 159-160 (2007).
2. Copeland, R.A., “Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis, 2<sup>nd</sup> ed.”, **Wiley-VCH**, New York, 1-7 (2000).
3. İnal M., “Enzimler”, Biyokimyanın ilkeleri,975-8982-18-4, Nedret Kılıç, **Palme yayıncılık**, Ankara , 244 (2005).
4. Sarıkaya Öztürk, S. B., “Yabani Çuha bitkisinin çiçeklerinden proteaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve peynir üretiminde kullanılabilirliğinin araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, **Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Erzurum, 1-7 (2006).
5. İnternet: “ Intracellular Proteolytic Systems in Alcohol-Induced Tissue Injury ” <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh27-4/317-324.htm> (2013).
6. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., and Deshpande, V. V., “Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases”, **Microbiology and Molecular Biology reviews**, 62(3): 597-635 (1998).
7. Castro, H., Abreu, P., Geraldo, R., Martins, R., Santos, R., Loureiro, N., Cabral, L. and Rodrigues, C. “Looking at the proteases from a simple perspective”, **Journal of Molecular Recognition**, 24: 165-181(2010).
8. Anwar, A., Saleemuddin M., “Alkaline proteases: a review”, **Bioresource Technology**, 64: 175-183 (1998).
9. Aoki, K., Miyamoto, K., Murakami, S., and Shinke, R., “ Anaerobic Synthesis of Extracellular Proteases by The Soil Bacterium Bacillus sp. AM-23: Putrifaction And Characterization of The Enzymes”,**Soil Biol. Biochem**, 27(11): 1377-1382(1995).
10. Mabrouk, S.S., Hashem. A.M., EL-Shayeb, A., Ismail, M.S., Abdel-Fattah, A.F.,“Optimization of Alkaline Protease Productivity by Bacillus licheniformis ATCC 21415”,**Bioresource Technology**, 69 : 155-159 (1998).
11. Poorman, R.A.,Tomasselli, A.G., Heinrikson, R.L., Kezdy, A., “A cumulativespecificity model for proteases from human immunodeficiency



virus types 1 and 2, inferred from statistical analysis of an extended substrate database”, *J Biol. Chem.*, 266: 14554–14561(1991).

12. Raksakulthai, Hard, N.F., “Exopeptidases and Their Application to Reduce Bitterness in Food: A Review”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(4): 401-445 (2003).
13. Raksakulthai, R. and Haard, N. Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(4):401–445(2003).
14. Smith, C., Marks, A. D., Lieberman, M., “Marks’ Basic Medical Biochemistry A clinical approach,” 2nd ed, *Lippincott & Wilkins*, 121 (2007).
15. Pınar Ç., “Serin alkali proteaz üretimi için biyoproses geliştirilmesi”, Doktora tezi, *F.E.B Ankara üniverstesi*, Ankara (1998).
16. Powers, J. C., Asgian, J. L., Dogan Ekici, O., and James, K. E., “Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases”, *Chem. Rev.*, 102: 4639-4750 (2002).
17. Salleh, AB., Rahman, RNZR, Basri, M., “New Lipases and Proteases, 2<sup>nd</sup> ed.”, *Nova Science Publishers, Inc.*, New York, 29 (2006).
18. Hase, C.C., Finkelstem, R.A., “Bacterial Extracellular Zinc-Containing Metalloproteases”, *Microbiological Reviews*, 57: 823-837 (1993).
19. Mahajan, R. and Badgujar, S. “Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review”, *Journal of Pharmacy Research*, 3(9): 2048-2068(2010).
20. Taussin, S., Batkin, S., “Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application: an update”, *Journal of Ethnopharmacology*, 22: 191-203 (1998).
21. Binnie, C., Aphale, JS., Bourgault, R., Krygsman, P., Liano, L., Walezyk, E., Malek, LT., “Isolation and characterization of 2 genes encoding protease associated with the mycelium of *Streptomyces lividans* 66”, *Journal of Bacteriology*, 177: 6033-6040 (1995).
22. İnternet: Wikipedia “Pepsin”  
<http://en.wikipedia.org/wiki/Pepsin> (2013).

