

***Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'DEN PROTEAZ ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI, AKTİVİTESİNİN TAYİNİ VE  
KARAKTERİZASYONU**

**Seda ÖZDEN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2014  
ANKARA**

Seda ÖZDEN tarafından hazırlanan '*Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'DEN PROTEAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, AKTİVİTESİNİN TAYİNİ 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. Ahmet YAŞAR .....

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Elif LOĞOĞLU .....

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI .....

Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi : 29/01/2014

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.

Seda ÖZDEN

***Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'DEN PROTEAZ ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI, AKTİVİTESİNİN TAYİNİ VE  
KARAKTERİZASYONU  
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Seda ÖZDEN**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Ocak 2014**

**ÖZET**

Bu çalışmada topraktan izole edilen *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'ten proteaz enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Proteaz enzimi üretimi %1,25 glukoz, %1 pepton, % 0,5 maya ekstraktı içeren besiyerinde 37 °C de 24 saat sürede gerçekleştirilmiştir. Proteaz enzimi; %85 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesinden sonra DEAE selüloz anyon değişim kromatografisiyle %5,66 verimle 10,42 kat, Sefaroz 4B-basitrasin afinite kromatografisiyle %7,19 verimle 14,07 kat saflaştırılmıştır. Enzimin molekül kütlesi; Doğal (Native)-PAGE ile yaklaşık 36 kDa olarak bulunmuştur. Enzimin optimum sıcaklığının ve pH'ının sırasıyla 50 °C ve 9,5 olduğu tespit edilmiştir. Enzim 40 °C de 3 saat boyunca aktivitesini korumuştur fakat 60 °C ve 70 °C gibi yüksek sıcaklıklarda aktivitesini çok çabuk kaybettiği görülmüştür. Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi incelendiğinde Ca<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup> iyonları varlığında aktivitesinin arttığı gözlenirken, Al<sup>+3</sup>, Cu<sup>+2</sup>, K<sup>+</sup> iyonlarının inhibitör etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Fe<sup>+3</sup>, Mg<sup>+2</sup> ve Na<sup>+2</sup> iyonları varlığında ise enzimin aktivitesini koruduğu gözlenmiştir. Enzimin aktivitesinde etanol ve n-bütanol çözeltileri ile artış gözlenmiştir ancak benzen, toluen, DMSO çözeltilerinde sırasıyla yaklaşık olarak %15, %15 ve %25 şeklinde aktivite kaybı olmuştur. Metanolde ve asetonda ise aktivitesini korumuştur. Enzimin yüzey aktif maddelere ve yükseltgenlere karşı kararlılığını genel olarak koruduğu ancak yüzey aktif bir

madde olan SDS varlığında aktivitesinin yaklaşık %48'ini kaybettiği görülmüştür. Enzim; kazein, jelatin, keratin, ovalbumin, soya fasulyesi unu gibi doğal substratlar karşısında en yüksek aktiviteyi kazein substratına karşı göstermiştir. Enzim, karakteristik serin inhibitörü olan PMSF (fenilmetilsülfonilflorür) ile inhibe olmuştur. 2 mM lık EDTA varlığında aktivitede görülen %48'lik kayıp ise enzimin metal bağlama bölgesine sahip olduğunu göstermiştir. Bu inhibisyon profili, bu proteazın serin proteaz sınıfında olduğunu göstermiştir. Enzimin Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak tespit edilen Km ve V<sub>max</sub> değerleri sırasıyla 0,37 mg/ml ve 1,13  $\mu\text{mol. ml}^{-1}. \text{dk}^{-1}$  olarak elde edilmiştir.

**Bilim Kodu** : 201.1.020

**Anahtar Kelimeler** : *Bacillus* türleri, proteaz enzimi , aktivitesi, saflaştırılması

**Sayfa Adedi** : 79

**Tez Yöneticisi** : Prof. Dr. Elif LOĞOĞLU

**FOR CHARACTERIZATION AND FOR DETERMINING ACTIVITY OF  
PURIFICATION OF PROTEASE FROM *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)**

**(M. Sc. Thesis)**

**Seda ÖZDEN**

**GAZİ UNIVERSITY**

**GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

**January 2014**

**ABSTRACT**

In this work, the protease which was produced by *Bacillus subtilis* (RSKK-11014) isolated from a soil sample has been purified and characterized. Protease production was grown in %1,25 glucose, %1 peptone, %0,5 yeast extract at 37 °C and 24 hour. An alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* (RSKK-11014) was purified by DEAE cellulose anion exchange chromatography with %5,66 yield and 10,42 fold and Sepharose–bacitracin affinity chromatography with %7,19 yield and %14,07 fold followed by %85 ammonium sulfate precipitation. The molecular mass of the purified enzyme determined by using Native-PAGE was approximately 36 kDa. The optimum pH and temperature of protease was 9,5 and 50 °C, respectively. Protease activity was maintained after 3 hours at 40 °C. The purified enzyme was stable temperatures of 40 °C but rapidly deactivated at temperatures of 60 °C and 70 °C. If investigation of metal ions effect about to the enzyme activity while  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$  was increased enzyme activity but in the presence of  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  and  $\text{K}^{+}$  activity was inhibited enzyme.  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  and  $\text{Na}^{+2}$  showed no effect on protease activity. Ethanol and n-butanol were stimulatory but benzene, toluene, DMSO had fewer inhibitory effects, bringing about approximately %15, %15 and %25 decreases in activity, respectively. Enzyme maintained activity in the presence of methanol and acetone. The purified protease was found to be stable in the surfactants and oxidizing agent, but more than %48 inactivation was

observed in the presence of SDS. The proteases showed highest activity together with casein relative to other native proteins such as gelatin, ceratin, ovalbumin and soy bean. The protease was almost completely inhibited by the serine protease inhibitor PMSF. The enzyme has metals binding site since 48% of the activity was retained in the presence of 2 mM EDTA. This inhibition profile is consistent with the classification of this protease as serine proteases. The kinetic parameters,  $K_m$  and  $V_{max}$  of the purified protease were determined by using Lineweaver-Burk plot 0,37 mg/ml and  $1,13 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , respectively.

**Science Code : 201.1.020**

**Key Words : *Bacillus* sp., protease enzyme, activity, purification**

**Page Number : 79**

**Adviser : Prof. Dr. Elif LOĞOĞLU**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarım boyunca beni her konuda destekleyen çok sevgili hocam Prof. Dr. Elif LOĞOĞLU' na gösterdiği ilgi ve hoşgörülülüğünden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen değerli Mustafa HACIÖMEROĞLU' na (Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi, Kimyager) teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez çalışmamın her aşamasında büyük desteklerini aldığım Araş. Gör. Eda ÇINAR AVAR ve Esmâ SARI' ya, fikir alışverişinde bulunduğum laboratuvar arkadaşım Mustafa İŞMARCI' ya çok teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen biricik aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.



## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET.....	iv
ABSTRACT .....	vi
TEŞEKKÜR .....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....	xiv
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xvii
1.GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Enzimler.....	3
2.2. <i>Bacillus</i> Türleri Hakkında.....	7
2.3. Proteazlar.....	8
2.4. Proteazların Sınıflandırılması.....	9
2.5. Proteazların Kaynakları.....	20
2.6. Kaynak Araştırması.....	25
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	36
3.1. Laboratuvar Ekipmanları.....	36
3.2. Kullanılan Kimyasallar.....	36
3.3. Kullanılan Mikroorganizma.....	36
3.4. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)' ün Çoğaltılması ve Proteaz Üretimi.....	36

**Sayfa**

3.5. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den Alkali Proteaz Enziminin Saflaştırılması.....	37
3.5.1. Amonyum sülfatla çöktürme.....	37
3.5.2. DEAE selüloz anyon değişim kromatografisi.....	37
3.5.3. Afinite kromatografisi .....	38
3.5.4. Proteaz aktivite tayini.....	39
3.5.5. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması.....	39
3.5.6. Protein miktarı tayini.....	40
3.5.7. Protein standart grafiğinin hazırlanması.....	41
3.6. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den Saflaştırılan Proteaz Enziminin Karakterizasyonu.....	41
3.6.1. Proteaz enziminin molekül kütesinin Doğal (Native)-PAGE yöntemiyle belirlenmesi.....	41
3.6.2. Proteaz enziminin optimum sıcaklığının ve sıcaklık kararlılığının belirlenmesi.....	42
3.6.3. Proteaz enziminin optimum pH ve pH kararlılığının belirlenmesi.....	43
3.6.4. Proteaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi.....	44
3.6.5. Proteaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisinin belirlenmesi.....	44
3.6.6. Proteaz enziminin doğal substratlara karşı özgünlüğünün belirlenmesi.....	45
3.6.7. Bazı deterjan yüzey aktif maddelerin ve yükseltgenlerin proteaz enzimine etkisinin belirlenmesi.....	45
3.6.8. Proteaz enzimi üzerine amino asit inhibitörlerinin etkisinin incelenmesi.....	45
3.6.9. Proteaz enziminin Michaelis-Menten kinetik parametrelerinin belirlenmesi.....	46
4. BULGULAR.....	47

**Sayfa**

4.1. Protein Standart Grafiğinin Belirlenmesi.....	47
4.2. Tirozin Standart Grafiğinin Belirlenmesi.....	47
4.3. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den Proteaz Enziminin Üretimi.....	48
4.4. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den Proteaz Enziminin Saflaştırılması Sonuçları.....	48
4.4.1. Amonyum sülfat çöktürmesi.....	48
4.4.2. DEAE selüloz anyon değişim kromatografisi sonuçları.....	49
4.4.3. Afinite kromatografisi sonuçları.....	52
4.5. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den Saflaştırılan Proteaz Enziminin Karakterizasyonu.....	53
4.5.1. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin Doğal(Native)-PAGE ile moleköl kütlesinin belirlenmesi...53	
4.5.2. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık profili ve kararlılığı.....	54
4.5.3. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin pH profili ve kararlılığı.....	56
4.5.4. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisi.....	57
4.5.6. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enzimine organik çözücülerin etkisi.....	58
4.5.7. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara karşı kararlılığı.....	59
4.5.8. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerin ve yükseltgenlerin etkisi.....	60
4.5.9. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enzimine amino asit inhibitörlerinin etkisi.....	61
4.5.10. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin Michaelis-Menten kinetik parametreleri.....	62

	<b>Sayfa</b>
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	64
KAYNAKLAR .....	71
ÖZGEÇMİŞ .....	79

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Enzimlerin sınıflandırılması.....	5
Çizelge 2.2. Proteazların sınıflandırması.....	10
Çizelge 2.3. Katalitik mekanizmalarına göre proteazlar.....	11
Çizelge 2.4. Hayvansal proteazların özgünlüğü.....	22
Çizelge 3.6. Enzimin optimum pH ve pH kararlılığının belirlenmesinde kullanılan tamponlar.....	43
Çizelge 4.1. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014) kaynaklı proteazın saflaştırılma basamakları sonuçları.....	50
Çizelge 4.2. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara karşı kararlılığı.....	60
Çizelge 4.3. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin yüzey aktif maddelere ve yükseltgen reaktiflere karşı etkisi.....	61
Çizelge 4.4. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enzimine aminoasit inhibitörlerinin etkisi.....	62

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Proteaz hidroliz mekanizması.....	8
Şekil 2.2. Serin proteazların (tripsin, kimotripsin ve elastaz) spesifiteleri.....	12
Şekil 2.3. Katalizden sorumlu Ser <sup>195</sup> , His <sup>57</sup> ve Asp <sup>102</sup> katalitik üçlüsü.....	13
Şekil 2.4. Serin proteaz katalitik mekanizması.....	14
Şekil 2.5. Aspartik proteazlar için genel asit-baz katalitik mekanizması.....	16
Şekil 2.6. Pepstatin.....	16
Şekil 2.7. Sistein proteazların katalitik etki mekanizmaları.....	17
Şekil 2.8. Metalloproteazların katalitik mekanizması.....	20
Şekil 4.1. Protein tayininde kullanılan standart grafik.....	47
Şekil 4.2. Tirozin standart grafiği.....	48
Şekil 4.3. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den DEAE selüloz iyon değişim kromatografisiyle saflaştırılan proteaz enziminin aktivite-absorbans grafiği.....	51
Şekil 4.4. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin DEAE selüloz anyon değiştirme kromatogramı.....	54
Şekil 4.5. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin Sefaroz-basitrasin afinite kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonlarının protein miktarları ve aktiviteleri.....	52
Şekil 4.6. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin Sefaroz-basitrasin afinite kromatogramı.....	53
Şekil 4.7. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık profili.....	55
Şekil 4.8. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin 40-70 °C arasındaki sıcaklık kararlılığı.....	55
Şekil 4.9. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin pH profili.....	56

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.10. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin pH kararlılığı.....	57
Şekil 4.11. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enzime bazı metal iyonlarının etkisi.....	58
Şekil 4.12. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enzime organik çözücülerin etkisi.....	59
Şekil 4.13. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratıyla elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	63

**RESİMLERİN LİSTESİ**

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 2.1. <i>Bacillus subtilis</i> .....	7
Resim 2.2. Termolizinin yapısı.....	19
Resim 2.3. Papainin yapısı.....	21
Resim 4.1. <i>Bacillus subtilis</i> (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin Doğal (Native)-PAGE görüntüsü.....	54



## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı kısaltmalar açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>AP</b>	Amino peptidaz
<b>CP</b>	Karboksi peptidaz
<b>Ser</b>	Serin
<b>His</b>	Histidin
<b>Asp</b>	Aspartik asit
<b>Glu</b>	Glutamik asit
<b>Cys</b>	Sistein
<b>DEAE</b>	Dietilaminoetil
<b>U</b>	Ünite
<b>SDS</b>	Sodyumdodesil sülfat
<b>PAGE</b>	Poliakrilamit jel elektroforezi
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>Tris</b>	Trihidroksimetil aminometan
<b>BSA</b>	Sığır serum albumini
<b>EDTA</b>	Etilendiamin tetra asetik asit
<b>PMSF</b>	Fenil metil sülfonil florür
<b>TCA</b>	Trikloroasetik asit
<b>DTT</b>	Ditiyotreitol
<b>TLCK</b>	Tosil-L-lizin klorometil keton
<b>DMSO</b>	Dimetil sülfoksit
<b>Km, Vmak</b>	Michaelis Menten kinetik sabitleri

## 1.GİRİŞ

Günümüzde biyoteknolojinin çok çeşitli alanda gelişme göstermesi ile birlikte enzim teknolojisinde yapılan çalışmalar oldukça önem kazanmıştır. Enzim teknolojisinde ürünlerin kullanım alanlarının çeşitlilik göstermesi ve ekonomik değerinin çok yüksek olması, endüstriyel enzimlerin önemini arttırmıştır. Enzimlerin gıda, temizlik, tekstil endüstrilerinde kullanımı ülke ekonomisine oldukça büyük katkılar sağlamaktadır. Gıda endüstrisinde kullanılan enzimlerin çok saf olması gerekliliği nedeniyle yüksek maliyette olması, ithal edildiğinde bu maliyeti daha da artırmaktadır. Yeni saf endüstriyel kullanımı olan enzimlerin kazanılması sebebiyle yapılan enzim saflaştırma tezleri ülke ekonomisine büyük katkı sağlayacaktır.

Enzimlerin endüstriyel alanda kullanılmaları çok eski çağlara kadar uzanmaktadır. İlk çağlardan beri üretildiği bilinen ekmek, yoğurt, şarap, peynir gibi gıda maddelerinin üretiminde kullanıldığı, örneğin incir bitkisinden elde edilen sıvı ile süttten peynir yapıldığı bilinmektedir. Daha sonradan bu sıvıda bir enzim olduğu bulunmuş ve bu enzime 'fisin' adı verilmiştir [1].

1860 yılında Pasteur, fermantasyon olayını enzimlerin gerçekleştirdiğini farketmiştir. Organizmaların gelişme ve farklılaşma süreçlerini enzimatik reaksiyonlar biçimlendirmektedirler. Canlı organizmaların yaşamsal etkinliklerinde enzimlerin üstlendikleri görev biyo-katalizörlüktür. Buldukları ortam koşullarında gerçekleşmesi mümkün olmayan reaksiyonların oluşmasına katkıda bulunarak biyolojik yaşamı olası kılmaktadırlar [2].

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler, genel olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel ya da hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, çok miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır [3].

Dünyada üretilen toplam alkalifilik enzimlerin %30'dan fazlası çamaşır deterjanlarında kullanılarak değerlendirilmektedir [4]. Alkalifilik amilaz, selülaz ve proteazlara aynı zamanda endüstrinin diğer alanlarından dericilik, tekstil, gıda endüstrisi, içecek endüstrisi, ekmek ve pasta ürünleri, çeşitli soya ürünlerinin üretimi, protein hidrolizatlarının tatlandırılması, farmasötik endüstrisi ve tıbbi uygulamalar, kimya endüstrisi, atıkların temizlenmesi, nişastadan etanol üretimi gibi kendi içlerinde birer endüstri olan çok değişik alanda ihtiyaç duyulmaktadır [5,6,7].

Bu tez çalışmasında *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu amacıyla optimum sıcaklık ve pH belirlenmesi ve kararlılığı gibi parametrelerin yanı sıra enzim aktivitesi üzerine; metal iyonlarının, organik çözücülerin, yüzey aktif maddelerin, yükseltgenlerin, doğal substratların ve amino asit inhibitörlerinin etkisi incelenmiştir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Enzimler

Enzimler, büyük çoğunluğu protein yapısında olan, doğal olarak sadece canlılar tarafından sentezlenebilen, hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünün düzenlenmesini sağlayan biyolojik katalizörlerdir [8].

Hücrede çeşitli metabolizma reaksiyonları sonucu meydana gelen organik maddelerin yapımı, yıkımı, sindirimi, kas kasılması, hücre solunumu gibi önemli olaylar, enzimlerin katalitik etkisiyle mümkün olmaktadır. Enzimlerin kimyasal katalizörlerden en önemli farkı özgüllükleridir ve genellikle belli maddeler arasındaki belirli reaksiyonları katalize ederler [9].

Katalitik RNA moleküllerinin bir grubu dışında tüm enzimler, protein yapılı olduklarından proteinlere ait bütün özellikleri gösterirler [10]. Protein yapısında ve koloidal olma özelliklerinden dolayı fiziksel ve kimyasal faktörlerden etkilenirler. Etanol ve amonyum sülfatla çökelmelerinin yanı sıra membranlardan diyalize olmayan enzimler, 10000 ile milyon arasında değişen yüksek bir molekül ağırlığına sahiptirler. En küçük bir enzim bile yaklaşık 100 civarı amino asitten oluşur (Örneğin ribonükleaz enziminde 125 amino asit bulunur ve MA 14000). Enzimlerin yapıları onların özgüllüğünü oluşturan en önemli etkidir [11].

Enzim proteinlerinin primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner gibi doğal konformasyon yapıları katalitik aktivitelerini yansıtır. Eğer enzim 3 boyutlu yapısının bozulmasıyla denatüre edilir ya da alt birimlerine ayrıştırılırsa katalitik aktivitesi genelde yok olur. Enzim aminoasit birimlerine yıkıldığında ise katalitik aktivitesi tamamen harap olur [10].

Bazı enzimler aktiviteleri için sahip oldukları aminoasitlerin dışında herhangi bir kimyasal gruba ihtiyaç duymazken, bazıları ise kofaktör olarak adlandırılan bir veya

daha fazla  $Fe^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  veya  $Zn^{+2}$  gibi inorganik iyonlara ya da koenzim olarak adlandırılan kompleks organik veya metalloorganik moleküllere ihtiyaç duyarlar [12].

Katalitik olarak aktif bir enzim, koenzimi ile birlikte holoenzim olarak adlandırılır. Apoenzim; protein karakterinde, kolloidal, ısıya dayanıksız, diyalize olmayan ve inaktif polipeptid zincirinden meydana gelir. Prostetik grup olarak bilinen koenzim ise, protein karakterinde olmayan, ısıya dayanıklı (termostabil), düşük moleküllü ve inaktif organik bir kısımdan meydana gelir. Bu iki inaktif kısım birleşince aktif enzim dediğimiz holoenzimi oluşturur. Bu nedenle de, enzimler, düşük molekül ağırlığına sahip organik bir moleküle (koenzim) bağlanmış proteinler (apoenzim) olarak tanımlanabilirler [11,13].

Enzimler salgılanma şekillerine göre hücre içi ve hücre dışı enzimler olarak ikiye ayrılırlar. Hücre içi enzimler sitoplazmada ribozomlarda sentezlenirler ve substratları genellikle aminoasit, karboksilliasit, şeker gibi hücre zarından geçebilme yeteneğine sahip küçük moleküllerdir. Hücre duvarının dışı veya besiyeri ile bağlantı kuran enzimler ise hücre dışı enzimlerdir. Gram negatif bakteri duvarları gram pozitif bakteri duvarlarında bulunmayan bir dış membrana sahip olduğu için gram pozitif bakterilerde enzimler doğrudan hücre dışına salgılanır. Hücre dışı enzimlerin kararlılığı daha fazladır ve aktivitelerini hücre içi enzimlere göre daha uzun süre koruyabilirler [14].

Enzimler etki ettikleri reaksiyon çeşidine göre altı sınıfta incelenir. Her enzimin katalizlediği tepkimeyi tanımlayan dört rakamlı bir numarası vardır. 1. numara sınıfını, 2. numara alt sınıfını, 3. numara grubunu, 4. numara ise kendine özgü sıra numarasını verir. (örneğin, 3.6.1.3 “ATP Fosfohidrolaz”). Enzim sınıfları Çizelge 2.1’ de gösterilmiştir [15].

Çizelge 2.1. Enzimlerin sınıflandırılması

1.Oksidoredüktazlar	İki substrat arasındaki oksidasyon(yükseltgenme) ve redüksiyon(indirgenme) reaksiyonlarını katalizleyen enzimler
2.Transferazlar	Molekülden H <sup>+</sup> dışında başka grupları (C, N ve fosfor taşıyan) aktaran enzimler
3. Hidrolazlar	Değişik bağların (C-halojenür ya da P-N bağlarına su katılmasıyla) hidrolizini sağlayan enzimler.
4.Liyazlar	C-C, C-O, C-N, C-S bağlarını yükseltgenme ve hidroliz dışında bir mekanizma ile kıran enzimler
5.İzomerazlar	Optik ve geometrik izomerlerin rasemizasyonunu katalizleyen enzimler
6.Ligazlar	Yüksek enerjili fosfatların enerjisini kullanarak, C, O, S, N arasında bağ oluşumunu sağlayan enzimler

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler, genel olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel ya da hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha kararlı ve ucuz olmaları, çok miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır [16].

Enzimlerin katalitik etkinliği ‘aktiviteleri’ ile tanımlanmaktadır. Buna göre enzim aktivitesi;

1. Bir mol aktif enzim tarafından birim zamanda ürüne dönüştürülen substratın mol sayısı (turnover sayısı :T) ya da,
2. Bir mikromol substratı bir dakikada ürüne dönüştüren miligram enzim miktarı (enzim ünitesi :EU), olarak tanımlanmaktadır [17].

Enzimlerin (proteinlerin) bütünlüğü ve kararlılığı açısından molekül içi kuvvetler arasındaki denge çok önemlidir. Dolayısıyla çevredeki herhangi bir değişiklik enzimin yapısındaki ve kararlılığındaki dengeyi belirleyerek kararlı veya denatüre

olmasını sağlar. Denatürasyon veya inaktivasyon şartlarında enzimlerin yapıları değişir ve enzimler inaktif hale gelirler. Fiziksel, kimyasal, biyolojik bozucu bileşiklerin etkisiyle çevre etkili denatürasyonlar oluşur. Enzim aktivitesi;

- pH,
- Sıcaklık,
- Substrat konsantrasyonu,
- Enzim konsantrasyonu,
- Radyasyon,
- Kimyasal bileşenler (alkol, üre, hidrojen peroksit vb.),
- Biyolojik etkenler

gibi çeşitli faktörlerden etkilenir [18,19].

Enzimlerin ticari alandaki kullanımlarını %59 proteazlar, %28 karbohidrazlar, %3 lipazlar ve %10'unuda diğer enzimler oluşturur. Karbohidrazlar grubunda bulunan  $\alpha$ -amilaz üretimi ise %13' ünü oluşturmasıyla önemli bir yer tutmaktadır [16]. Enzimlerin endüstrideki büyük çoğunluğunu oluşturan proteazların arasında bakteriyel proteazlar, hayvansal ve fungal proteazlar ile karşılaştırıldığı zaman daha etkin olduğu görülmektedir [20]. Bu ticari öneme sahip olan mikrobiyal kökenli proteazların çoğu hidrolazlar grubunda yer almaktadır. Bunlar yüksek molekül kütlesine sahiptir ve genellikle ekstraselüler (hücre dışı) olarak bulunurlar. Ekstraselüler enzimler, besiyeri ve hücre duvarının dışı ile bağlantı halinde olan enzimlerdir [21].

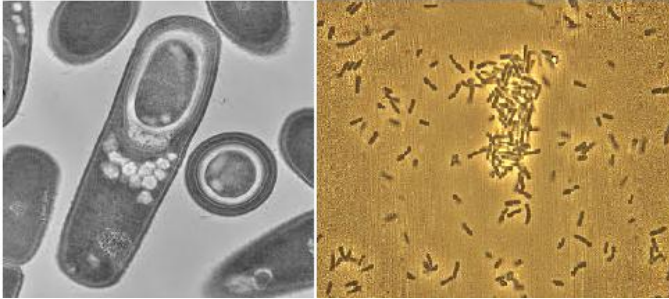
Günümüzde enzim kullanım alanının çeşitliliği ve ekonomik değerinin yüksek olması biyoteknolojik alanda enzim üretim çalışmalarına önem kazandırmıştır. Özellikle son yıllarda rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi giderek yaygınlaşmıştır [22]. Enzimlerin en sık kullanıldığı endüstri alanlarından biri deterjan endüstrisidir. İyi bir deterjan enziminin, birlikte kullanıldığı oksitleme ajanları ve ağartıcılara dayanıklı olması gerekir. Ticari olarak kullanılan deterjan enzimlerinin büyük bir kısmı oksitleme (ağartma) ajanlarının varlığında kararlılığını koruyamamaktadır. Bu nedenle enzim tabanlı deterjanların daha kararlı

olması için rekombinant DNA Teknolojisinden yararlanılmaktadır. Mikrobiyal çeşitliliği derinlemesine incelenerek mikroorganizmalardan ticari olarak daha kullanışlı enzimler üretebilmek için üretim maliyetleri, zaman, kalite ve performans birlikte gözetilerek dış etkenlerden olabildiğince bağımsız ve farklı sıcaklık/pH değerlerinde aktivite gösterebilen enzimleri üreten mikroorganizmaların tanımlanması ve geliştirilmesi büyük önem kazanmıştır [23].

## 2.2. *Bacillus* Türleri Hakkında

*Bacillus* türü bakteriler, en başta kolay üretilibilmeleri nedeniyle, bunun yanı sıra antibiyotik, enzim, toksin üretmesi gibi metabolik özelliklerinin endüstriyel alanda büyük öneme sahip olması nedeniyle dikkat çeken mikroorganizmalardır [24]. Nötrofilik ve alkalofilik *Bacillus*'lar özellikle yüksek oranlarda alkali proteaz üreticisi olmaları nedeniyle büyük öneme sahiptir. Bu enzimlerin, yüksek katalitik aktiviteleri, yüksek substrat özgüllükleri ve artan ürün kapasiteleri gibi özelliklerinin olması geniş bir uygulama alanı bulmasını sağlamaktadır [5,7].

*Bacillus* türlerinin özellikle taze kültürleri, gram pozitif boyanırlar. Bu türlerin vejetatif formları düz, kenarları birbirine paralel, ucu yuvarlak veya kesik biten, yaklaşık 0,5-1,2 µm boyunda basillerdir. Uzun zincirler şeklide ya da tek tek veya uzun görülürler. Genellikle çoğunun katalaz testi pozitifdir. *Bacillus*' lar çevre koşullarının kötü olduğu durumlarda dış etkenlere karşı korunabilmek için spor üretirler [25, 26].



Resim 2.1. *Bacillus subtilis*



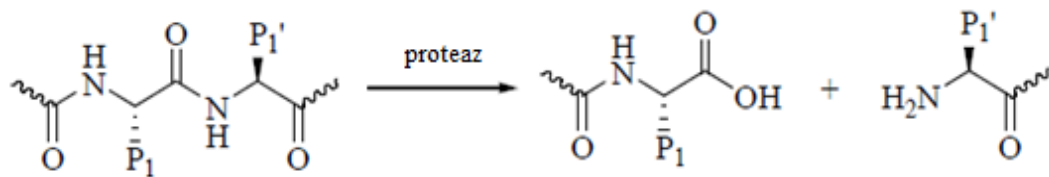
*Bacillus*’ lar, farklı karbon kaynakları kullanarak, yüksek pH ve sıcaklıklarda kararlılığı yüksek ürünler üretebilirler. Bunun yanı sıra diğer mikroorganizmalara göre daha kolay genetik olarak izole edilebilmektedirler. *Bacillus*' ların çoğalması için gereken maksimum sıcaklık 25 ile 75 °C arasında değişirken, minimum sıcaklık -5'den 45°C'a kadar değişmektedir. pH aralığı ise 7,5-8'den 2'ye kadar değişiklik göstermektedir [27].

Çoğunlukla saprofit olan *Bacillus* türleri doğada yaygın olarak toprakta bulunur ve toz partikülleri ile sulara, bitki ve hayvan materyallerine bulaşır. Bu cinse ait türlerin çoğu proteaz üretirler ve bu da rekombinant proteinleri yıkabilir. Örneğin *B. subtilis* 7 farklı proteaz üretmektedir. Bunlardan 5'i ekstraselülerdir [28].

Alkali proteazlar, bakteri, küf, maya gibi çeşitli kaynaklardan elde edilse de [29], alkalifilik *Bacillus* biyoteknolojide en çok kullanılan mikroorganizmadır. Çünkü çeşitli ortamlardan izolasyonu daha kolaydır. Aynı zamanda *Bacillus*, kompleks ve sentetik ortamlarda gelişebilmektedir. Termofilik ve alkalifilik *Bacillus* tarafından üretilen alkalifilik proteazlar yüksek sıcaklık ve pH'ya dayanıklıdır [30,31]. Ayrıca *Bacillus* türleri durgunluk fazlarında da hücre dışı proteazlar üretebilmektedir [32]. *Bacillus* lar çoğunlukla hücre dışı proteaz üreticisidirler ama nadiren hücre içi proteaz üreten ve saflaştırılan çalışmalar da yapılmıştır [33].

### 2.3. Proteazlar

Hidrolazlar ana grubuna dahil olan proteazlar, proteolitik enzimler olarak da bilinir. Bunlar peptit bağlarının su etkisiyle bölünmesini katalizlerler [34].



Şekil 2.1. Proteaz hidroliz mekanizması

Proteazların peptid bağını hidrolizlerken başarı ile çözdükleri 3 nokta vardır. Birincisi, amid nitrojeninin karbonil grubuna elektron transfer ederek oldukça kararlı amid bağı oluşturmalarıdır. İkincisi, genel baz mekanizması ile zayıf bir nükleofil olan suyu aktive etmeleridir. Üçüncüsü ise proteazların amin grubunu yapıdan ayrılmadan önce protonize etmeleridir [35].

Proteazlar, enzimlerin oldukça kompleks bir grubunu oluştururlar ve oldukça 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 hızlı bir şekilde metabolize edilebilen azot kaynakları ile baskılanmaktadır. Diğer ortam bileşenleri olan küçük şekerler ve mineraller enzim sentezini etkilemektedir [32].

Proteazların değişik kaynaklardan izole edilebilen bazı sınıfları, nötral pH'nın üzerindeki bazı pH değerlerinde de kataliz yeteneğine sahip olmaları sayesinde endüstriyel alanda önem kazanmalarına neden olmuştur [7].

#### **2.4. Proteazların Sınıflandırılması**

Proteazlar kaynağına göre, katalitik aktivitelerine göre, katalitik aktiviteyi sağlayan aktif bölgelerine göre üç ana grupta sınıflandırılırlar. Proteazların sınıflandırılması Çizelge 2.2' de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Proteazların Sınıflandırması [36].

Proteaz	E.C sayısı
-Ekzopeptidaz	
Aminopeptidaz	3.4.11
• Dipeptidil peptidaz	3.4.14
• Tripeptidil peptidaz	3.4.14
Karboksipeptidaz	3.4.16-3.4.18
• Serin proteaz	3.4.16
• Metaloproteaz	3.4.17
• Sistein proteaz	3.4.18
• Peptidil dipeptidaz	3.4.15
• Dipeptidaz	3.4.13
• Omega peptidaz	3.4.19
• Endopeptidaz	3.4.21-3.4.34
Serin proteaz	3.4.21
Sistein protez	3.4.22
Aspartik proteaz	3.4.23
Metalo proteaz	3.4.24
Endopeptidaz (bilinmeyen katalitik mekanizmanın)	3.4.99

Proteazlar katalitik aktivitelere göre Endoproteazlar ve Ekzoproteazlar olmak üzere iki kısımda incelenir. Ekzoproteazlar bir peptit substratının ayırdığı ucuna göre aminopeptidaz ve karboksipeptidaz olarak incelenirken, Endopeptidazlar substratın peptit zincirini uçtan uzakta bir yerde ayırmaktadırlar [36]. Ekzopeptidazların aktivitesini; polipeptid uçlarındaki spesifik amino asitler, ayrılacak olan peptid bağının yakınındaki polipeptid zincirinin konformasyonu ve peptidin uzunluğu belirlemektedir.

Amino peptidazlar, polipeptid zincirinin serbest amino ucunu hidrolizler ve tek bir amino asiti, bir dipeptidi veya bir tripeptidi ayırır. Amino peptidazlar genellikle bakteri ve fungus içeren mikrobiyal türlerde bulunurlar. *A. oryzae* tarafından üretilen amino peptidaz dışında genellikle hücre içi enzimlerdir. Bakteri ve fungustan üretilen amino peptidazların substrat aktiviteleri hidroliz ürünlerinin profilleri temel alındığında farklı olabilir. Örneğin, farklı bakterilerden elde edilen amino peptidazlar,

farklı molekül kütlelerinde olabilmekte ve ihtiyaç duydukları optimum pH ları ve duyarlı oldukları iyonlar farklılık gösterebilmektedir [5].

Karboksipeptidazlar polipeptid zincirini serbest karboksi ucundan hidrolizler. Tek bir aminoasiti ya da bir dipeptidi ayırırlar. Karboksipeptidazlar (CP) kendi aralarında serin, metalloproteaz, sistein, dipeptidil dipeptidaz ve dipeptidaz olarak alt sınıflara ayrılmıştır [37]. Serin karboksipeptidazlar aktif bölgelerinde tüm serin proteazlar için karakteristik olan; Ser, Asp ve His amino asitlerinden oluşan bir katalitik üçlü içerirken metallo karboksipeptidazlar, bir kofaktör olarak, sıkıca bağlı çinko atomu içermektedir [38].

Endopeptidazlar polipeptid zinciri içinde belirli peptid bağları ile hidroliz olurlar [39]. 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) olarak sınıflandırılır.

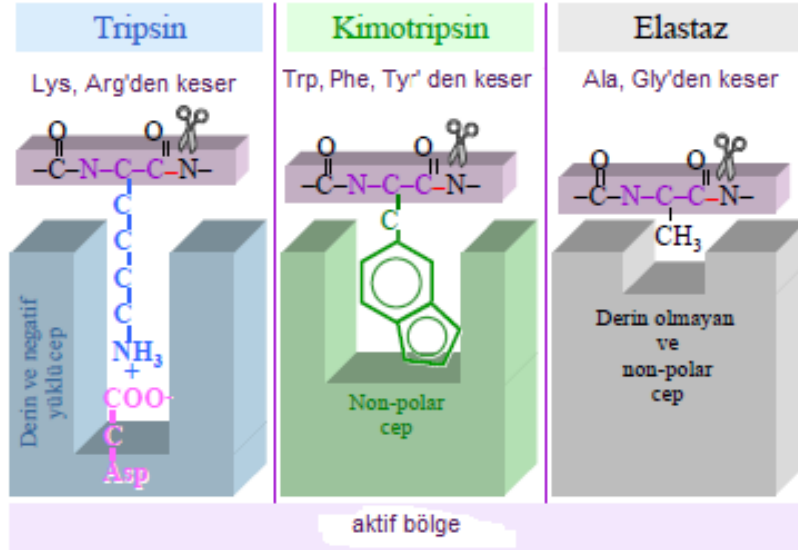
Çizelge 2.3. Katalitik mekanizmalarına göre proteaz sınıfları

Sınıf	Katalitik kısım	örnek
<b>Serin</b>	Ser <sup>195</sup> (His <sup>57</sup> , Asp <sup>102</sup> )	kimotripsin, tripsin, elastaz, trombin, proteinaz 3, faktor Xa, katepsin G,
<b>Sistein</b>	Sis <sup>25</sup> (His <sup>159</sup> )	katepsin B,L,S
<b>Aspartik</b>	Asp <sup>32</sup> (Asp <sup>215</sup> )	pepsin HIV proteaz, rennin, katepsin D
<b>Metallo</b>	Zn <sup>2+</sup>	anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) , MMP-2, MMP-9

### Serin proteazlar

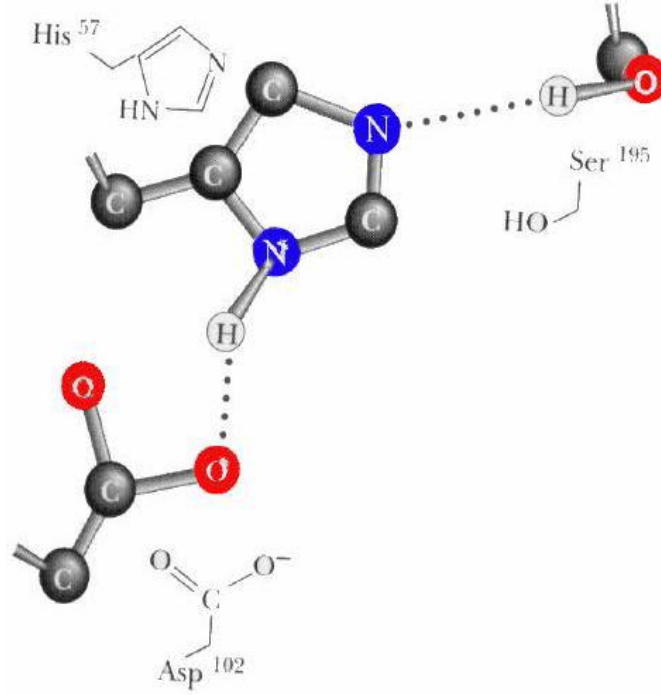
Serin proteazlar genel olarak pH 7-11 arasında değişen nötr ve alkali pH' larda aktif olmalarına rağmen *Bacillus sp.*' ten üretilen serin proteazlar, optimum pH 10-12,5 arasındaki pH 'larda aktiflik gösterebilmektedir [40]. Serin proteazlar birkaç istisna

dışında genelde geniş bir substrat özgülüğüne sahiptirler. 18-35 kDa arasında düşük molekül kütlesine sahip enzimler olmalarına rağmen *Bacillus sp.* türünden 90 kDa molekül kütlesinde elde edileneide görülmüştür [41].



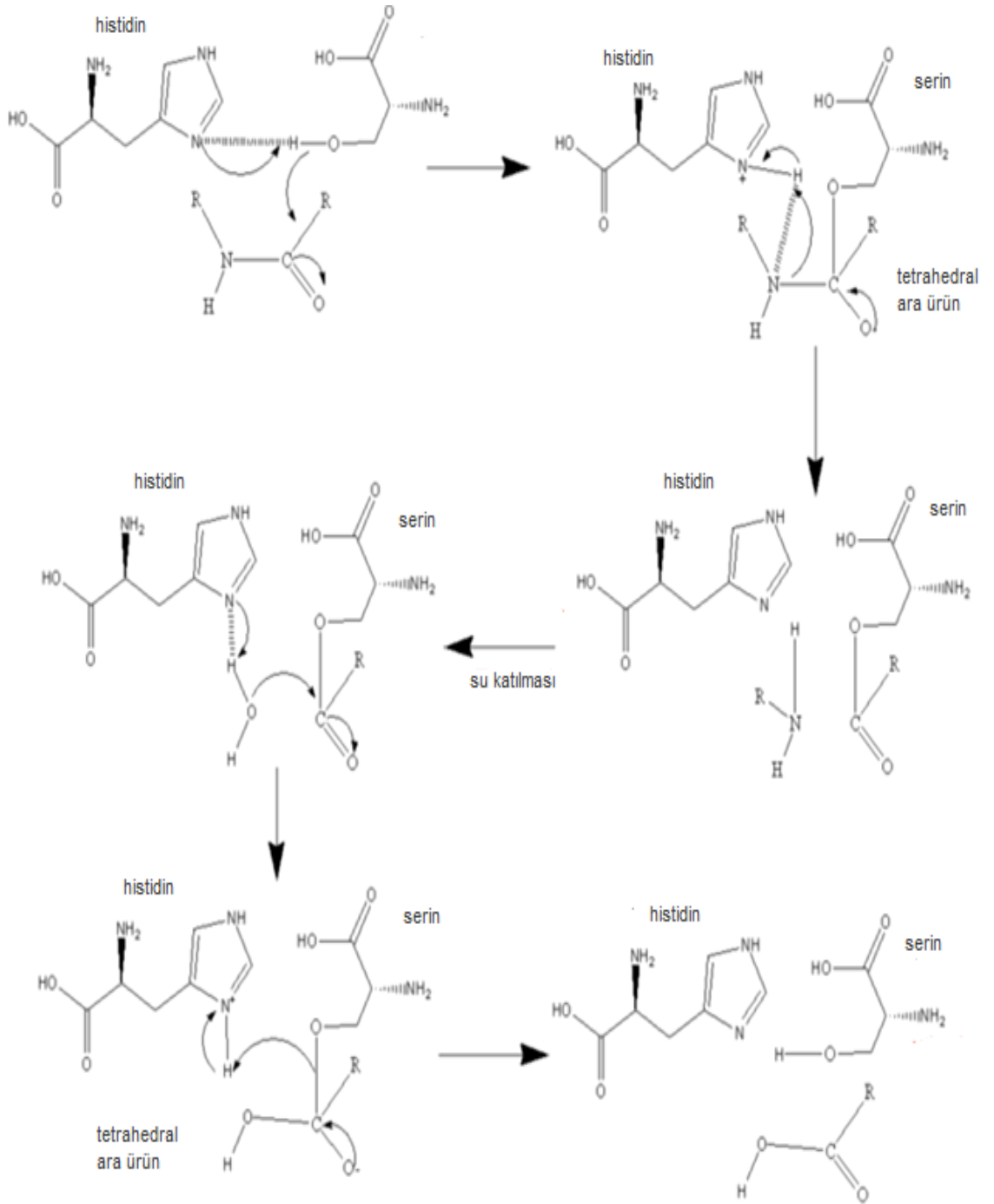
Şekil 2.2 Serin proteazların (tripsin, kimotripsin, elastaz) spesifiteleri

Serin proteazlar kimotripsin, tripsin ve elastaz gibi enzimleri içeren kimotripsin tip ve subtilisin gibi bakteriyel enzimleri içeren subtilisin tip olarak ayrılırsa 2 grupta da incelenebilir. Bu iki grubun aktif bölge yapıları ve katalitik mekanizmaları aynı olmasına rağmen genelde 3 boyutlu yapıları farklılık göstermektedir. Serin proteazlar aktif bölgelerinde nükleofilik bir serin kalıntısı bulunduran bir proteaz türüdür. Bunun yanı sıra bu proteazlar, elektrofil olarak aspartat ( $\text{Asp}^{102}$ ), baz olarak histidin ( $\text{His}^{57}$ ) kalıntısı ve nükleofil olarak serin ( $\text{Ser}^{195}$ ) ile birlikte katalitik üçlü bir yapı oluştururlar. Katalitik bölgede katalizden sorumlu olan ve katalitik üçlü olarak da bilinen amino asitlerin ( $\text{Ser}^{195}$ ,  $\text{His}^{57}$  ve  $\text{Asp}^{102}$ ) düzenlenmesi ve aralarındaki hidrojen bağları Şekil 2.3'te verilmiştir [42].