23. Wiseman, A., "Handbook of Enzymes Biotechnology", 2nd ed, Chapter 3, *The Application of Enzymes in Industry*, 274-373(1987).
24. Demain, A.L., and Solomon, N.A., " In Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering", *Scientific American, Freeman &Comp*, San Francisco 3-14 (1981).
25. Kumar, C.G., Takagi, H., "Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint", *Biotechnol Adv*, 17: 561-594 (1999).
26. Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G., " Extremophiles As a Source of Novel Enzymes For Industrial Application", *Appl Microbiol Biotechno*, 51: 711-729(1999).
27. Kindle, K.L., "Characterization and Production of thermostable  $\alpha$ -Amylase", *Appl. Biochem. Biotechnol*, 8:153(1983).
28. Zeikus, J.G., *Enzyme Microb. Technol*, 1,243 (1979).
29. Kaur, S., Vohra, R.M., Kapoor, M., Beg, Q.K., and Hoondal, G.S., " Enhanced Production and Characterization of a Highly Thermostable Alkaline Protease From *Bacillus* sp. ", P-2 *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17: 125- 129(2001).
30. Mehrotra, S., Pandey, P.K., Gaur, R., Darmwal, N.S., "The Production of Alkaline Protease by a *Bacillus* Species isolate". *Bioresource Technology*, 67: 201-203(1999).
31. Banerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W., Soni, R., "Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus brevis* and its Characterization as a Laundry detergent Additive", *Process Biochemistry*, 35 : 213-219(1999).
32. Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C., "Serine Alkaline Protease From a Newly Isolated *Bacillus* sp. SSR1", *Process Biochemistry*, 36 : 781-785(1999).
33. Johnvesly, B., Naik, G.R., "Studies On Production Of Thermostable Alkaline Protease From Thermophilic *Bacillus* sp. JB-99 in a Chemically defined medium", *Process Biochemistry*, 37 : 139-144(2001).
34. Aunstrup, K., "Industrial Aspects of Biochemistry " (B. Spencer editör), FEBS, Dublin 23-29 (1981).
35. Fogarty, W.M., and Kelly, C.T., "Top. Enzymol", 3,45(1979).

36. Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., and Gupta S.R., "Characterization and Wash Performance Analysis of an SDS-Stable Alkaline Protease From a *Bacillus* sp. ", *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17: 493-497(2001).
37. Jasvir, S., Navdeep, G., Gina, D., and Debendra, K., "Studies on Alkaline Protease by *Bacillus* sp. NG312. All rights of any nature whatsoever reserved", 0273-2289 /99/76/0057(1998).
38. Yang, VW., Zhuang, Z., Elegir, G., and Jeffries, TW., "Alkaline-Active Xylanase Produced by an Alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolated From Kraft Pulp", *Journal of Industrial Microbiology*, 15: 434-441(1995).
39. Oh, Y., Shih, I., Tzeng, Y., Wang, S., "Protease Produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its Application in The Deproteinization of shrimp and Crab Shell Wastes", *Enzyme and Microbial Technology*, 27 : 3-10(1999).
40. Yossan S., Reungsangb A., and Yasudac M., "Purification and Characterization of Alkaline Protease from *Bacillus megaterium* Isolated from Thai Fish Sauce Fermentation Process", *Scienceasia*, 32:377-383(2006).
41. Rajkumar R., Jayappriyan K.R., and Rengasamy R., "Purification and characterization of a protease produced by *Bacillus megaterium* RRM2: application in detergent and dehairing industries", *Journal of Basic Microbiology*, 51: 614–624(2011).
42. Kumar, D.J. M., Venkatachalam, K., Govindarajan, N., Balakumaran, M.D., and Kalaichelvan P.T., "Production and Purification of Alkaline Protease from *Bacillus* sp. MPTK 712 Isolated from Dairy Sludge", *Global Veterinaria*, 8 (5): 433-439( 2012).
43. Mukherjee, A. K., Adhikari, H., and Rai S. K., "Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation", *Biochemical Engineering Journal*, 39: 353–361 (2008).
44. Ahmed, I., Zia, M. A., and Iqbal H. M. N., "Purification and Kinetic Parameters Characterization of an Alkaline Protease Produced from *Bacillus subtilis* through Submerged Fermentation Technique", *World Applied Sciences Journal*, 12 (6): 751-757 (2011).

45. Beg, Q.K., Gupta R., “Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*”, *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 294–304 (2003).
46. Deng A., Wua J., Zhang Y., Zhang G. And Wena, T., “Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001”, *Bioresource Technology*, 101 :7100–7106 (2010).
47. Benkiar A., Nadia Z. J., Badis A., Rebzani F., Soraya B. T., Rekik H., Naili B., Ferradji F.Z., Bejar S., And Jaouadi B., “Biochemical and molecular characterization of a thermo- and detergent-stable alkaline serine keratinolytic protease from *Bacillus circulans* strain DZ100 for detergent formulations and feather-biodegradation process”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 83: 129-138 (2013).
48. Gupta, A., Roy, A., Patel, R.K., Singh, S.P., Khare, S.K., and Gupta M.N., “One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp.”, *Journal of Chromatography A*, 1075: 103–108 (2005).
49. Patel, R. K., Dodia, M. S., Joshi, R. H., And S. P. Singh, R. H., “Purification and characterization of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.”, *Process Biochemistry*, 41 :2002–2009 (2006).
50. Jellouli, K., Ghorbel-Bellaaj, O., Ayed, H. B., “Alkaline protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization”, *Process Biochemistry*, 46: 1248–1256 (2011).
51. Moradian F., Khajeh K., Naderi-Manesh H., Sadeghizadeh M., “Isolation, Purification and Characterization of a Surfactants-, Laundry Detergents- and Organic Solvents-Resistant Alkaline Protease from *Bacillus* sp. HR-08”, *Appl Biochem Biotechnol*, 159:33–45 (2009).
52. Mala, M., Srividya, S., “Partial purification and properties of a laundry detergent compatible alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* species Y”, *Indian J Microbiol*, 50:309–317 (September 2010).
53. Tang, X.-M., Lakay, F.M., Shen, W., Shao W.L., Fang, H. Y., Prior, B.A., Wang, Z.X., Zhuge J., “Purification and characterisation of an alkaline

- protease used in tannery industry from *Bacillus licheniformis*”, *Biotechnology Letters*, 26: 1421–1424 (2004).
54. Nadeem, M., Qazi, J. I., Syed1, Q., and Gulsher1 M., “Purification and characterization of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis* UV-9 for detergent formulations” , *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 35 (2), 187-195 (2013).
  55. Krishna, D.P.N. R., Reddy, N.G., Gopal S.V. R., “Purification and sequence identification of alkaline protease produced from *Bacillus subtilis* KHS-1 (MTCC No. 10110)” , *Journal of Pharmacy Research*, 4(9): 2913-2915 (2011).
  56. Agrawal, R., Singh, R., Verma, A., Panwar P. , and Verma A.K., “Partial Purification and Characterization of Alkaline Protease from *Bacillus* sp. Isolated from Soil”, *World Journal of Agricultural Sciences* ,8 (1): 129-133 (2012).
  57. Bundela V., Mandal S.K., “Purification and characerization of an extracellular alkaline protease produced from an isolated *Bacillus subtilis*”, *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* , 4(2): 112-119 (2013).
  58. Kumar C. G., “Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*”, *Letters in Applied Microbiology*, 34: 13-17 (2002).
  59. Singh, J., Vohra R M. and Sahoo DK., “Purification and characterization of two extracellular alkaline proteases from a newly isolated obligate alkalophilic *Bacillus sphaericus*”, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 26: 387 –393 (2001).
  60. Kazan D., Denizci A. A., Erarslan A., “Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42” ,*J Ind Microbiol Biotechnol* ,32: 335–344 (2005).
  61. Kumar M.D. J., Priyadharshini D. A. , Suresh K, Saranya GM, Rajendran, K. and Kalaichelvan, PT., “Production, Purification and Characterization of  $\alpha$ -Amylase and Alkaline Protease by *Bacillus* sp. HPE 10 in a Concomitant Production Medium”, *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2 (3):376-382 (2012).