Şekil 2.3. Katalizden sorumlu Ser<sup>195</sup>, His<sup>57</sup> ve Asp<sup>102</sup> katalitik üçlüsü

Serin proteazlar hedef karbonil bağına nükleofilik atak yaparak peptid bağını katalize eder. Böylece reaktif bir serin kalıntısı ve açıl-enzim ara ürünü oluşur. Serin proteazlarının özgülüğü, onların farklı substrat ilgilerine göre değişir [43]. Serin proteazların kataliz reaksiyonlarını gerçekleştirirken birinci basamakta substrat aktif bölgeye bağlanır. Substrat özgülüğü aktif bölge içinde yer alan kalıntılar tarafından belirlenir ve spesifik bağlanmayı serin ile kesilen peptid bağının karbonil grubu arasındaki yakınlık belirler. Burada peptid bağının kesilmesi ping-pong mekanizması ile meydana gelir. Bu mekanizmada substrat bağlanır, ürün yani peptidin N-terminal ucu ayrılır, diğer substrat olan su bağlanır ve peptidin C-terminal ucu ayrılır.



Şekil 2.4. Serin proteaz katalitik mekanizması

Virüsler, bakteriler ve ökaryotlarda bulunan serin proteazlar, bunların yaşamsal faaliyetleri açısından büyük önem taşır. Serin proteazları belirleyici en tipik inhibitör

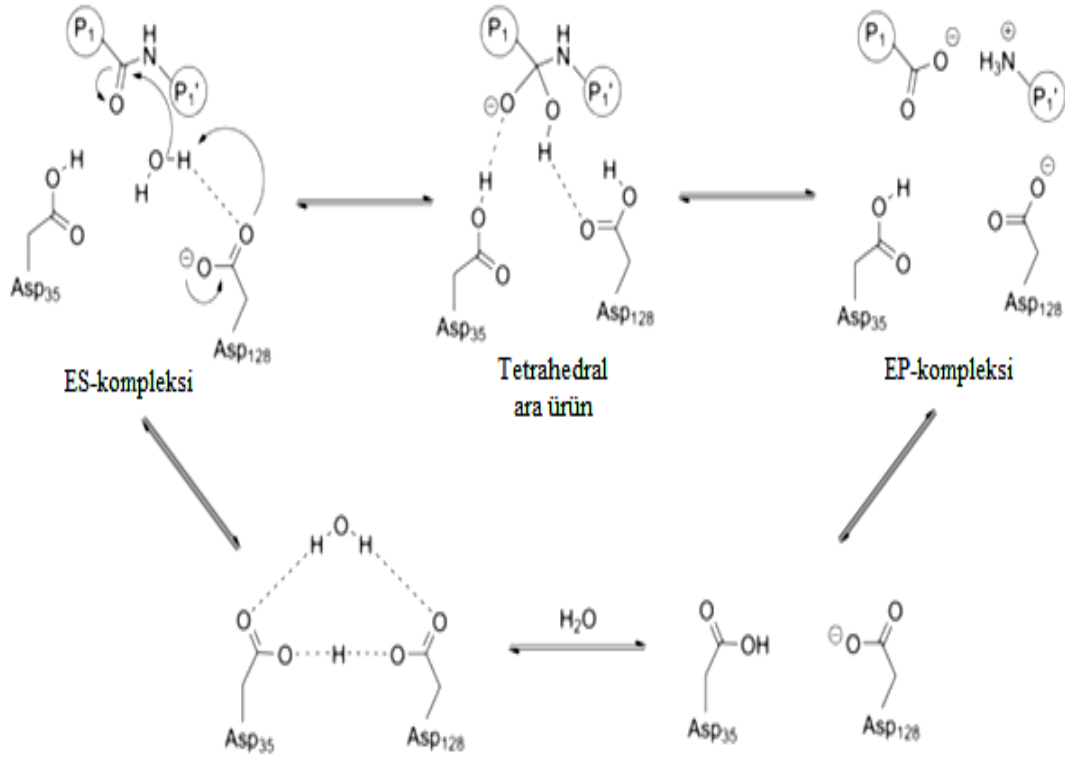
PMSF'dir (fenilmetilsülfonilflorür). DFP (di-izopropilflorofosfat), TLCK (tosil-L-lizinkloro metil keton) 3,4-DCI (3,4-dikloroizokumarin) gibi inhibitörler varlığında ise inhibisyona uğrarlar. İzoelektrik noktaları pH 4-7 arasındadır. Serin proteazların en geniş alt grubunu serin alkalen proteazlar temsil ederler ve yüksek pH'da aktivite gösterirler. Bunlar ise DFP (di-izopropilflorofosfat) ya da patates proteaz inhibitörü tarafından inhibe olurlar ancak TPCK (tosil-L-fenilalaninkloro metil keton) ve TLCK (tosil-L-lizinkloro metil keton) tarafından inhibe olmazlar. Tirozin, fenilalanin ya da lösinin karbonil karbonu tarafından peptid bağını hidrolizlerler. İzoelektrik noktaları pH 9 civarındadır [5].

#### Aspartik (karboksi) proteazlar

Endoproteaz ailesine ait olan aspartik proteazlar (E.3.4.23) hedef substrattaki spesifik peptid bağını katalizleme yeteneğine sahip proteolitik enzimlerdir. Aspartik proteazlar katalitik bölgesinde yer alan ve katalizi gerçekleştiren iki tane aspartil kalıntısı ile karakterize edilirler. Bu proteazlar katalitik aktivitelerine göre pepsin (A1), retropepsin (A2) ve pararetrovirüslerden (A3) elde edilen olmak üzere 3 alt sınıfa ayrılır [44].

Aspartik proteazların en önemli özellikleri pH 3-4 civarında aktif olmalarıdır ve molekül kütleleri 30-45 kDa arasında değişmektedir. Proteinleri hidrolizleme mekanizması için aspartik proteazların genel asit-baz mekanizması Şekil 2.5'te verilmiştir. Bu mekanizmada su reaksiyona doğrudan katılmaktadır [5].

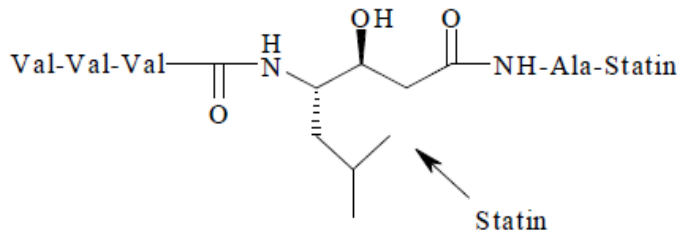




Şekil 2.5. Aspartik proteazlar için genel asit-baz katalitik mekanizması

Aspartik proteazlar genellikle fungus türleri başta olmak üzere, bakteri ve protozoa türleri tarafından üretilir. Pepsin, katepsin D ve E ile renin aspartat endopeptidazların bilinen örnekleridirler.

Aspartik proteazların çoğu, ortamda bakır katyonları bulunduğunda epoksi ve diazo keton bileşiklerine karşı duyarlıdır. Bu enzimler Pepstatin yani *Streptomyces* pepsin inhibitörünün düşük konsantrasyonları tarafından inhibe edilirler [42].



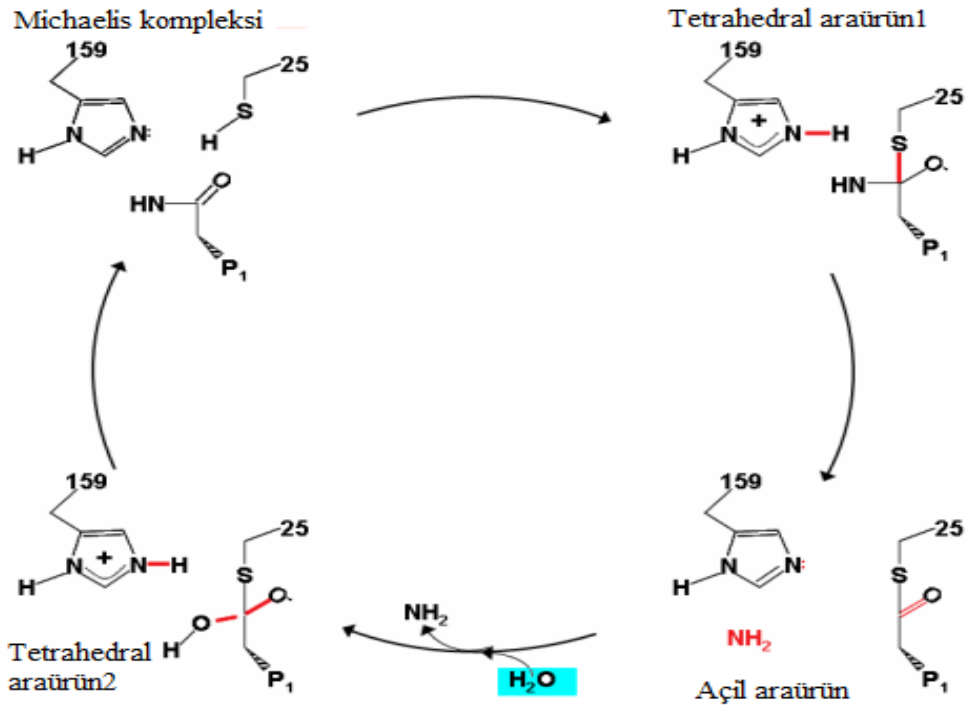
Şekil 2.6. Pepstatin

### Sistein (tiyol) proteazlar

Sistein proteazlar (EC.3.4.22) prokaryot ve ökaryotlar tarafından üretilirler. Bu tip proteazların yaklaşık 20 alt sınıfı tanımlanmış bulunmaktadır. Papain benzeri tiyol proteazlar, tripsin benzeri tiyol proteazlar, glutamik aside özel ve diğer tiplerdeki tiyol proteazlar olmak üzere dört grupta incelenmektedir. En iyi bilinen grup papain benzeri endoproteazlardır [45].

Sistein proteazlar, aktif merkezlerindeki sistein (Cys), histidin (His) ve aspartik asitten (Asp) oluşan üçlü bir katalitik yapıya sahiptir. Sistein proteazların aktif merkezlerinde bulunan -SH (tiyol) grubu, ağır metal iyonları ve okside edici ajanlarla kolayca inhibe edilebilmesinden dolayı önemli enzimlerdir.

Reaksiyon, kovalent bağlı açıl-enzim ara ürününün oluşmasından sonra aktif bölgedeki tiyol grubunun, karbonil karbonuna nükleofilik atağı ile sonlanır [46].



Şekil 2.7. Sistein proteazların katalitik etki mekanizmaları

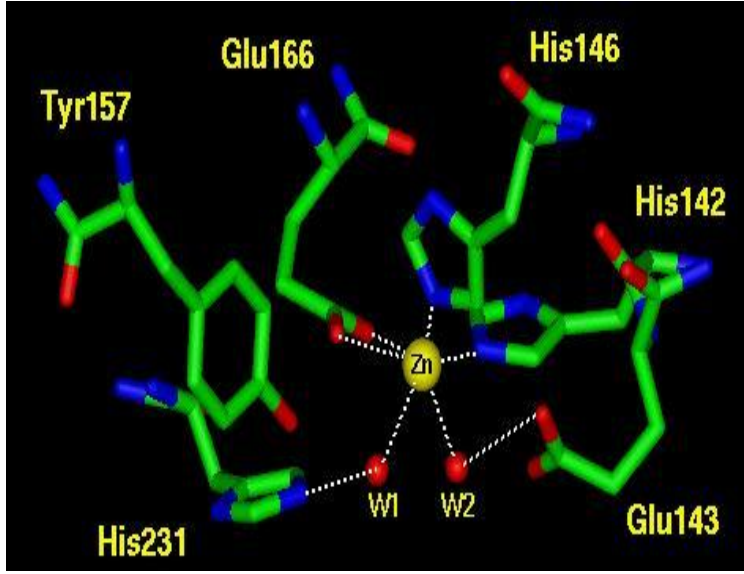
Sistein proteazlar, lizozomal proteazların asidik pH'da maksimum aktivite göstermeleri dışında genellikle optimum nötral pH'larda spesifiktirler. Bunun yanı sıra genellikle sistein ve HCN gibi indirgeyici ajanlar varlığında aktiftirler [10]. Molekül kütleleri 20–35 kDa civarında papain gibi bağıl olarak küçük proteinlerdir. Fakat oligomerik bir enzim olan katepsin C, molekül kütlesi 200 kDa'nun üstünde olan bir proteazdır [46].

### Metallo proteazlar

Metalloproteazlar proteazların en eski sınıflarından biri olup bakteri, mantar ve yüksek organizmalarda bulunurlar. Metalloproteazlar aktivite gösterebilmek için iki değerlikli metal iyonlarının varlığına ihtiyaç duyarlar ve yapısında katyon olarak genellikle çinko ( $Zn^{+2}$ ) bulunmaktadır. Bazı durumlarda çinko, kobalt veya nikel gibi metallere de aktivite kaybı olmadan yer değiştirebilmektedir [47].

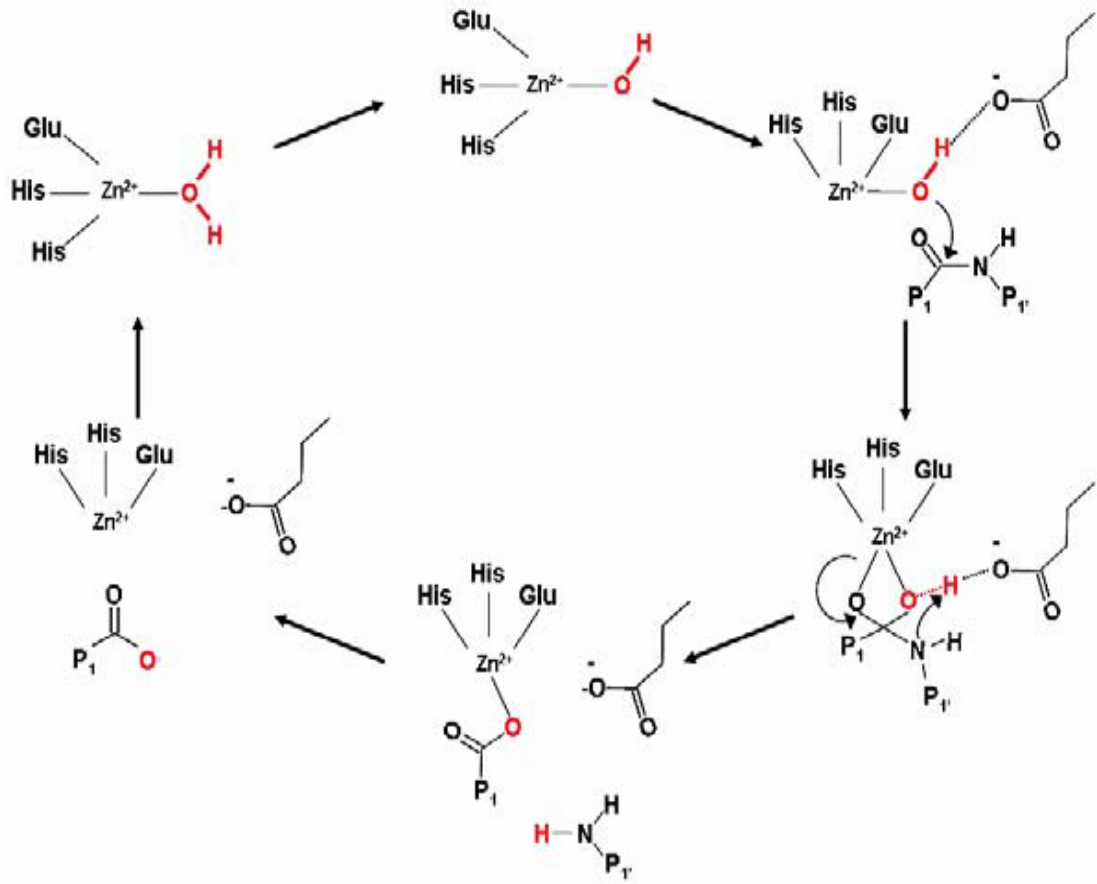
EDTA gibi şelat yapıcı ajanlarla ya da diyaliz ile inaktive edilebilirler. Bakteri ve fungus metalloproteazları, her bir enzimin 18 molekülüne başına bir çinko atomu içeren enzimlerdir. Çinko atomu enzim aktivitesi için şart iken, kalsiyum iyonu ise protein yapısını kararlı kılmak için gereklidir. Metallo proteazların optimum pH ları 5-9 arasındadır.

Metallo proteaz enzim ailesinin 30 tanesinden 17 tanesi endopeptidaz, 12 tanesi ekzopeptidaz ve birisi hem endopeptidaz hem de ekzopeptidaz türüne dahildir. Metallo peptidazlar nötral, alkali, mikrobakter I ve II olmak üzere dört gruba incelenir. Nötral metalloproteazlar hidrofobik amino asitlere karşı spesifisite gösterirken, alkalen metalloproteazların spesifikliğı çok daha geniştir. MikrobakterI'in ayrılan bağı her iki tarafındaki küçük amino asit rezidülerine spesifikliğı yüksek iken, Mikrobakter II peptid bağıının amino tarafındaki lizin rezidülerine karşı spesifiklik gösterir [48]. Nötral bir metalloproteaz olan Termolizin, *B.stearothermophilus* tarafından üretilirler. Molekül kütlesi 34 kDa olup, disülfid köprüleri dışında tek bir peptiddirler. Ayrıca 80°C'de 1 saat yarılanma ömrüne sahip olan çok kararlı bir proteazdır.



Resim 2.2. Termolizinin yapısı

Kristal yapısı bilinen bütün çinko bağlı enzimlerde katalitik çinko atomu üç tane aminoasit ve bir tane su molekülüne bağlanır. Aktif çinko bölgesinde His, Glu, Asp ya da Cys kalıntıları ile oluşturulan kombinasyon üç çatalı (trident) bir yapı meydana getirir ve aktif su molekülü koordinasyon küresini tamamlar [49]. Şekil 2.8'de metalloproteazların katalitik mekanizması verilmiştir.



Şekil 2.8. Metalloproteazların katalitik mekanizması

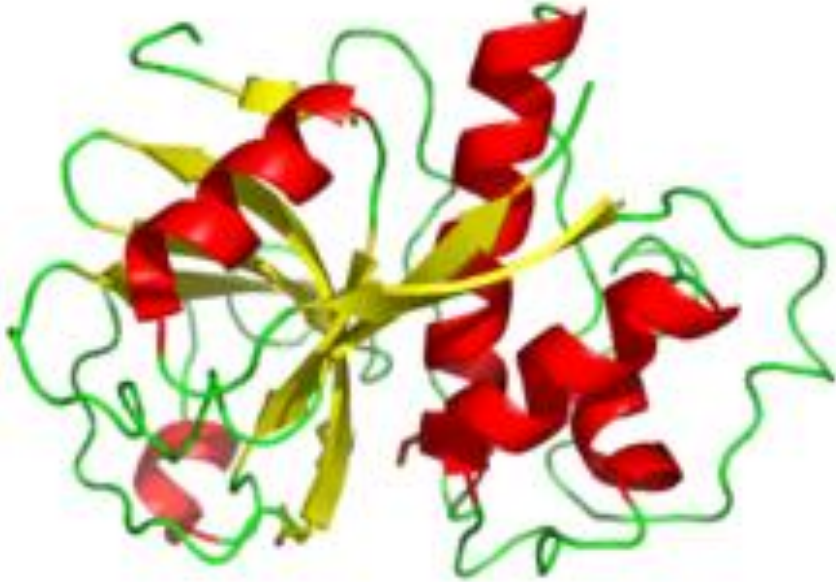
Metalloproteazlar; dokunun yenilenmesi, peptid hormon sinyalinin oluşturulması ve kanser tedavisinde uygulanması gibi fizyolojik ve patolojik proseslerde önemli bir yere sahiptir. Ayrıca *in vivo* ortamda inaktif zimojenlerin oluşturulması, proteinlerin inhibisyonu gibi çeşitli translasyon sonrası form oluşumlarında rol alırlar [50].

## 2.5. Proteaz Kaynakları

### Bitkisel proteazlar

Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanılmasını, bitkinin yetiştiği iklim şartları ve kültivasyon toprağının uygunluğu gibi farklı faktörler etkilemektedir. Bitkisel kaynaklı proteazlar özellikle tropikal bitkilerden elde edilmektedir.

Bitkisel kaynaklı proteazlardan en yaygın olarak bilinenleri papain, bromolein, fisin ve keratinazdır [5]. Papain, Batı ve Orta Afrika ile Hindistan'ın tropikal bölgelerinde yetişen *Carica papaya* meyvesinin öz suyundan izole edilmiştir. Katalitik yapısı sistein<sup>25</sup>, histidin<sup>159</sup>, asparajin<sup>158</sup>'ten oluşurken, molekül kütlesi 23 kDa'dur. pH 5-9 arasında aktiftir ve 80-90 °C sıcaklıkta kararlılığını koruyabilen bir proteaz türüdür. Endüstriyel olarak en çok et endüstrisinde etin yumuşatılması için kullanılmasının yanı sıra, hayvan derisinin işlenmesi, ilaç üretimi, meşrubatların berraklaştırılması, ve acılığın giderilmesi gibi yaygın kullanım alanına sahiptir [5,51].



Resim 2.3. Papainin yapısı

1892'de, ananas öz suyunda proteolitik enzim varlığının keşfi ile 'bromelain' bulunmuştur. Bromelain ilk kez terapötik destek olarak 1957'de tanıtılmış [52] ve o zamandan beri pek çok bilimsel literatürde yerini alarak birçok hastalığa önemli faydaları olduğu kanıtlanmıştır. Bromelainin vücuttaki proteinleri ayrıştırıcı ve sindirici bir enzim olduğu fark edilmiş dolayısıyla enzimin sindirimi veya hazmı kolaylaştıran bir molekül olduğu kanıtlanmıştır. Bu yüzden gıda sanayinde ve bazı kültürlerde et yumuşatıcı olarak kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra bromalein, mide asidine yardımcı olmakla kalmayıp, bağırsaklardaki alkalin ortamada olumlu tesirleri

bulunmaktadır. Enzim, bir sistein proteaz olarak karakterize edilir ve pH 5-9 arasında aktiftir. İnaktivasyon sıcaklığı 70°C olup papainin inaktivasyon sıcaklığından daha düşüktür [5].

Fisin, yüksüz ve aromatik aminoasitler içeren bağlara etkiyen, optimum pH'ı 6,5 olmasının yanı sıra pH 4 -9,5 arasında aktif olan bir enzimdir. Endüstride ise biracılık, et, yem ve deniz ürünlerinde kullanılmaktadır. Fisin enzimi, incirden izole edilen çok yüksek proteaz aktivitesine papain ve bromalaine benzer bir sülfhidril proteazıdır. Enzimin, antik çağda peynir mayası olarak sütün pıhtılaştırılmasında kullanıldığı bilinmektedir. 10-15 g bitkiden 100-150 mg fisin elde edilebilmektedir [53].

Saçı ya da kılları ağartan keratinaz enzimi ise bazı bitkiler tarafından üretilir. Saç ve yünün parçalanması lizin gibi esansiyel amino asitlerin üretilmesi açısından önem taşır. Bu nedenle bu enzimin kozmetik sanayinde kullanımı yaygındır. Atık su sistemlerinde bulunan bu tür doğal atıkların parçalanması açısından da bu enzim önemlidir [5].

### Hayvansal proteazlar

Hayvansal kaynaklı proteazlardan en bilinenler pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve rennindir. Çizelge 2.4'te hayvansal proteazların özgünlük gösterdiği peptid bağları gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. Hayvansal proteazların özgünlüğü

<b>Enzim</b>	<b>Spesifik olduğu bağ</b>
Tripsin	Lys (yada Arg)-----
Kimotripsin	Trp (yada Tyr, Phe, Leu)-----
Pepsin	Phe (yada Tyr,Leu)---Trp (yada Phe,Tyr)
Rennin	Küçük nötral residüler (Ala, Gly,Val)

*Noktalı çizgiler proteazın etki ettiği bölgeyi gösterir.*

Katalitik üçlüsünü serin, histidin ve aspartat oluşturan Tripsin (EC.3.4.21.4) molekül kütlesi 23,3 kDa olan ve gıda proteinlerinin sindirimi için kullanılan pankreas kaynaklı, ince bağırsakta proteinleri parçalayan; temel bir hayvansal proteazdır. Optimum pH'sı 8 ve optimum sıcaklığı da 37 °C'olan enzim, serin proteaz grubuna dahildir.

Kimotripsin (EC.3.4.21.1), 23,8 kDa molekül kütlesine sahiptir. Proteolizi gerçekleştirebilen hayvansal pankreatik ekstraktlarında bulunan sindirim enzimidir. Peptid bağlarını fenilalanin, tirozin ve triptofan rezidülerinden sonraki karboksil gruplarından hidrolizleyen bir serin proteazdır. Kimotripsinin optimum pH'sı 8-9; optimum sıcaklığı 40-45°C'dir. Saf kimotripsin pahalı bir enzim olmakla birlikte yalnızca diagnostik ve analitik uygulamalarda kullanılır. Süt protein hidrolizatlarının deallerjenasyonunda sık kullanılır.

Pepsin, 1836'da Theodor Schwann tarafından keşfedilen ilk hayvansal enzimdir. 34,5 kDa molekül kütlesine sahip olan pepsin (EC.3.4.23.1) gıda proteinlerini peptidlere parçalamak için hemen hemen tüm omurgalıların midelerinde ana hücreler tarafından salgılanan asidik proteazdır. Pepsin pH 1-2 arasında optimum aktivite gösterir ve pH 6'nın üzerinde inaktive olur. Bu enzim iki hidrofobik amino asit arasındaki peptid bağlarının hidrolizini katalizler [5].

Renin, anne sütünü sindirmek için memelilerin midesinde üretilen sütü pıhtılaştırıcı doğal, kompleks bir enzimdir. yeni doğan sütle beslenmiş buzağının kesilen şirdeni hayvansal bazlı renin (rennet) için en yaygın kaynaktır. Renin, bütün süt veren memelilerin midelerinde inaktif pro-renin olarak bulunur. Pepsin işleviyle ya da kendi kendine katalizle aktif renine dönüşür. Süt endüstrisinde süt kazeininin çöktürülmesinde ve lor üretiminde sıkça kullanılmaktadır [5].

### Mikrobiyal proteazlar

Bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteaz eldesinde uygun iklim koşullarının sağlanamaması ve hayvancılık ile ilgili politikalar nedeniyle mikrobiyal kaynaklı



proteaz eldesine daha çok yoğunlaşmıştır. Dünya çapındaki enzim satışının yaklaşık %40'ını mikrobiyal proteazlar oluşturmaktadır.

Ticari proteazların çoğu *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından nötral ve alkalın olarak üretilmektedir [7]. Bakteriyal nötral proteazlar pH 5-8 arasında aktivite gösterirler ve nispeten termostabiliteleri düşüktür. Nötral proteazlar hidrolize edilmiş gıda proteinlerinde daha az acı tat oluşturmaları nedeni ile gıda endüstrisinde hayvansal proteazlara göre daha çok tercih edilmektedir. Hidrofobik aminoasit çiftlerine karşı yüksek afinite göstermeleri bakteriyal nötral proteazların karakteristik özelliğini oluşturur. Bakteriyal alkalen proteazlar ise geniş bir substrat spesifikliğinin olması, pH 10 gibi alkalen koşullarda yüksek aktivite göstermeleri, optimal sıcaklıklarının 60 °C civarında olması gibi özellikleri ile karakterize edilirler.

Fungal proteazların proteaz üretimi bakteriyel proteazlardan daha karmaşıktır. Asidik, nötral ve alkalen proteaz üretimi gibi çok çeşitli enzim üretirler. Asidik proteazlar genelde fungal kaynaklıdır. Fungal proteazlar pH 4-10 gibi geniş bir aralıkta aktif olmasının yanı sıra geniş bir substrat özgünlüğü sergilemektedir. Fakat, bu proteazların reaksiyon hızları ve bakteriyel proteazlara göre sıcaklık toleransları daha düşüktür. Fungal asidik proteazların pH 4-4,5 arasında optimum aktivite gösterirken, pH 2,5-6 arasında kararlılığını koruyabilmektedir. Dar pH ve sıcaklık özgünlüklerinden dolayı peynir üretimine elverişlidir. Fungal nötral proteazlar ise pH 7'de aktif olan metaloproteaz türü olmalarından dolayı şelatlayıcı ajanlar varlığında inhibe olurlar. Fungal alkalen proteazlar, gıda protein modifikasyonunda kullanılmaktadır.

Viral proteazlar, AIDS ve kanser gibi hastalıkların çoğalması ve bu hastalıklara neden olan virüs proteinlerinin fonksiyonlarının araştırılması nedeniyle giderek önem kazanmaktadır. Pek çok virüste serin, aspartik ve sistein peptidaz bulunmaktadır. Virüs kodlu tüm peptidazlar endopeptidaz ailesindedir. Yapılan araştırmalar bu hastalıkların yayılmasını ve öldürücü etkisini engellemek amacıyla etkili inhibitörlerin dizaynını sağlayabilmek için viral proteazların üç boyutlu yapısı ve bunların sentetik inhibitörlerle etkisi üzerine odaklanmıştır [48].

## 2.6. Kaynak Araştırması

Patel ve arkadaşları, 2006'da yaptıkları çalışmada bir haloalkalifilik *Bacillus sp.* bakterisinden molekül kütlesi 30-32 kDa olarak buldukları ekstraselüler alkalın proteazı homojen bir şekilde saflaştırmışlardır. Enzimin aktif olduğu pH'ın 10-11 olduğunu saptamışlardır. Enzim katalizi 37° ile 55 °C arasında %2 lik tuz varlığında gerçekleşmiştir. Enzimin en aktif olduğu sıcaklığın 37 °C'dir ve 45 °C de ise aktivitesinin %50 sini koruduğu gözlenirken, 55 °C üzerindeki sıcaklıklarda oldukça kararsızdır. Bunun yanı sıra yüksek sıcaklıklarda enzimin NaCl ve CaCl<sub>2</sub> varlığında yeteri kadar kararlı olduğu görülmüştür. SDS ve TritonX-100 yüzey aktif maddeleri varlığında kararlı kalmıştır. Proteazın üre denatürasyonuna duyarlı olduğu görülmüştür ve denatüre proteinin renatürasyonu in vitro koşullarda çeşitli faktörlerden etkilenmiştir. Protein konsantrasyonunda diyaliz ile renatürasyonu için belirgin bir rol oynamıştır. pH, tuz ve redoks koşullarının renatürasyonu önemli ölçüde etkilemediği görülmüştür [54].

Towatana ve arkadaşları 1999'da yaptıkları çalışmada alkalın proteaz enzimini; bir kaplıca toprağı numunesinde izole edilen alkalifilik ve termofilik *Bacillus sp.* PS719' u süpernatant kültüründen saflaştırmışlardır. Saflaştırma için amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından DEAE-selüloz ve  $\alpha$ -kazein agaroz kolon kromatografisi yöntemlerini uygulayarak homojen bir saflaştırma gerçekleştirmişlerdir. Jel elektroforezinin protein bandında denatüre olan ve denatüre olmayan kısım 42 kDa civarında tek bir band olarak gözlenmiştir. Bundan yola çıkarak enzimin tek bir polipeptid zincirinden oluştuğu düşünülmüştür. Enzimin izoelektrik noktası yaklaşık 4,8 olarak bulunmuştur. Proteaz enzimi en yüksek aktivitesini azokazeine karşı pH 9'da ve 75 °C'de sergilemiştir. Enzimin aktivitesi Ca<sup>2+</sup> varlığında artış gösterirken, Fe<sup>2+</sup> veya Cu<sup>2+</sup> varlığında inhibe olmuştur. Enzim, Ca<sup>2+</sup> ortamda olmadığı zaman ise pH 8 ila 10 arasında, 80 °C'ye kadar kararlılığını korumuştur. PMSF ve DCI (3,4-dikloroizokomarın)'nın yanı sıra TLCK(N-a-p-tosly-L-lizin klorometil keton) 'nın da enzimi tamamen inhibe ettiği görülmüştür ve bundan yola çıkarak enzimin tripsin benzeri serin proteaz olduğu belirlenmiştir. Çeşitli oligopeptidil-p-nitroanilide testleri; proteaz enziminin, substratın karboksil ucundaki arginin kalıntılarından böldüğünü

göstermiştir. N-karbobenzoksi-L-arjinin-p-nitroanilid'in enzimle muamelesinden sonra p-nitroanilin serbest kalmıştır. Enzimin Km ve Vmak değerleri sırasıyla 0,6 mM ve 1,0  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$  olarak tespit edilmiştir [55].

Yang ve arkadaşları, 2000 yılında *B. Subtilis* Y-108'den proteaz enzimini; Amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sefaroz CL-6B iyon değişim kromatografisi ve Sephacryl S-200 jel geçirim kromatografisi ile üç basamakta saflaştırmışlardır. SDS-PAGE ile enzimin molekül kütlesi 44 kDa olarak bulunmuştur. Enzim en yüksek aktivitesini substrat olarak kazeinin kullanıldığı pH 8'de ve 50 °C'de göstermiştir.  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  iyonları varlığında enzim aktivitesi artış gösterirken,  $\text{Hg}^{2+}$  iyonu ile tamamen inhibe olmuştur. Enzim; EDTA gibi metal şelatlayıcı reaktifler,  $\beta$ -merkaptotanol gibi sülfidril reaktifler, sistein hidroklorür, histidin ve gliserol tarafından tamamen inhibasyona uğramıştır. EDTA proteazı tamamen inhibe etmekte en etkili inhibitördür. Bundan yola çıkarak enzimin metal iyonlarını bağlayan molekülere karşı duyarlı bir nötral proteaz olduğu kanısına varılmıştır [56].

Adinarayana ve arkadaşları 2003 yılında yeni izole edilmiş *Bacillus subtilis* PE-11'den termostabil alkali serin proteaz saflaştırmışlardır. Enzim saflaştırması amonyum sülfat çöktürmesi ve Sefadeks G-200 jel filtrasyon kromatografisiyle iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Enzimin molekül kütlesi SDS-PAGE ile 15 kDa olarak tespit edilmiştir ve 21 kat saflaştırma ile %7,5 verim elde edilmiştir. Kazein substratı ile enzimin en aktif olduğu sıcaklık 60 °C ve en aktif olduğu pH 10 'dur. Enzim pH 8-10 arasında kararlılığını korumaktadır. Enzim  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ve  $\text{Mn}^{2+}$  iyonları varlığında yüksek aktivite göstermiştir. PMSF ve DFP gibi inhibitörlerle kuvvetlice,  $\beta$ -merkaptotanol ile kısmen inhibe olmuş fakat EDTA inhibitöründen etkilenmemiştir. 10 mM  $\text{CaCl}_2$  ve 1M glisin varlığında enzim aktivitesinin 3 saat sonra bile %52 sini koruduğu gözlenmiş ve kan lekesini giderdiği tespit edilerek deterjan formülasyonunda kullanılabileceği vurgulanmıştır [57].

Dias ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları çalışmada Minas Gerais'in güneyi ve Brezilya'daki kahve fermantasyonlarından izole edilen biri kültür (*B. Sp ATCC6633*) diğeri yabancı tür (*B.Sp. UFLA817CF*) olan iki çeşit *Bacillus subtilis* soyundan

alkalin proteaz salgılanmasını incelemişlerdir. Suşlar, sodyum kazeinatlı nutrient broth ve peynir suyu tozuyla 3 farklı konsantrasyonda hazırlanmış nutrient broth besiyerlerinde çoğaltılmıştır. Örnekler proteolitik aktivite, protein içeriği, ve hücre popülasyonlarını incelemek için 24 saat aralıklarla incelenmiştir. En fazla proteaz aktivitesi her iki mikroorganizma için 24 saatlik çoğalmada gözlenmiştir. *B. Sp UFLA817CF* en yüksek enzim aktivitesini pH 9 da ve 40 °C de göstermiştir. Bu çalışmada üretilen enzimlerin pH 7 de 40° ve 50 °C de kararlılığını koruması sonucu, proteolitik enzim üretiminde peynir suyu tozu kullanımının endüstride bir alternatif olacağı kanısına varmışlardır [58].

Johnwesly ve arkadaşları 2001 yılında yaptıkları çalışmada şeker kamışından izole ettikleri *Bacillus sp. JB-99'* den termostabil alkalın proteaz saflaştırmışlardır. 250 ml'lik erlene 10g/l NaNO<sub>3</sub>, 10g/l sitrikasid, 5g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3g/l MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2 g/l CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 5g/l NaCl ve 10g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> içeren pH 10 çözeltisinde 55°C de 180 rpm de 24 saat inkübe edilmiştir. Enzim verimi üzerinde karbon ve azot kaynaklarını incelenmiş ve en iyi karbon kaynağı olarak sitrik asit, çözünür nişasta, fruktoz ve rafinoz, en iyi nitrojen kaynağı olarak NaNO<sub>3</sub> ve KNO<sub>3</sub> olduğu tespit edilmiştir. Optimum sıcaklık 70°C optimum pH 11' dir. Ortamda 10 mM Ca<sup>2+</sup> olduğunda optimum sıcaklığı 80 °C olmuş ve bu sıcaklıkta 1 saat aktivitesinin %78 ini korumuştur. Proteolitik aktivitesini PMSF ve TPCK inhibe etmiştir. Enzim aktivitesi 10 mM Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> iyonlarıyla artarken, 10 mM Fe<sup>3+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, ve Zn<sup>2+</sup> varlığında inhibe olmuştur. Enzim aktivitesinin %5 lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile stabil kaldığı gözlenmiştir [30].

Padmapriya ve Williams 2012'de yaptıkları çalışmada, *Bacillus sp.'* ten nötral proteazı saflaştırıp optimize etmek için farklı pH, sıcaklık, karbon ve nitrojen kaynakları ile inceleme yaparak enzimi 48 saat fermente etmişlerdir. Enzim aktivitedeki kararlılığını pH 6-9 arasında korumuş ve optimum pH'ı 7 olarak belirlenmiştir. Enzimin optimum sıcaklığı 37°C dir ve 30°-60°C arasında kararlılığını koruduğu gözlenmiştir. En iyi karbon ve nitrojen kaynaklarının nişasta ve peynir suyu proteinleri olduğu tespit edilmiştir. Proteaz enzimi üretimi için en iyi tampon fosfat tamponudur ve saflaştırma amonyum sülfat çöktürmesi ve diyalizi ile

gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan enzimin karakterizasyonu için molekül kütlesi SDS-PAGE ile 50 kDa olarak bulunmuştur. Bu sonuçlardan yola çıkarak endüstride hücre dışı proteaz üretimi için *Bacillus* ların iyi bir üretici olduğunu ileri sürmüşlerdir [59].

Reddy ve arkadaşları. 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada topraktan izole edilen *Bacillus* sp. RKY3'ten proteaz enzimini saflaştırmışlardır. Saflaştırma işlemi ham ekstraktın amonyum sülfat çöktürmesinden sonra anyon değişim kromatografisi uygulanması ile iki aşamada saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin molekül kütlesi yaklaşık olarak 38 kDa olarak tespit edilmiştir. Enzimin optimum sıcaklığının 60 °C dir ve 60 °C'nin üzerinde aktivitesini kaybettiği gözlenmiştir. Enzimin pH 7-9 aralığında oldukça aktiftir. Bunun yanı sıra pH 5-11'e kadar olan aralıkta kararlılığını koruduğu gözlenmiştir. Enzimin PMSF (1mmol/l) ile tamamen inhibe olmasıyla enzimin bir serin proteaz olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Enzim; yükseltgenlere (%2lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), indirgeyici reaktiflere (%2lik sodyum dodesil sülfat) ve benzen, hekzan, toluen gibi organik çözücülere karşı kararlılığını korumuştur. Enzimin geniş bir substrat çeşitliliğine karşı aktivite göstermesi sonucu özellikle gıda sanayisinde soya proteini ve jelatin hidrolizi için ticari uygulamada kullanılabilirliğini düşündürmüştür [60].

Genckal ve Tari 2006 yılında yaptıkları çalışmada aşırı alkalın koşullar altında izole ettikleri *Bacillus* suşlarının yüksek proteolitik aktivitelerini irdelemişlerdir. I18, L18 ve L21 olarak kodlanan üç suş, 85 izolat arasından yüksek alkalın proteaz aktivitesi göstermiştir. Optimum sıcaklıklar I18, L18 ve L21 suşları için sırasıyla 30°C, 37°C ve 37 °C iken optimum çalkalama hızları ise I18 için 100 rpm, L18 ve L21 için 180 rpm dir. Suşlar 96 saat inkübe edilmiştir. En yüksek spesifik proteaz aktivitesi göstermesi ve daha geniş pH aralığında aktif olması nedeniyle *Bacillus* sp. L21 suşu çalışmanın devamı için tercih edilmiştir. Bu suştan saflaştırılan proteazın optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 11 ve 60 °C'dir. Enzim PMSF ile tamamen inhibe olurken, EDTA ile aktivitesinin %93 ünü koruduğu gözlenmiştir. Bu sonuç enzimin deterjan katkı maddesi olarak kullanılabilirliği sonucuna ulaştırmıştır [45].