62. Kumari, B. L., and Rani M. R., “Characterization studies on caseinolytic extracellular alkaline protease from a mutant *Bacillus licheniformis*”, *Int. J. LifeSc. Bt & Pharm. Res.*, 2(1): 2250-3137(2013).
63. Ibrahim, Syed, K., Muniyandi, J., and Pandian S. K.,” Purification and Characterization of Manganese-Dependent Alkaline Serine Protease from *Bacillus pumilus* TMS55”, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 21(1), 20–27 (2011).
64. Fujiwara, N., Masui, A.,” Purification and properties of the highly thermostable alkaline protease from an alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp.”, *Journal of Biotechnology*, 30(2) :245–256(August 1993).
65. Dipasquale, L., Calandrelli V., Romano I., Nicolaus B., Gambacorta A., Lama L., “Purification and characterisation of a highly thermostable extracellular protease from *Bacillus thermantarcticus*, strain M1”, *Annals of Microbiology*, 58(2):253-259(2008).
66. Rahman R., Razak C. N., Ampon K., Basri M., Zin W. M., Yunus W., Salleh A. B., “Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40(6):822-827(1994).
67. Sookkheo B., Sinchaikul S., Phutrakul S. and Chen S. T., “Purification and Characterization of the Highly Thermostable Proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33”, *Protein Expression and Purification*, 20: 142–151 (2000).
68. Jaouadi B., Abdelmalek B., Fodil D., Ferradji F.Z., Rezik H., Zaraï N., Bejar S., “Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from *Streptomyces* sp. strain AB1 with high stability in organic solvents”, *Bioresource Technology*, 101 : 8361–8369 (2010).
69. Olajuyigbe F. M., and Kolawole A. O., “Purification and partial characterization of a thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* LHSB-05 isolated from hot spring”, *African Journal of Biotechnology*, 10(55) : 11703-11710 (2011).
70. Kumar, C.G., “Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*”, *Letters in Applied Microbiology*, 34: 13-17 (2002).

71. Reddy, L.V.A., Wee Y.-J., and Ryu H.-W., "Purification and characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus* sp. RKY3", *J Chem Technol Biotechnol*, 83: 1526–1533 (2008).
72. Takami, H., Akiba, T., and Horikoshi, K., "Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101", *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 30: 120-124 (1989).
73. Erarslan A., Kazan, D., Denizci, A .A., Öztürk, D., Karahan, N., "Enzim saflaştırmada temel yöntemler, VIII. Uygulamalı eğitim kursu", *Tübitak*, Kocaeli, 49-53 (2005).
74. İnternet: Wikipedia "Pepsin"  
<http://en.wikipedia.org/wiki/Pepsin>(2013)
75. Yapasan, E., "Partial purification and characterization of lipase enzyme from a *Pseudomonas* strain", Yüksek Lisans Tezi, *İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 25-26(2008).
76. Laemmli, U.K., "Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4", *Nature*, 227: 680-685 (1970).
77. Öztürk, S., "Ülkemizden izole edilen *Bacillus licheniformis* BA17'den elde edilen alkalin proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, 19-23 (2007).
78. Haddar, A., Bougatef, A., Agrebi, R., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M., "A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization", *Process Biochemistry*, 44: 29–35(2009).
79. Reddy, L.V.A., Wee Y. J., and Ryu H. W., "Purification and characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus* sp. RKY3", *J Chem Technol Biotechnol* ,83: 1526–1533 (2008).
80. Rahman, R.N.Z.R, Geok, L. P., Basri, M., Salleh, AB., "An organic solvent-stable alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: Enzyme purification and characterization", *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 1484–1491 (2006).
81. Beg, Q. K., Gupta, R., "Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*", *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 294-304 (2003).

82. İnternet: Mikrobiyoloji “ Temel mikrobiyoloji ”  
<http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAAF6AA849816B2EFDBA70C97114F1A29>(2011).
83. İnternet: Kokbiolab “Mechanisms of catalysis”,  
[http://www.kokbiolab.com/lib/exe/fetch.php?media=fkok:lec9mechanisms\\_of\\_catalysis.ppt](http://www.kokbiolab.com/lib/exe/fetch.php?media=fkok:lec9mechanisms_of_catalysis.ppt) (2012).
84. Ishida, T. Kato, S. , “Theoretical Perspectives on the Reaction Mechanism of Serine Proteases: The Reaction Free Energy Profiles of the Acylation Process” , *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (39) : 12035–12048 (2003).
85. Özçömlekçi E, “Proteaz enziminin glutaraldehit kullanarak kovalent bağlanma ile immobilizasyonunda optimum şartların belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, 4-8 (2006).
86. Zeman, N.W. Mccrea, J.M., “Alpha-amylase Production Using a Recombinant DNA Organism”, *Cereal Foods World*, 30(1) : 777-780 (1985).



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : İŞMARCI, Mustafa  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 01.11.1988 Aybastı  
e-mail : mustafa.ismarci@gmail.com

<b>Eğitim / Derece</b>	<b>Eğitim Birimi</b>	<b>Mezuniyet tarihi</b>
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi /Kimya Bölümü	2014
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Kimya Bölümü	2010
Lise	Alankent Çok Programlı lisesi	2005