Safey ve Raouf 2004 yılında yaptıkları çalışmada, *Bacillus subtilis* enziminden proteaz enzimini saflaştırıp karakterize etmişlerdir. *Bacillus subtilis*' in hücre çoğalması broth besiyerinde gerçekleşmiş ve proteaz üretimi için optimum substrat konsantrasyonu %0,5 ve optimum inkübasyon süresi 30 saat, optimum inkübasyon sıcaklığı 40 °C, optimum pH 7 ve en iyi tamponu fosfat tamponudur. En iyi broth içeriği et ekstraktı ve NaCl, optimum karbon kaynağı olarak laktoz, optimum nitrojen kaynağı olarak (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, en iyi aminoasit valin, kullanılan organik asitler ise ; asetik, sitrik, laktik asitlerdir. Proteaz enzimi saflaştırması için amonyum sülfat çöktürmesi ve Sefadex G-200 filtrasyon yöntemi uygulanmıştır. Enzim spesifik aktivitesi 6381,75(unite/mg prot/ml<sup>-1</sup>) bulunması ile 7,87 kat saflaştırılmıştır. Proteaz aktivitesi % 0,5 lik jelatin substratıyla 35° C' de artış göstermiştir. Saf enzimin maksimum aktivitesi pH 7 fosfat tamponu ile 24 saatlik inkübasyon süresi ile elde edilmiştir. Bu sonuçlar ile mikrobiyal proteazların endüstri için iyi bir saflaştırma ve üretici potansiyeline sahip olduğunu düşünmüşlerdir [61].

Ramakrishna ve arkadaşları 2010 yılında mezbaha toprağından izole edilen bir *Bacillus Subtilis* (KHS-1) (MTTC N0-10110)' den alkali proteaz enzimini saflaştırma çalışması yapmışlardır. Proteaz saflaştırma işlemi için amonyum sülfat çöktürmesi ve Sefadeks G-200 yöntemleri uygulanmıştır. Enzimin proteolitik aktivitesini incelemek için kazein zimogram testi yapılmış ve SDS-PAGE ile molekül kütlesi 20,5 kDa olarak bulunmuştur. En yüksek aktivite kazein substratı ile 60 °C sıcaklıkta pH 10,5 ta elde edilmiştir. Saf proteazın, Ca<sup>2+</sup> ile %42, β-Merkapto etanol ile %28 aktivitesi elde edilirken, Mg<sup>2+</sup> ve Mn<sup>2+</sup> iyonları ile aktivitelerinin arttığı görülmüştür. Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> ve Al<sup>3+</sup> iyonlarıyla ise inhibe olmuştur. Yapılan testler sonucu saflaştırılmış enzimin keçi kılı arındırılmasında, kan lekesi giderilmesinde ve X-ray filmi yüzeyindeki jelatinin degradasyonunda başarılı olduğu görülmüştür [62].

Das ve arkadaşları 2010'da yaptıkları çalışmada Bangalore'nin çeşitli yerlerinden alınan dört farklı toprak örneğindeki bakteri suşunu izole edip proteaz enzimi saflaştırmışlardır. Optimum çoğalma sıcaklığının 37 °C, pH' ının ise 8 bulunması ile

suşun *Bacillus subtilis* olduğu kanısına varmışlardır. Ayrıca kültür, karbon ve nitrojen testinde optimize edilmiştir ve sırasıyla dekstroz ve pepton da aktif bulunmuştur. Enzim üretimi, 1 litre optimize ortamda 37 °C’de 48 saat pH 8.0 de fermente edilmiştir. Toplanan proteaz ürünü amonyum sülfat çöktürme yöntemi ile saflaştırılmıştır. Daha sonra kolon kromatografisi uygulanmış ve enzim SDS-PAGE ile karakterize edilmiştir. Sonuç olarak üzerinde çalışılan *Bacillus subtilis* ‘in endüstri için iyi bir hücre dışı proteaz üreticisi olduğunu belirtmişlerdir [63].

Joo ve Chang 2005 yılında yaptıkları çalışmada pis gelgit çamurundan ve Kuzey Kore denizinden izole edilen *Bacillus subtilis* I-312’den endüstriyel öneme sahip oksidatif ve SDS-kararlı bir alkalın proteaz saflaştırmışlardır. Suşun çoğaldığı besiyerinde şu unsurlar yer almaktadır ( $g/l^{-1}$ ) : soya fasulyesi unu, 15; buğday unu, 10; fruktoz, 5;  $K_2HPO_4$ , 4;  $Na_2HPO_4$  1;  $CaCl_2$ , 0,05;  $Na_2CO_3$ , 8. Bu besiyerde 32°C’ de 250 rpm hızda 48 saat inkübe edilmiştir. Optimum pH 11, sıcaklık ise 60 °C dir. Enzim 72 saatte %5 lik SDS e karşı aktivitesinin %87,8’ ini korurken, yükseltgen maddelerden %5 lik  $H_2O_2$  ‘e karşı aktivitesinin %87,5’ ini korumuştur. Böylece bu çalışma ile, *Bacillus subtilis*’ ten üretilen alkali proteazın SDS ve yükseltgeyici ile aktivitesinin büyük kısmını korumasının yanında enzimin geniş bir pH aralığında stabil kalmasının deterjan formülasyonlarında kullanılabilirliği açısından iyi bir potansiyel gösterdiği vurgulanmıştır [64].

Shah ve arkadaşları 2010’da yaptıkları çalışmada, kontamine ham petrol örneklerinden izole ettikleri *Bacillus cereus*’ dan organik çözücüleri, deterjanları ve okside edici ajanları tolere edebilen bir proteaz saflaştırmışlardır. Saflaştırma amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE iyon değişim kromatografisi ve Sefadex Jel filtrasyon kromatografisi olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Enzim saflaştırması yaklaşık %11 verimle 58 kat olarak gerçekleşmiştir. SDS-PAGE yöntemi ile enzimin molekül kütlesi 38 kDa olarak tayin edilmiştir. Enzimin optimum pH’ ı 8, optimum sıcaklığı ise 60°C olarak bulunmuştur. Enzim  $Cr^{3+}$ ,  $Hg^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  gibi ağır metaller varlığında inaktif olurken  $Li^+$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  metallere etkilenmediği görülmüştür. Bunun yanı sıra saf enzim TritonX-100 ve Tween 80 gibi noniyonik deterjanlar ve hidrojen peroksit gibi okside ve ağartıcı bir

ajan varlığında kararlılığını koruduğu gözlenmiştir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda saflaştırdıkları proteazın deterjan formülasyonunda, enzimatik peptit sentezinde, biyotransformasyon reaksiyonlarında ve çürüme önleyici ajanların formülasyonlarında kullanılabileceği sonucuna varmışlardır [65].

Cho ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada biyofiziksel gen dizilişinin 16SrNA olduğu düşünülen bir Kore soya fasulyesinden izole ettikleri *Bacillus amyloliquefaciens* FSE-68' den amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi yöntemleriyle bir alkalın serin proteaz (APR68) ve bir nötral metalloproteaz (NPR68) saflaştırılmıştır. Metalloproteazın ve serin alkali proteazın molekül kütleleri sırasıyla 33 kDa ve 27 kDa civarlarında gözlenirken, optimum pH' ları sırasıyla 6,5 ve 10 olarak tespit edilmiştir. Saflaştırma sonucunda metalloproteaz dan % 60,1 verim, serin proteazdan % 66,8 verim elde edilmiştir [66].

Bundela ve Mandal 2013 yılında yaptıkları çalışmada lokal olarak izole edilmiş *Bacillus subtilis*' ten serin alkali proteaz saflaştırmışlar ve kısmi karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu suş yüksek alkali bir ortamda (pH 10) çoğaltılmıştır ve hücre dışı proteolitik enzim elde edilmiştir. Alkali proteaz, amonyum sülfat çöktürmesi ve Jel filtrasyonu yöntemleri ile iki aşamada saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin molekül kütlesi sodyumdodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile yaklaşık 30 kDa olarak belirlenmiştir. Enzimin 20-60° C aralığındaki sıcaklıklarda aktif olduğu gözlenmiştir ve optimum aktivitesi pH 10,5 ile 55°C de elde edilmiştir. Proteazın karakterizasyonunda  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Ca^{2+}$  metal iyonları maksimum aktivite göstermiştir. Enzimin serin alkali proteaz olduğu PMSF inhibitörü ile teyit edilmiştir. Bu alkali serin proteazın sıcaklık ve pH kararlığı da endüstriyel uygulamalar için potansiyel avantaj sağladığını göstermektedir [67].

Kumar ve arkadaşları 2012' de yaptıkları bir başka çalışmada bir amilolitik ve proteolitik bakteri suşu olan *Bacillus sp.* HPE10' u toprak numunesinden izole etmişlerdir. Nişasta ve yağsız süt içeren ortamda bakteri izlenmiştir ve Bargey'in yöntemi ve 16S rDNA dizi analizi kullanılarak suşun *Bacillus subtilis* olduğu karakterize edilmiştir. *Bacillus sp.*' ten amilaz ve proteaz elde edebilmek için uygun



fiziksel ve kimyasal koşullar (pH, sıcaklık, inkübasyon periyodu, uygun karbon ve nitrojen kaynakları) sağlanmıştır. Amilaz üretiminin 120 saatlik inkübasyon sonrasında pH 6'da laktoz ve sodyum nitrat içeren ortamda 50 °C de, proteaz üretiminin ise 120 saatlik inkübasyon sonrasında pH 9' da glukoz ve pepton içeren ortamda 45 °C' de gerçekleştiği saptanmıştır. Enzimlerin saflaştırılması kolon kromatografisi ile molekül kütlesi ise SDS-PAGE ile belirlenmiştir. Her iki enzimin molekül kütleleri 30 kDa civarında tek bir band olarak elde etmişlerdir. Bu çalışma ile endüstride özellikle deterjan formülasyonlarında proteaz ve amilazın birlikte kullanılabilirliğine değinmişlerdir [68].

Nadeem ve arkadaşları 2013' te yaptıkları çalışmada *B. licheniformis* UV-9' dan alkali proteaz saflaştırmışlar ve deterjan formülasyonlarında kullanımı için karakterize etmişlerdir. Enzim amonyum sülfat çöktürmesi ve Sefadex G-100 jel filtrasyon kromatografisiyle 36,83 kat spesifik artış ve %11 verimle homojen bir şekilde saflaştırılmıştır. Molekül kütlesi SDS-PAGE ile 36,12 kDa bulunmuştur. Kazein substratı ile Km ve Vmax değerleri sırasıyla 5mg/ml ve 61,58 M/ml/dak olarak elde edilmiştir. Enzim en yüksek aktivitesini pH 11 ve 60°C sıcaklıkta göstermiştir. pH 8-11 arası ve 30-50 °C aralığındaki sıcaklıkta enzimin kalan aktivitesinin %80 ini koruduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte enzim 10 mM Ca<sup>2+</sup> varlığında pH 11 ve 60 °C sıcaklıkla birlikte enzim aktivitesinin %90' dan fazlasını korumuştur. Fenil metil sülfonil florür (PMSF), ile tamamen inhibe olması bu enzimin serin proteaz olduğunu düşündürmüştür. Mg<sup>2+</sup> ve Ca<sup>2+</sup> metal iyonları aktiviteyi sırasıyla %128 ve %145 olarak artırmıştır. Saflaştırılan enzim, Tween-20, Tween- 45, Tween-65 ve Triton X-45 gibi yüzey aktif maddelere karşı aşırı kararlılık göstermiştir. Bu enzim ayrıca oksitleyici maddelerden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve sodyumperborat varlığında %100'den fazla aktivite göstermiştir. Bu biyokimyasal özelliklerle *B. licheniformis* UV-9 dan saflaştırılan proteaz enziminin potansiyel çamaşır deterjanı enzimi olabileceği yorumlanmıştır [69].

Jin ve arkadaşları 1996 yılında *Clostridium perfringens* tip B NCIB10691'den amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından iyon değişim ve hidrofobik etkileşim

kromatografisi yöntemlerini kullanarak proteaz enzimini saflaştırmışlardır. SDS-PAGE yöntemi ile enzimin molekül kütlesi 36 kDa olarak belirlenmiştir. Metal şelatlarından EDTA ve EGTA ile çinko spesifik şelatı olan 1,10-fenantrolin varlığında enzimin aktivitesinin kaybolduğu görülmüştür. PMSF, APMSF ve DTT gibi ajanlardan da etkilenmemiştir. Saf enzimden çıkarılan aminoasit dizisinde HEXXH motifi olduğu görülmüş ve bunlardan yola çıkarak enzimin çinko bağlı metaloproteaz olduğu saptanmıştır [70].

Huang ve arkadaşları 2002 yılında *Bacillus pumilus*'dan proteaz üretimi için %3 kepek, %2 soya fasulyesi unu, %0,3 maya ekstraktı, %0,3 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, %0,04 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve %0,4 CaCO<sub>3</sub> içeren besiyerinde 35°C' de 36 saat boyunca fermentasyon uygulamışlardır. Proteaz hidrofobik etkileşim kromatografisi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon ile 39 kat saflaştırılmış ve molekül kütlesi 32 kDa olarak bulunmuştur. Enzim pH 10 da ve 55 °C'de en yüksek aktivitesini göstermiştir. Saf proteazın ilk 20 aminoasit kalıntısının dizilimini AQTVPYQIPQIKAPAVHAQG olarak tespit edilmiş ve amino asit dizilimi *B. pumilus* suşundan elde edilen diğer proteazlarla büyük oranda homojenlik gösterdiğini farketmişlerdir. Enzimin 1mM PMSF ve 1 mM DFP ile tamamen inhibe olduğunu fakat EDTA, EGTA ve pepstatin A inhibitörlerinden etkilenmediği gözlenmiştir. Metal testinde ise Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> ne Na<sup>+</sup> iyonlarının aktiviteyi artırırken Cu<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup>'nin ise aktiviteyi azalttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak saflaştırılan enzimin serin proteaz olduğu saptanmıştır. Serin proteazı ham deri üzerine 37°C'de 4 saat boyunca uygulamışlar ve proteazın kılları uzaklaştırdığı gözlemlemişlerdir [71].

Kazan ve arkadaşları (2005), *Bacillus clausii* GMBAE 42'den hücre dışı serin alkalın proteaz üretimi için proteince zengin, başlangıç pH'ı 10,5 olan ortamda 3 gün inkübe etmişlerdir. Enzim, amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisi ile %58 verimle 16 kat saflaştırılmıştır.. Saflaştırılan enzimin molekül kütlesi SDS-PAGE ile 26,5 kDa bulunmuştur. Enzimin optimum sıcaklığının 60 °Cdir. 5 Mm Ca<sup>2+</sup> varlığında bu sıcaklığın 70 °C olduğu gözlenmiştir. Enzim pH 10,5'da 30 °C ve 40 °C'de 2 saat kararlılığını korurken, 50 °C ise aktivitesinin %14'ünü kaybettiği görülmüştür. Saflaştırılan enzim; %1 (m/v) Tween-20, Tween-

40, Tween-60, Tween-80, ve %0,2 (m/v) SDS olduğu ortamda pH 10,5 ve 30 °C'de 1 saat kararlılığını korumuştur. Fakat %1 sodyum perborat ile %10 aktivite kaybına uğramıştır.. Enzim PMSF ile tamamen inhibe olmuştur ve N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA için  $K_m$  ve  $k_{cat}$  değerlerinin sırasıyla 0,655 $\mu$ M ve 4,21 $\times$ 10<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlardan yola çıkarak enzimin kimotripsin benzeri serin proteaz olduğu düşünülmüştür [72].

Kumar 2001 yılında Hindistan'dan toplanan toprak numunelerinden alkalofilik *Bacillus pumilus* MK6-5'i izole ederek bu mikroorganizmadan proteaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi ile üç basamakta saflaştırmıştır. Saflaştırılan enzimin SDS-PAGE ile molekül kütlesi 28 kDa olarak elde edilmiştir. Enzimin en aktif olduğu pH 11,5; optimum sıcaklığı ise 55-60 °C'dir. Saflaştırılan enzim 30 dakika boyunca 30 °C'den 60 °C'ye kadar aktivitesinin tamamını korurken 70 °C'de ise %65 ini koruyabildiği gözlenmiştir. Sentetik substrat ile 37 °C de ve pH 8 de gözlenen  $K_m$  ve  $k_{cat}$  değerleri; Glu-Gly-Ala-Phe-pNA için 1,1 mmol/l ve 624 s<sup>-1</sup>, Glu-Ala-Ala-Ala-pNA için 3,7 mmol/l ve 826 s<sup>-1</sup> olarak elde edilmiştir. PMSF inhibitörüyle enzimin tamamen inhibe olduğu ve Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> ile Mn<sup>2+</sup> ile de aktivitesi arttığı görülmüştür. Enzimin yüksek pH, termostabilite ve şelatlayıcı ajanlara karşı direncinin olması, ultrafiltrasyon membran temizleme ve farklı biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilceği sonucuna ulaştırmıştır [73].

Sundararajan ve arkadaşları 2011 yılında toprak numunesinden izole ettikleri bakteriyi 16SrRNA gen dizisiyle *Bacillus cereus* VITSN04 olarak tanımlamışlardır. *Bacillus cereus* VITSN04 uygun ortamda çoğalttıktan sonra Sephadex G-50 ve Saphadex G-200 kolonlarını kullanarak jel filtrasyon kromatografisiyle saflaştırmışlardır. Native-PAGE yöntemi ile enzimin molekül kütlesi 32 kDa olarak elde edilmiştir. Saflaştırılan enzimin optimum sıcaklığı 30 °C'de ve optimum pH'ı 8'de gözlenmiştir. Enzimin PMSF inhibitörü tarafından inhibe olmasıyla serin proteaz sınıfında olduğu saptanmıştır. Deri işleme sürecinde enzim muamelesi yapılmış ve atık kirlilik yükünün % 25'inin azaldığı tespit edilmiştir. Bu nedenle bu enzimin deri işleme sürecinde kullanılabilceği yorumu yapılmıştır [74].

Singh ve arkadaşları (2001), *Bacillus sp.* SSR1'den hücre dışı serin alkalın proteazı Sefadex A-50 ve Sefaroz 6B kolon kromatografisi ile homojen olarak saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin moleköl kütlesi SDS-PAGE ile 29 kDa ve Native PAGE ile 35 kDa olarak tespit edilmiştir. Enzim alkalın pH (8 –11) aralıklarında kararlılığını koruduğu, ayrıca optimum sıcaklığı olan 40 °C'de 300 dakikalık inkübasyon süresi sonunda bile aktivitesini tamamen koruduğunu bildirmişlerdir. CaCl<sub>2</sub> varlığında enzimin optimum sıcaklığı 45 °C olarak gözlendiği ve aktivitesinde 1,3 kat artış olduğunu ifade etmişlerdir. Bunun yanı sıra enzimin Fe<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup> ve Na<sup>+</sup> metal iyonlarıyla aktivitesinin arttığını ve çeşitli deterjanlarda aktivitesini ve kararlılığını koruduğunu ve bildirmişlerdir [29].

### **3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR**

#### **3.1. Laboratuvar Ekipmanları**

- Soğutmalı santrifüj (Sigma 3-30K)
- Otoklav (Alp)
- pH metre (Hanna pH300)
- Spektrofotometre (Optizen)
- Çalkalamalı su banyosu (Nüve)
- Hassas terazi ( Denver Instrument)
- Manyetik karıştırıcı ( Chiltern HS31)
- Vorteks (Fisons)
- Kromatografi kolonu (Pharmacia Biopilot FPLC)
- Otomatik pipetler (Ependorf)
- Buzdolabı (Vestel)

#### **3.2. Kullanılan Kimyasallar**

Deneysel çalışmalar boyunca kullanılan kimyasallar MERCK (Darmstadt, Almanya), Sigma Chemical Ltd. (ABD), Bacto (Avustralya), Dıfco( ABD) firmalarından temin edilmiştir.

#### **3.3. Kullanılan Mikroorganizma**

Çalışmada kullanılan topraktan izole edilmiş *Bacillus subtilis* (RSKK-11014) Refik Saydam Hıfzısıhha Biyolojik Ürünler Araştırma-Geliştirme Laboratuvarları'ndan temin edilmiştir.

#### **3.4. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)' ün Çoğaltılması ve Proteaz Üretimi**

Alkalin proteaz üretimi için topraktan izole edilmiş *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)

saf suş örneği 121 °C de 1,5 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilmiş olan Nutrient Broth çözeltisinde 37 °C sıcaklıkta 24 saat bekletilerek çoğalması sağlanmıştır.

Kültür ortamı için %1,25 glukoz, %1 pepton, % 0,5 maya ekstraktı bileşimi içeren besiyer 1 litre saf su ile hazırlanmıştır. 500 mL 'lik erlenlere 100 er mL kültür konularak ortamdaki bileşenler 121° C de 1,5 atmosfer basınç altında 15 dakika süreyle steril edilmiştir. Besiyerlere 1 ml aşı kültürü ekimi yapıldıktan sonra 37 °C de 140 rpm' de 24 saat inkübe edilmiştir. Fermentasyon sonrasında hücre izolatları 11000 rpm' de 20 dakika +4 °C' de santrifüjlenerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra ham ekstraktın aktivitesine Bölüm 3.5.4'te anlatılan yöntemle göre, protein miktarına ise Bölüm 3.5.6' da anlatılan Bradford metoduna göre bakılmıştır.

### **3.5. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den Alkali Proteaz Enziminin Saflaştırılması**

#### **3.5.1. Amonyum sülfatla çöktürme**

Homojenata %85 konsantrasyona ulaşıncaya kadar magnetik karıştırıcı üzerinde, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edilerek yavaş yavaş sıvının üstünde köpük oluşmamasına özen göstererek karıştırıldı. Çözündükten sonra +4° C' de 1 gece bekletildi.

Bekletilen sıvı, 15000 rpm de +4 °C' de 15 dakika santrifüjlendi ve dipteki çökelti 50 mM pH 9,5 glisin-NaOH tamponuyla olabildiğince düşük hacimde çözüldü. Elde edilen çözelti por çapı 14000 Da olan diyaliz torbalarına konulup, bu torba pH 9,5 glisin-NaOH tamponu içerisinde +4 derecede bir gece diyalize bırakıldı. Daha sonra elde edilen çözeltinin Bölüm 3.5.4 'te anlatılan yöntemle göre enzim aktivitesine ve Bölüm 3.5.6'da anlatılan yöntemle göre protein miktarına bakıldı.

#### **3.5.2. DEAE selüloz anyon değişim kromatografisi**

1,6×20 cm'lik DEAE (diethylaminoetil) selüloz anyon değiştirici kolonu hacminin yaklaşık 5 katı kadar pH 9,5 glisin-NaOH tamponuyla dengelendi. Diyaliz sonrası elde edilen örnek, önceden tampon ile dengelenen DEAE anyon değiştirici kolona

yüklendi. Örnek, 3 ml/dak akış hızıyla kolondan ayrılarak, 90 saniye aralıklarla 3 ml'lik fraksiyonlar halinde toplanmıştır. Daha sonra 1 M NaCl ile lineer gradient uygulanmıştır. Elde edilen fraksiyonlar 280 ve 260 nm'de tek tek değerlendirilmiştir. Ayrıca Bölüm 3.5.4'te anlatılan yöntemle göre enzim aktivite testine bakıldı. Enzim aktivitesi yüksek olan fraksiyonlar toplanıp karakterizasyon çalışmaları için kullanılmıştır [75].

### 3.5.3. Afinite kromatografisi

#### Afinite kromatografisi için kolon dolgu maddesinin hazırlanması ve ligandın bağlanması

Afinite kromatografisinde kolon dolgu maddesinin hazırlanması için 1 gram CNBr ile aktive edilmiş halde olan Sefaroz 4B kolon dolgu maddesi 5 ml 0,5 M NaCl içeren 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,3) tamponunda çözülmüştür. Elde edilen karışım bir huniye aktarılmış ve ligand olan basitrasin (1 g kolon dolgu maddesi için 150 mg ligand kullanılmıştır) ilave edilmiştir [76]. Daha sonra 1mM'lık HCl ile bir falkon tüpüne alınıp oda sıcaklığında magnetik karıştırıcı olmamasına özen gösterilerek 1saat yavaşça karıştırılmıştır. Karışımın oluşan hacminin 5 katı kadar 0,5 M NaCl içeren 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,3) tamponuyla yıkanmıştır. Kalan aktif uçları bloklamak amacıyla karışım 2 saat pH 8'de 0,1 M Tris- HCl tamponu içinde bekletilmiştir. Sonraki aşamada kolon 0,5 M NaCl içeren 0,1 M asetat tamponuyla (pH:4) yıkanmış ardından 0,5 M NaCl içeren pH 8'de 0,1 M Tris-HCl tamponundan geçirilmiştir.

#### Bacillus subtilis (RSKK-11014)'den saflastırılan proteaz enziminin CNBr ile aktive edilmiş Sefaroz 4B- basitrasin afinite kolonuna yüklenmesi

Kolonla aynı şartlara getirmek için, örnek 1:1 oranında (v:v) 4,5 M NaCl içeren 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponuyla karıştırılarak bu tamponla önceden dengelenmiş CNBr ile aktive edilmiş olan Sefaroz 4B-basitrasin afinite kolonuna yüklenmiştir. 5

M NaCl içeren 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponu kolon hacminin 20 katı kadar eklenerek kolona bağlanmayan maddeler elue edilmiştir. Kolona bağlanan proteaz enzimi ise 3,75 M NaCl ve %15 etanol içeren 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponundan kolon haciminin 6 katı kadar eklenmesiyle elue edilmiştir. Toplanan fraksiyonların aktivitesi Bölüm 3.5.4'teki yönteme göre ve protein içeriği ise Warburg-Christian metoduyla (280-260 nm'de) belirlenmiştir. Warburg-Christian metodu ile belirlenen verilere göre afinite kromatografisinde verim ve saflaştırma katsayısı için gerekli olan protein miktarı hesaplanmıştır.

#### 3.5.4. Proteaz aktivite tayini

Takami ve arkadaşlarının (1989), belirlediği yönteme göre enzim aktivite tayini yapılmıştır. 500 µl enzim çözeltisi üzerine 2500 µl % 0,6(m/v) lık pH 9,5 kazein çözeltisi eklenerek 40° C lik su banyosunda 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre bitiminde kazeini çöktürmek için 2500 µl TCA (0,11 M trikloroasetik asit, 0,22 M sodyum asetat ve 0,33 M asetik asit) çözeltisi ilave edilerek reaksiyon durduruldu. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra çözelti süzgeç kağıdından süzülerek süzüntüden 500 µl alındı. Üzerine 2500 µl 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve %50 (v/v) 500 µl Folin-Ciocalteu çözeltisi eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra 660 nm'de absorbansı köre karşı okundu [77]. Daha önceden oluşturulmuş tirozin grafiğinin eğimi yardımıyla enzim aktivitesi aşağıdaki formül ile belirlenmiştir:

$$\text{Enzim Aktivitesi} = \frac{(A_{660}/\text{Eğim}) \times \text{Toplam hacim(ml)}}{\text{Enzim hacmi(ml)} \times \text{İnkübasyon süresi(dak)}} \times \text{Seyreltme faktörü(U/ml)}$$

#### 3.5.5. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması

Proteaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla standart bir grafik hazırlanması için 50 mM pH 9,5 glisin-NaOH tamponu ile 1µg/ml tirozin çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti 0, 10, 20, 30, 40 ve 50 µl hacimlerinde ayrı tüplere konulmuştur



ve üzerleri tampon ile 1 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra her bir tüpten 0,5 ml alınıp üzerine 2,5 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve %50'lik Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 30 dakika kadar bekletildikten sonra köre karşı 660 nm'de absorbansı okunmuştur [77]. (Kör olarak 0 µg/ml tirozin içeren 50 mM pH 9,5 glisin-NaOH tamponu kullanılmıştır). Okunan absorbans değerlerine göre tirozin standart grafiği hazırlanmıştır.

### 3.5.6. Protein miktarı tayini

Enzim örneğinin protein miktarı Bradford metoduna göre yapıldı [78]. Bu metoda göre 150 µl enzim örneğinden alınıp saf suyla 2400 µl'ye tamamlandı. Çözeltinin üzerine 600 µl Coomassie-blue reaktifi eklendi. 3 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 595 nm'de absorbansı okundu. Daha önceden oluşturulan protein standart grafiğinin eğimi yardımıyla protein miktarı aşağıdaki formülden tespit edilmiştir [79].

$$\text{Protein miktarı (mg/ml)} = \frac{(A_{595}/\text{Eğim}) \times \text{Seyreltme faktörü}}{1000}$$

Kromatografi işlemleri sonunda kolondan alınan elüsyonların protein miktarı ise Warburg&Christian yöntemine göre belirlendi. Bu yöntem proteinlerin yapısında bulunan fenilalanin, triptofan, tirozinin 280 nm'de maksimum absorbans göstermesinden yararlanılarak, örneğin 260 ve 280 nm'de ölçülmesi esasına dayanır [80]. Absorbanslar düzeltme katsayılarıyla çarpılıp formüldeki gibi birbirinden çıkarılır:

$$\text{Protein miktarı: } 1,5 \times A_{280} - 0,75 \times A_{260} \quad (\text{mg/ml})$$

### 3.5.7. Protein standart grafiğinin hazırlanması

Protein miktarının belirlenmesi amacıyla standart grafiğinin hazırlanması için 0,2 mg/ml sığır serum albümin (BSA) çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden ayrı tüplere sırasıyla 0, 15, 30, 60, 120 µl alınarak saf suyla 2400 µl'ye tamamlanmıştır. Tüpteki karışımlara 600 µl Coomassie-blue reaktifi ilave edilerek 3 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda 595 nm'de absorbansları okundu. Okunan absorbans değerleri yardımıyla protein standart grafiği çizildi [79].

### 3.6. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)' ten Saflaştırılan Proteaz Enziminin Karakterizasyonu

#### 3.6.1. Proteaz enziminin molekül kütlelerinin Doğal (Native)-PAGE yöntemiyle belirlenmesi

Doğal (Native) poliakrilamid jel elektroforezi, proteinlerin denatüre edilmeden doğal halleriyle analiz edildikleri sistemdir. Bu yöntemde polipeptitler yüksek dereceli yapıyı muhafaza eder ve genellikle enzim aktivitesinin yanı sıra diğer polipeptitlerle olan ilişkisi de korunur.

Bu çalışmada Doğal (Native)-PAGE ile; CNBr ile aktifleştirilmiş Sefaroz 4B-basitrasın afinite ve DEAE selüloz anyon değiştirici kolon kromatografisi ile elde edilen ekstraktların içerdiği enzim saflığı araştırılmış ve molekül kütlesi belirlenmiştir. Doğal (Native)-PAGE için %4-20' lik jel kullanılmıştır. Örneklerin jelde yürümesi bitince jel çıkarılarak proteinlerin jele yapışmasını sağlayan fiksasyon işlemine tabi tutulmuştur. Fiksasyondan sonra gümüş boyama tekniği ile jelde görüntüleme sağlanmıştır. Gümüş boyama tekniği aşağıdaki gibi işleme alınmıştır:

1. Fiksasyon işlemi için 75 ml etanol + 18 ml asetik asit +75 µl formaldehit 150 ml' ye distile su ile tamamlanıp gece boyu çalkalayıcıda fikse edildi.
2. 450 ml %50"lik etanol çözeltisi ile 20 dakika süreyle 3 kere mumale edilerek

tekrarlandı.

3. 30 mg  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 150 ml suda çözünerek jel ile 1 dakika çalkalandı.
4. Distile su ile 20 şer saniye olmak üzere 2 kez yıkandı.
5. 300 mg  $\text{AgNO}_3$  + 112,5  $\mu\text{l}$  formaldehit +150 ml distile su ile 20 dakika muamele edildi.
6. Tekrardan distile su ile 20 şer saniye olmak üzere 2 kez yıkandı.
7. 9g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + tek kristal  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  +75  $\mu\text{l}$  formaldehit 150 ml'ye distile su ile tamamlanarak bantlar görülene dek çalkalandı.
8. Distile su ile 20 şer dakika olmak üzere 2 kez yıkandı.
9. Son olarak 75 ml metanol + 18 ml asetik asit 150 ml"ye distile su ile tamamlanarak 10 dakika muamele edildi.

### **3.6.2. Proteaz enziminin optimum sıcaklığının ve sıcaklık kararlılığının belirlenmesi**

*Bacillus subtilis* (RSKK-11014)' ten saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklık tayini için 500  $\mu\text{l}$  seyreltik enzim çözeltisi üzerine 50 mM pH 9,5 glisin-NaOH tamponunda hazırlanan %0,6 (m/v) 2500  $\mu\text{l}$  kazein çözeltisi eklendi. Karışım 20, 30, 40, 50, 60, 70 °C sıcaklıklarının herbirinde su banyosunda 30 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Her birinin Bölüm 3.4.5' te anlatılan yöntemle göre aktivite testine bakıldı. Enzimin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen grafiğe göre en yüksek aktivitenin gözlemlendiği sıcaklık 100 kabul edilip diğer değerlerde buna göre konumlandırıldı [81].

Enzimin sıcaklık kararlılığını belirlemek için ise, 50  $\mu\text{l}$  enzim çözeltisi 950  $\mu\text{l}$  50 mM pH 9,5 glisin-NaOH tamponuyla seyreltildi. 40°C de 180 dakika inkübasyona bırakıldı ve her yarım saatte bir aktivite testi yapıldı. 50°C de 90 dakika inkübasyona bırakılıp her 15 dakikada bir aktivite testi yapıldı. 60 °C de 30 dakika inkübasyona bırakıldı ve her 5 dakikada bir aktivite testine bakıldı. Son olarak 70°C de ise 10 dakika inkübasyona bırakılıp her 1 dakikada bir aktivite tayini yapıldı. Sıcaklık kararlılığının grafik çiziminde inkübasyondan önceki aktivite 100 kabul edilip

inkübasyon sonraki değerler kalan aktivite yüzdesi olarak belirlenmiştir [60].

### 3.6.3. Proteaz enziminin optimum pH değerinin ve pH kararlılığının belirlenmesi

*Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'ten saflaştırılan proteazın optimum pH'nın belirlenmesi için pH 4 ile 12 arasında tamponlar hazırlandı. Çizelge 3.6'da kullanılan tamponlar verilmiştir.

Çizelge 3.6. Enzimin optimum pH ve pH kararlılığının belirlenmesinde kullanılan tamponlar

pH	tampon
4 ve 5	Sodyum asetat
6 ve 7	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - KHPO <sub>4</sub>
8	Tris-HCl
9; 9,5; 10; 11; 12	glisin-NaOH

Çizelge 3.6'da verilen tamponların 2500 µl si ile hazırlanan % 0,6'lık kazein çözeltisi ve enzim çözeltisinin 500 µl'si 38°C' de yarım saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası Bölüm 3.5.4' te anlatılan yönteme göre aktivitelerine bakıldı. Enzimin optimum pH profilini belirlemek için en yüksek aktivitenin gözlemlendiği pH değeri 100 olarak kabul edilerek diğer değerler buna göre konumlandırıldı [81].

Saflaştırılan proteaz enzimin pH kararlılığını belirlemek için ise 100 µl enzim çözeltisi ile Çizelge 3.6' da ki gibi pH 6-12 arasında hazırlanan tamponların 400 µl si ile karıştırılarak 38 °C' de 1 saat inkübe edildikten sonra Bölüm 3.5.4' te anlatıldığı gibi inkübasyon öncesinde ve sonrasında aktivite testi yapıldı. pH kararlılık grafiğinin çiziminde enzimin farklı pH' lardaki inkübasyon öncesi aktivite değeri 100 kabul edilip inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi olarak

ifade edilmiştir.

#### **3.6.4. Proteaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi**

*Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin bazı metal iyonlarının varlığında aktivitesindeki durumunu incelemek için  $Ca^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $K^+$  iyonları ile deneme yapıldı. Bu amaçla bu iyonların klorürlü tuzları kullanıldı. Bu metallerin 50 mM pH 9,5 glisin-NaOH tamponu ile 2 ve 5 mM'lık çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra 50 µl enzim çözeltisi ile 450 µl pH 9,5 50 mM glisin-NaOH tamponuyla hazırlanan metal iyonlarının çözeltisi karıştırılmıştır. Kör olarak ise 50 µl enzim çözeltisi ile 450 µl 50 mM pH 9,5 glisin-NaOH tamponu karıştırılmış ve ortama herhangi bir metal iyonu eklenmemiştir. Çözeltiler 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra Bölüm 3.5.4'te verilen yönteme göre aktivite tayini yapılmıştır. Metal iyonlarının saflaştırılan proteaz üzerine etkisini göstermek için hazırlanan grafikte kör olarak hazırlanan örneğin aktivitesi 100 olarak kabul edilerek inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi olarak ifade edilmiştir [82].

#### **3.6.5. Proteaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisinin belirlenmesi**

Çalışmada saflaştırılan proteaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisini incelemek için benzen, toluen, ksilen, metanol, etanol, n-bütanol, aseton, DMSO çözücülerinin 1 ml'si ile 50 mM pH 9,5 glisin-NaOH tamponunun 3 ml'si karıştırıldı. 50 µl enzim çözeltisinin üzerine 450 µl organik çözücü ile oluşturulan tampon çözeltiler eklendi. 38 °C'de yarım saat inkübasyona bırakıldı. Kör olarak 50 µl enzim çözeltisi üzerine 450 µl 50 mM glisin-NaOH tamponun bulunduğu çözelti kullanılarak aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. Daha sonra Bölüm 3.5.4'te anlatılan yönteme göre aktivitelerine bakıldı. İnkübasyondan sonra kör olarak hazırlanan örneğin aktivitesi 100 olarak kabul edilerek inkübasyon sonrasındaki değerler kalan aktivite olarak ifade edildi [81].

### **3.6.6. Proteaz enziminin doğal substratlara karşı özgünlüğünün belirlenmesi**

Saflaştırılan proteaz enziminin bazı substratlara karşı aktivitesini belirlemek amacı ile albumin, keratin, jelatin, soya fasulyesi unu ve kazeinden oluşan protein substratları kullanılmıştır. Substratların %0,6'lık çözeltileri 50 mM pH 9,5 50 mM glisin-NaOH tampon çözeltisinde çözülerek hazırlanmıştır. 50 µl enzim çözeltisi hazırlanan substrat çözeltilerinin 450 µl ile karıştırılmış ve 38 °C'de 30 dakika inkube edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 9,5 glisin-NaOH tampon çözeltisi ilave edilen reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Bölüm 3.5.4'te verilen yöntemle göre aktivitelere bakılmıştır. Kazein substratını bulduran enzim çözeltisinin aktivitesi 100 kabul edilmiştir ve diğer aktivite değerleri bu aktivite değerine oranlanarak % bağıl aktivite olarak verilmiştir [81].

### **3.6.7. Bazı deterjan yüzey aktif maddelerin ve yükseltgenlerin proteaz enzime etkisinin belirlenmesi**

Saflaştırılan proteaz enzime yüzey aktif maddelerin etkisini incelemek için %1'lik SDS (m/v), %1'lik Tripton X-100 (v/v), yükseltgenlerin etkisini incelemek için ise %2 ve %5'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) kullanıldı. Yüzey aktif maddelerin ve yükseltgenlerin verilen yüzdeleri 50 mM pH 9,5 glisin-NaOH tamponuyla hazırlandıktan sonra 50 µl enzim çözeltisi ile 450 µl hazırlanan çözeltilerin karışımı 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Kör olarak 50 µl enzim çözeltisi ile 450 µl 50 mM pH 9,5 glisin-NaOH tamponu karıştırılarak aynı koşullar altında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası Bölüm 3.5.4' te verilen yöntemle göre aktivite testi yapıldı. Kör olarak hazırlanan örneğin aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite olarak ifade edilmiştir.

### **3.6.8. Proteaz enzimi üzerine amino asit inhibitörlerinin etkisinin incelenmesi**

Proteaz enziminin aminoasit inhibitörlerine karşı etkisini incelemek için 2-merkaptetanol ile 2 mM ve 5 mM'lık konsantrasyonlardaki PMSF, EDTA, DTT çözeltileri kullanılmıştır. 2-merkaptetanol, EDTA, DTT çözeltileri pH 9,5 50 mM

glisin-NaOH tamponuyla hazırlanırken, PMSF çözeltisi %96'lık etanolde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu enzim çözeltilerinin 40 µl' si ile enzim çözeltisinin 10 µl' si karıştırılmış ve 40 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Kör olarak ortama herhangi bir inhibitör eklenmemiş olan 10 µl enzim çözeltisi ile 40 µl pH 9,5 glisin-NaOH tamponu karıştırılmıştır. İnkübasyon sonrasında Bölüm 3.5.4 'de anlatılan yöntemle göre aktivite tayini yapılmıştır. Kör olarak hazırlanan örneğin aktivitesi 100 kabul edilerek hesaplanan diğer örneklerin aktiviteleri kalan aktivite olarak değerlendirilmiştir.

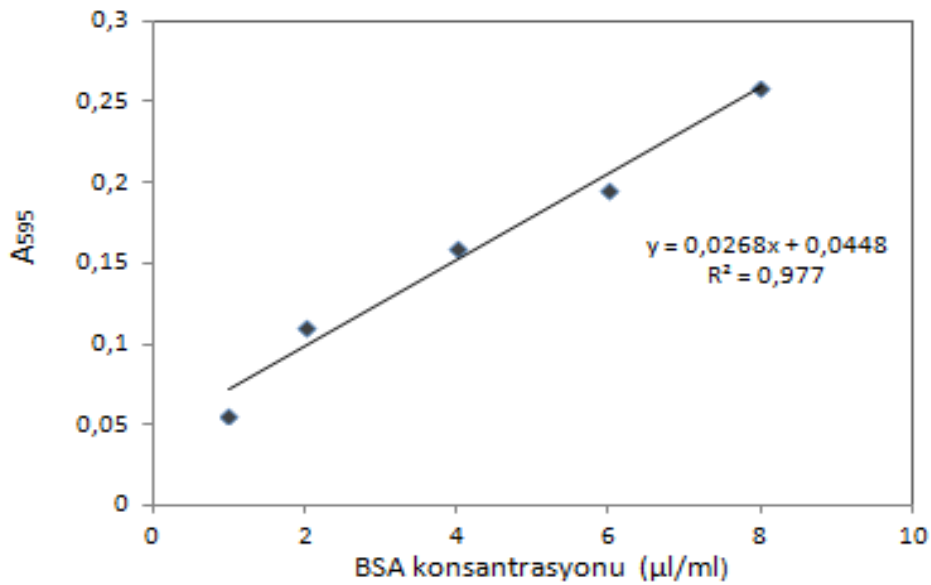
### **3.6.9. Proteaz enziminin Michealis-Menten kinetik parametrelerinin belirlenmesi**

*Bacillus subtilis* (RSKK-11014)' ten saflaştırılan proteaz enziminin Michealis-Menten kinetik parametreleri ( $V_{max}$  ve  $K_m$ ) belirlemek amacıyla substrat olarak kullanılan kazein, pH 9,5' da 50 mM glisin-NaOH tamponu ile 0,2–2 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlandı. 38°C' de 30 dakika inkübe edildikten sonra Bölüm 3.5.4' te anlatıldığı gibi aktivite tayini yapıldı. Daha sonra başlangıç substrat konsantrasyonları değerlerine ( $1/S$ ) karşı başlangıç değerleri ( $1/V$ ) işaretlenerek Lineweaver-Burk grafiği oluşturulmuştur ve elde edilen lineer doğrunun eğiminden ve y eksenini kesim noktasından enzimin  $K_m$ ,  $V_{max}$  değerleri hesaplanmıştır [83].

## 4.BULGULAR

### 4.1. Protein Standart Grafiğinin Belirlenmesi

Protein tayini BSA (sığır serum albumin)'nin standart olarak kullanıldığı Bradford yöntemiyle yapıldı. Tayine ait oluşturulan standart eğri, Şekil 4.1'de verilmiştir.

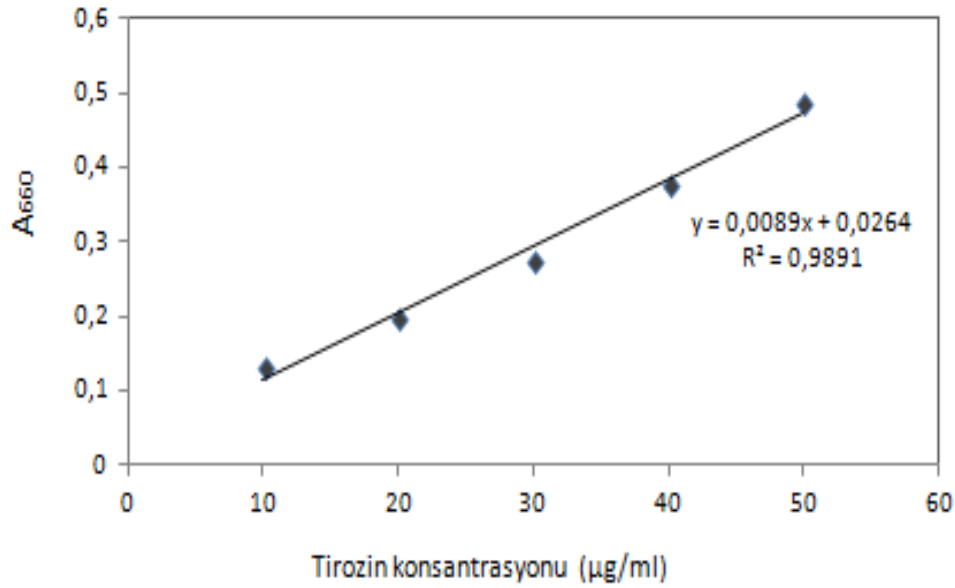


Şekil 4.1. Protein tayininde kullanılan standart grafik

### 4.2. Tirozin Standart Grafiğinin Belirlenmesi

Alkalın proteaz aktivitesi hesaplamasında Takami ve arkadaşlarının belirttiği yöntemle göre [77], bir ünite proteaz enzimi, aynı şartlar altında dakikada 1 µg tirozin açığa çıkartan enzim miktarı olarak esas alınmış ve yapılan deney sonucu okunan absorbanslar yardımıyla Şekil 4.2'deki gibi tirozin standart grafiği oluşturulmuştur.





Şekil 4.2. Tirozin standart grafiği

### 4.3. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den Proteaz Enziminin Üretimi

*Bacillus subtilis* (RSSK-11014)' den maksimum proteaz eldesi % 1,25 glukoz, %1 pepton, % 0,5 maya ekstraktı içeren besiyerinden elde edilmiştir. *Bacillus subtilis* (RSSK-11014) bu besiyerinde 37 °C sıcaklıkta 140 rpm de 24 saat çoğalmaya bırakılmıştır.

### 4.4. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den Proteaz Enziminin Saflaştırılması

#### Sonuçları

#### 4.4.1. Amonyum sülfat çöktürmesi

Proteaz enzimi saflaştırılması ilk olarak amonyum sülfat çöktürmesi ile gerçekleştirildi. Belirlenen %85 lik konsantrasyonunda amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve çökelekler pH 9,5 glisin-NaOH tamponunda çözülüp gece boyu aynı tampona karşı +4 °C'de diyalizlendi. Diyalizlenen örneğe Bölüm 3.5.4'te anlatıldığı gibi proteaz aktivitesi testi uygulandı. Saflaştırma adımlarına ait sonuçlar Çizelge

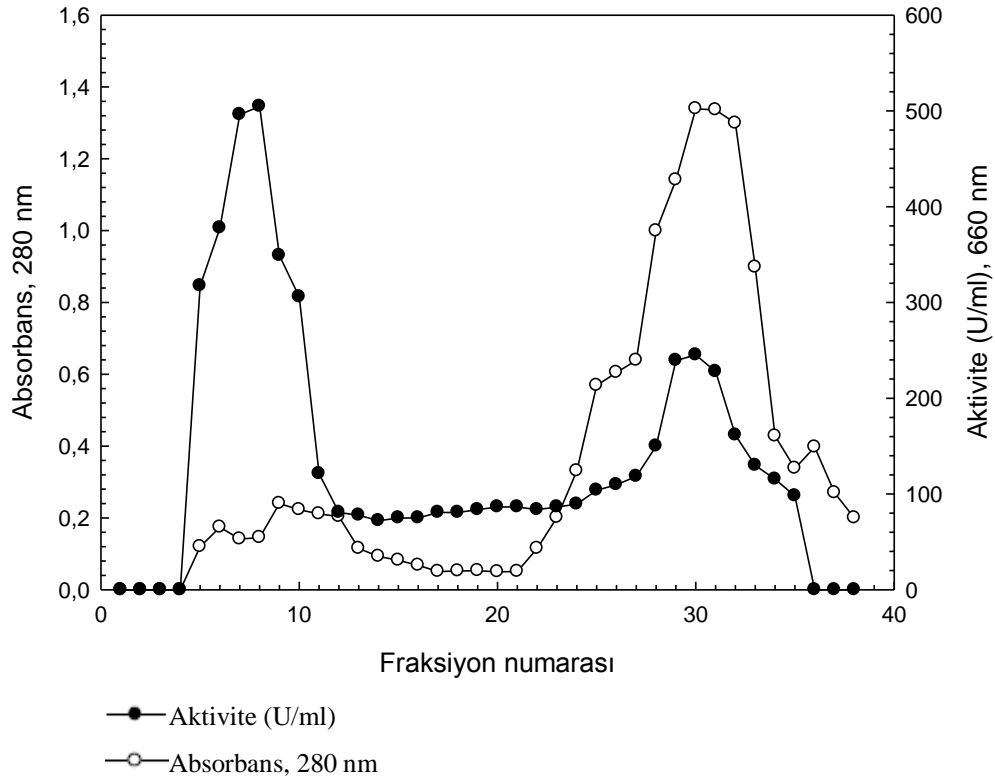
4.1'de verilmiştir. Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi ham ekstrakt, amonyum sülfat çöktürmesi sonucu %23,36 verimle 3,14 kat saflaştırılmış oldu.

#### **4.4.2. DEAE selüloz anyon değişim kromatografisi sonuçları**

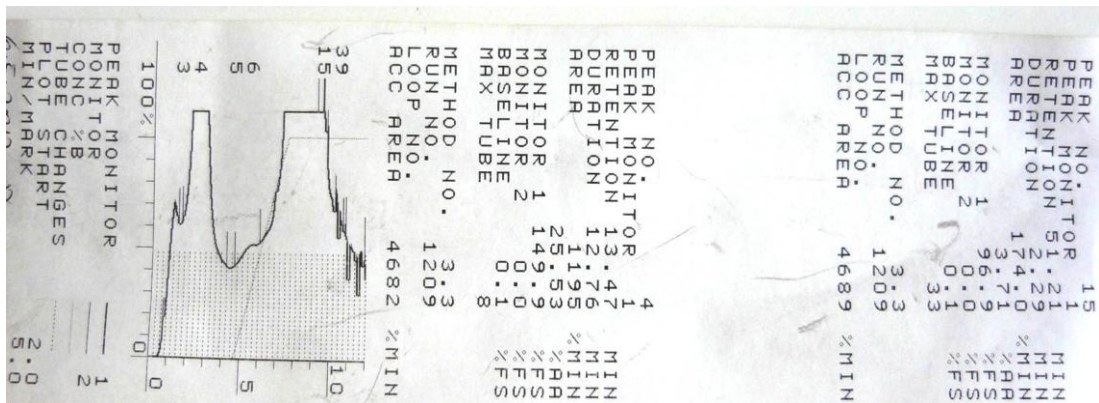
pH 9,5 glisin-NaOH tamponunda diyalizlenen örnek DEAE selüloz anyon değiştirici kolona verildi. Örnek kolondan 3 ml/dak akış hızıyla ayrılarak 90 saniye aralıklarla 3 ml olarak toplandı. [78]. Her bir fraksiyonun protein miktarı 280 ve 260 nm' de yapılan ölçümlerle belirlendi. Aktiviteleri ise Bölüm 3.5.4' te anlatıldığı gibi tayin edilerek en yüksek aktivitenin görüldüğü fraksiyonlar toplandı. DEAE selüloz iyon değişim kromatografisine ait aktivite grafiği Şekil 4.3'te, kromatogram ise Şekil 4.4'te verilmiştir. Saflaştırma adımlarına ait sonuçlar ise Çizelge 4.1'de yer almaktadır.

Çizelge 4.1. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014) kaynaklı proteazın saflaştırılma basamakları sonuçları

Saflaştırma Basamakları	Toplam hacim (ml)	Toplam aktivite (U)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
<b>Ham ekstrakt</b>	780	210100,8	558,81	375,98	100	1
<b>%85 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesi ve diyaliz</b>	24	49072,32	41,55	1180,98	23,36	3,14
<b>DEAE selüloz anyon değiştirici kolon</b>	8	11881,67	3,03	3921,34	5,66	10,42
<b>CNBr Aktifleştirilmiş Sefaroz 4B-Basitrasin Afinite Kromatografisi</b>	10	15111,64	2,85	5291,38	7,19	14,07



Şekil 4.3. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den DEAE selüloz anyon değişim kromatografisiyle saflaştırılan proteaz enziminin aktivite-absorbans grafiği

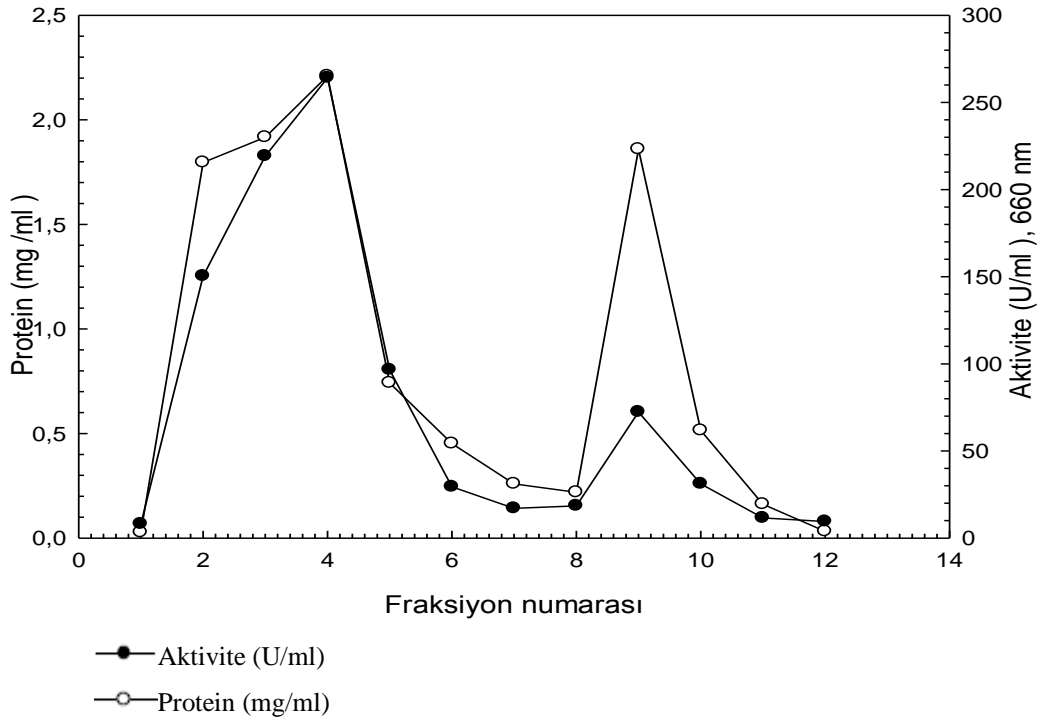


Şekil 4.4. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin DEAE selüloz anyon değiştirme kromatogramı

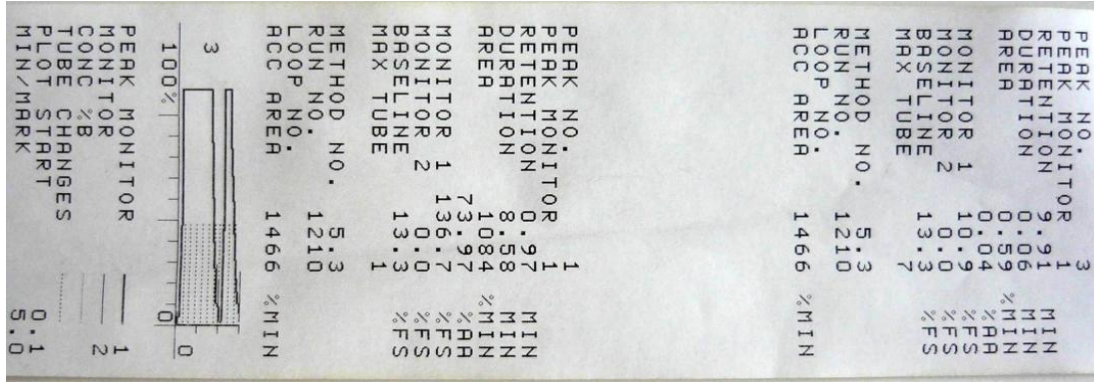
Saflaştırma sonucunda enzim 10,42 kat %5,66 verimle elde edildi. Saflaştırılan enzimin toplam aktivitesi 11881,67 U, spesifik aktivitesi ise 3921,34 U/mg olarak belirlendi.

#### 4.4.3. Afinite kromatografisi sonuçları

Amonyum sülfat çöktürmesi ve pH 9,5 glisin-NaOH tamponunda diyalizlenen örneğe ikinci bir saflaştırma yöntemi olan afinite kromatografisi uygulanmış ve örnek afinite kolonuna verilmiştir. Elde edilen fraksiyonlara Bölüm 3.5.4' te anlatılan yöntemle göre aktivite tayini yapılmıştır ve protein miktarları Warburg-Christian metoduyla belirlenmiştir. Saflaştırma sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Afinite kromatogramı Şekil 4.6' da, protein-aktivite grafiği ise Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin Sefaroz-basitrasin afinite kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonlarının protein miktarları ve aktiviteleri



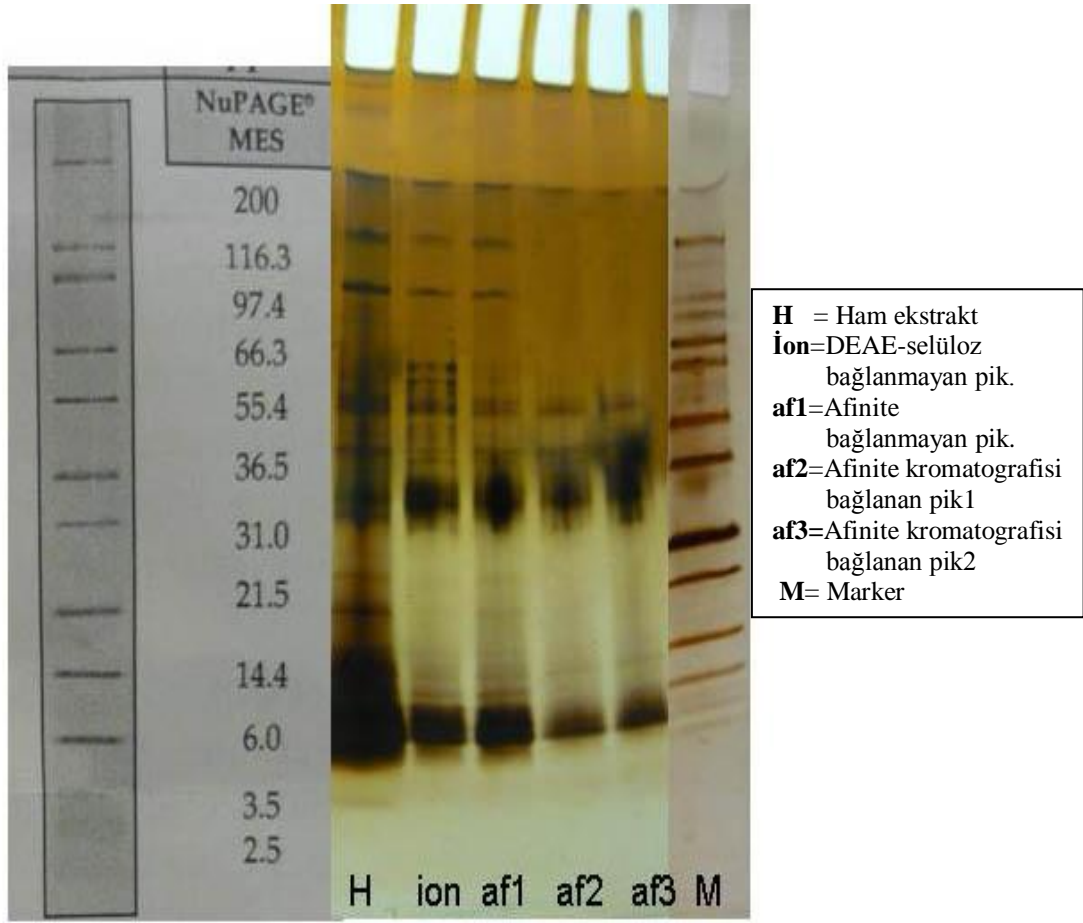
Şekil 4.6. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin Sefaroz-basitrasin afinite kromatogramı

Kromatogramda görülen 1. pik bağlanmadan gelen piktir. Uygulanan ham ekstrakt kolon kapasitesinden fazla olduğu için 1 numaralı pikte de aktivite gözlenmiştir. Halbuki 2 numaralı pik iki fraksiyon olup özellikle ikinci fraksiyonda aktivite yüksekliği elektroforez görüntüsü ile uyumludur. 2. pik saf olarak görülmektedir. Afinite kromatografisi ile enzim %7,19 verimle 14,07 kat saflaştırılmıştır.

#### 4.5. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den Saflaştırılan Proteaz Enziminin Karakterizasyonu

##### 4.5.1. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin Doğal (Native)-PAGE ile molekül kütesinin belirlenmesi

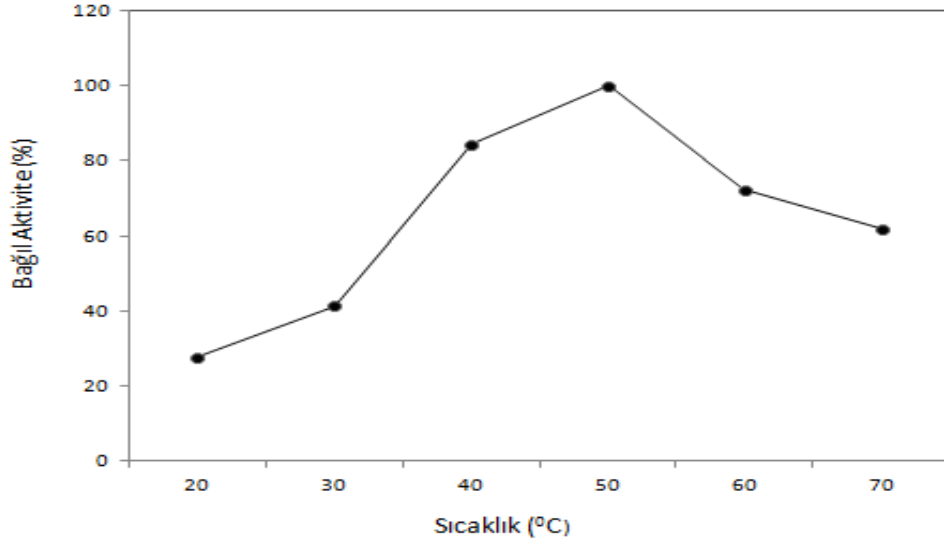
*Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den DEAE anyon değiştirme kromatografisi ve CNBr ile aktifleştirilmiş Sefaroz 4B-basitrasin afinite kromatografisi ile saflaştırılan proteaz enziminin molekül kütesi %4-20'lik Doğal(Native)-PAGE ile görüntülenmiştir. Resim 4.1'de görüldüğü gibi bandlardan yaklaşık 36 kDa' na karşılık gelen band; anyon değişimi ve afinite kromatografilerden elde edilen örneklerde yapılan aktivite çalışmalarında kendini göstermiştir. Özellikle af3'te bulunan band çok anlamlıdır. Aktivite yönünden af2 ile yapılan kıyaslamada daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmektedir.



Resim 4.1. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin Doğal (Native)-PAGE görüntüsü

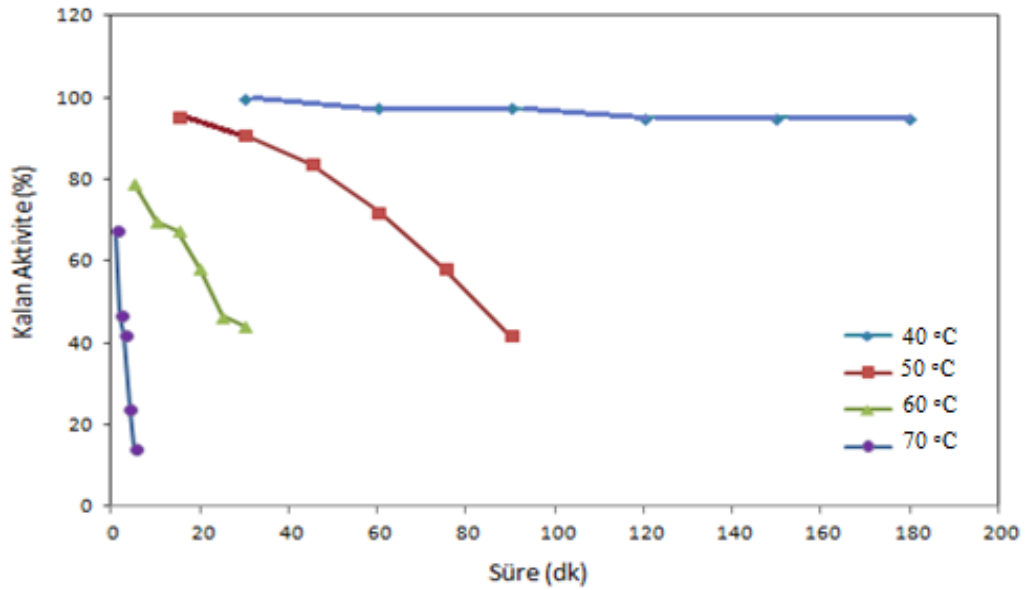
#### 4.5.2. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık profili ve kararlılığı

*Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi amacıyla 20 ile 70 °C arasındaki sıcaklık tayinleri incelendi. Her bir sıcaklık değeri için Bölüm 3.5.4'te anlatılan yöntemle göre aktivite testine bakıldı. Maksimum aktivitenin 50°C' de olduğu gözlemlendi ve optimum sıcaklık 50°C olarak belirlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık profili

Enzimin sıcaklık kararlılığı ise Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Proteazın 40 °C'de kararlılığını 3 saat boyunca büyük oranda koruduğu görülmüştür. Ancak 50 °C'de ve özellikle 60 ve 70 °C'de enzimin sıcaklık kararlılığında ciddi oranda azalma olduğu görülmektedir.

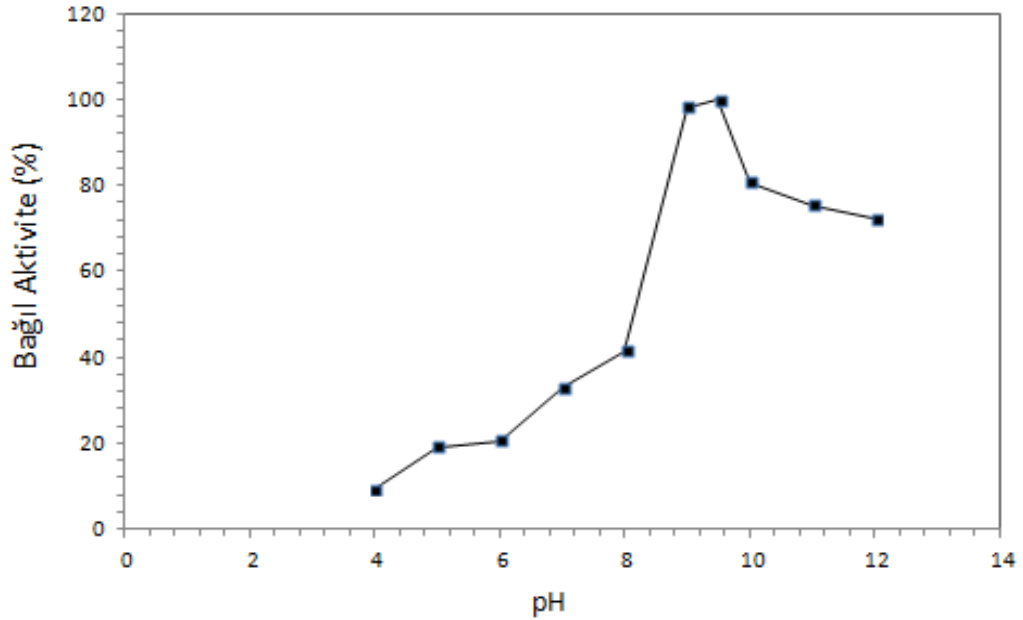


Şekil 4.8. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin 40-70°C arasındaki sıcaklık kararlılığı



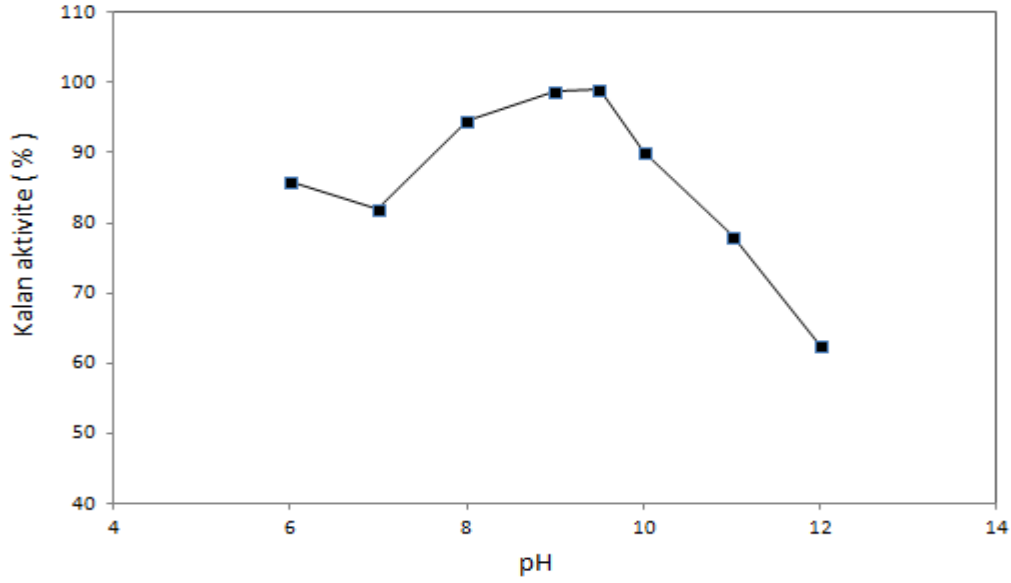
#### 4.5.3. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin pH profili ve kararlılığı

Saflaştırılan proteaz enzimine pH'ın etkisini belirlemek için pH 4'den 12'ye kadar geniş bir aralıkta Bölüm 3.5.4' te verilen yönteme göre aktivite tayini yapılmıştır. pH 4 ten 9,5' a kadar artan bir aktivite göstermiştir. 9,5' ta en yüksek aktivite elde edilmiş ve optimum pH olarak tespit edilmiştir. Sonraki pH değerlerinde ise gittikçe azalan aktiviteler elde edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin pH profili

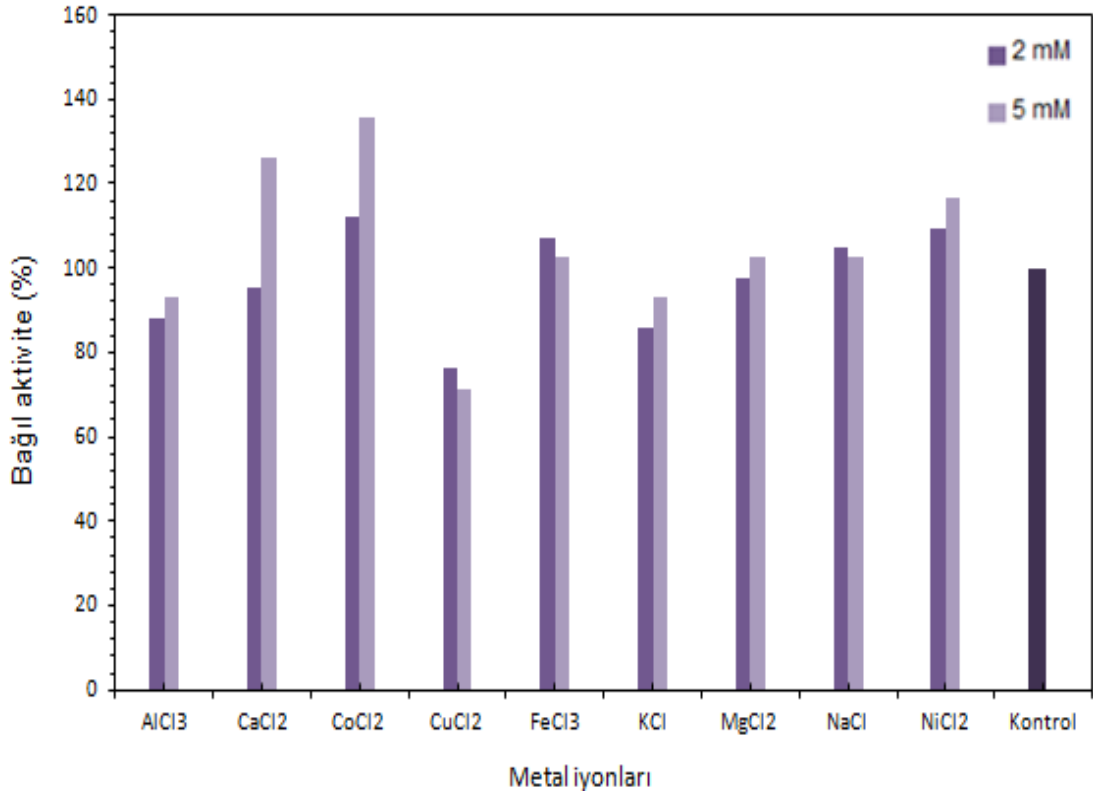
Saflaştırılan proteaz enziminin stabilitesine etkisini incelemek amacıyla proteaz enzimi pH 6-12 arasında hazırlanan tamponlarda 38 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon öncesinde ve sonrasında Bölüm 3.5.4'te anlatılan yönteme göre aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre pH 8, 9, ve 9,5'ta aktivitesinin büyük kısmını koruduğu gözlenmiştir. pH değeri arttıkça aktivitede azalma olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin pH kararlılığı

#### 4.5.4. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisi

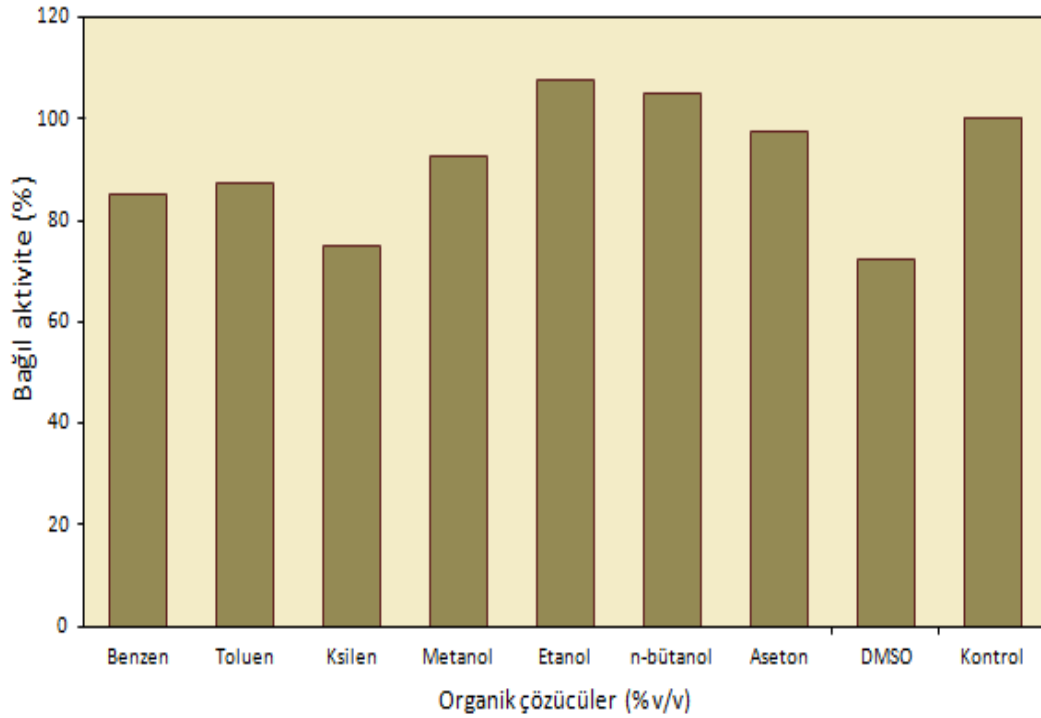
*Bacillus subtilis* (RSKK-11014)' den saflaştırılan proteaz enzime metal iyonlarının etkisini incelemek için  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  ve  $\text{K}^+$  iyonlarının klorürlü tuzları ile 2 ve 5 mM lık çözeltileri hazırlanmıştır. İçinde metal iyonu bulundurmeyen kontrol numunesinin inkübasyon sonundaki aktivitesi 100 kabul edilerek, Bölüm 3.5.4'te anlatılan yöntemle göre yapılan deney sonuçlarından Şekil 4.11' deki grafik elde edilmiştir.  $\text{CaCl}_2$ 'ün, 5 mM'lık konsantrasyonu enzimin aktivitesini yaklaşık %25 artırdığı gözlenmiştir. En yüksek aktivite yaklaşık %35 artışla  $\text{CoCl}_2$ 'ün 5mM lık konsantrasyonunda elde edilmiştir.  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{CuCl}_2$  ve  $\text{KCl}$ 'ün belli miktarlarda enzimi inhibe ettiği görülmüştür.  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{MgCl}_2$  ve  $\text{NaCl}$  ile aktivitesinin stabil kaldığı gözlenirken, 5mM lık  $\text{NiCl}_2$ ' ün aktiviteyi yaklaşık %15 artırdığı saptanmıştır.



Şekil 4.11. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enzimine bazı metal iyonlarının etkisi

#### 4.5.6. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enzimine organik çözücülerin etkisi

Saflaştırılan proteaz enzimine organik çözücülerin etkisini belirlemek için benzen, toluen, ksilen, metanol, etanol, n-bütanol, aseton ve DMSO çözeltileri kullanılmıştır. Kör olarak hazırlanan numunenin aktivitesi 100 kabul edilerek, diğer örneklerin bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır. Bölüm 3.5.4'te belirtilen yöntemle göre yapılan deney sonuçları Şekil 4.12'de verilmiştir. Enzim aktivitesini etanol yaklaşık %8, n-bütanol ise %5 oranında artıran çözeltiler olarak belirlenmiştir. Benzen ve toluen enzim aktivitesinin yaklaşık %15 ini, ksilen ve DMSO ise yaklaşık %25 ini inhibe etmiştir. Metanolde yaklaşık %7, asetonunda %2 lik aktivite kaybı olmuştur.



Şekil 4.12. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enzimine organik çözücülerin etkisi

#### 4.5.7. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara karşı kararlılığı

Saflaştırılan proteaz enziminin kazein, ovalbumin, jelatin, keratin ve soya fasulyesi unu gibi substratlar varlığında aktivitesi incelendi. En yüksek aktivitenin kazein varlığında olduğu görülmüştür ve kazeinin aktivite değeri 100 kabul edilip diğer substratların değerleri buna göre bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). ovalbumin ile aktivitesinin yaklaşık %85' ini korurken, jelatin, soya fasulyesi unu ve keratin ile sırasıyla aktivitesinin yaklaşık olarak %45, %35 ve %55 ini kaybettiği görülmüştür.

Çizelge 4.2. Saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara karşı kararlılığı

Doğal Substratlar (%0,6m/v)	Bağlı aktivite (%)
<b>Kazein</b>	100
<b>Jelatin</b>	54,17
<b>Soya fasulyesi unu</b>	65,47
<b>Ovalbumin</b>	85,12
<b>Keratin</b>	44,64

#### 4.5.8. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerin ve yükseltgenlerin etkisi

Saflaştırılan proteaz enzimine yüzey aktif maddelerin etkisini incelemek için %1'lik SDS (w/v), %1'lik Triton X-100 (v/v), yükseltgenlerin etkisini incelemek için ise %2'lik ve %5'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) kullanılmıştır. Çizelge 4.6' da görüldüğü gibi TritonX-100 ile aktivitesi yaklaşık %38 artmıştır. SDS ile yaklaşık %48 aktivite kaybına uğramıştır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yükseltgen reaktifi varlığında ise kararlılığını koruduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.3. Saflaştırılan proteaz enziminin yüzey aktif maddelere ve yükseltgen reaktiflere karşı etkisi

Yüzey aktif maddeler	Bağıl aktivite (%)
SDS	52,39
TritonX-100	138,15
<b>Yükseltgen reaktifler</b>	
%2 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (v/v)	104,78
%5 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (v/v)	97,64
Kontrol	100

#### 4.5.9. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enzimine amino asit inhibitörlerinin etkisi

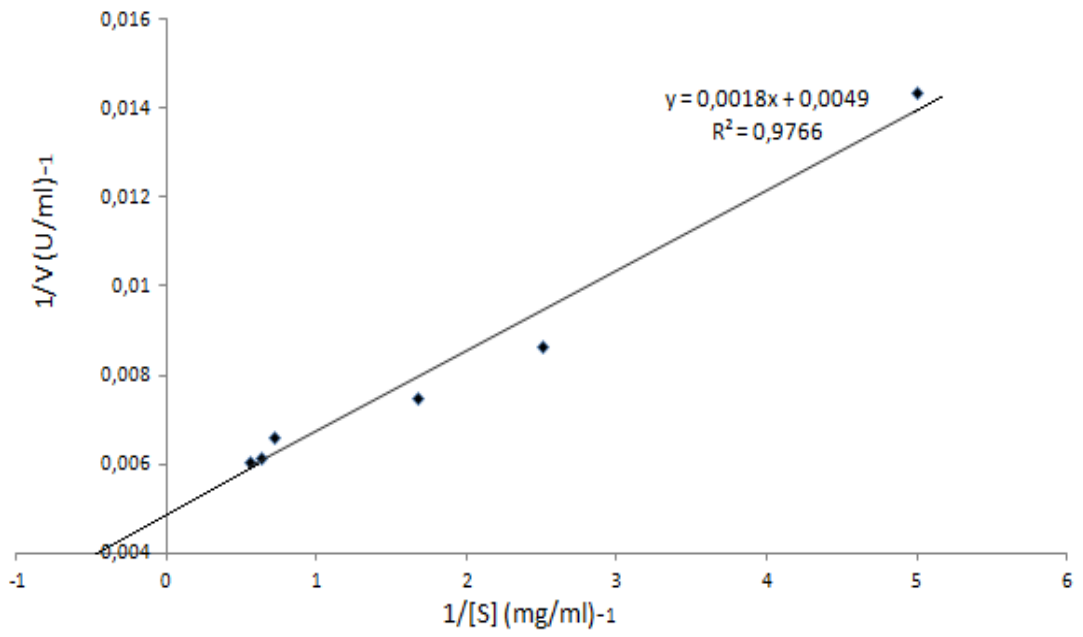
Saflaştırılan proteaz enzimine amino asitlerin etkisini belirlemek amacı ile % 0,1'lik (v/v) 2-merkaptoetanol ve fenilmetilsülfonilflorür (PMSF), etilendiamin tetra asetik asit (EDTA), ditiyotreitol (DTT) ün 2 ve 5 mM lık çözeltileri hazırlanmıştır. Bölüm 3.5.4'te anlatılan yöntemle göre aktivite tayinleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4' te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre PMSF ile enzim inhibe olmuştur. 2 mM EDTA ile aktivitesinin yaklaşık %48'ini kaybetmiştir. 2-merkaptoetanol ve DTT varlığında ise aktivitesinde artış gözlenmiştir.

Çizelge 4.4. Saflaştırılan proteaz enzimine aminoasit inhibitörlerinin etkisi

Amino asit inhibitörleri	Bağlı Aktivite (%)
2-merkaptoetanol [% 0,1 (v/v)]	134,90
PMSF (2mM)	26,47
PMSF (5mM)	8,82
EDTA (2mM)	52,94
EDTA (5mM)	88,24
DTT (2mM)	111,77
DTT (5mM)	105,88
Kontrol	100,00

#### 4.5.10. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin Michaelis-Menten kinetik parametreleri

Saflaştırılan proteaz enziminin, kazein varlığında kinetik sabitlerinin ( $K_m$  ve  $V_{max}$ ) belirlenmesi için Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak elde edilen grafik Şekil 4.13'te verilmiştir.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 0,37 mg/ml ve 1,13  $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{dak}^{-1}$  olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.13. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratıyla elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan bu çalışmada *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'ten proteaz enzimi saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014) % 1,25 glukoz, %1 pepton, % 0,5 maya ekstraktı içeren besiyerinde çoğaltılmış ve hücre dışı enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Proteinlerin, yüksek tuz konsantrasyonlarında çözünürlükleri azalır ve çökerler. Buna dayanarak, enzim %85'lik amonyum sülfat çöktürmesi ve diyalizi ile %23,36 verimle 3,14 kat saflaştırılmıştır (Çizelge 4.1). Verimin iyi elde edilememesinin nedenleri arasında ortam sıcaklığının +4°C' de tutulmaya çalışılmasına rağmen bozucu faktörlerin varlığı, pH ve karıştırıcı etkisinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Towatana ve arkadaşları (1999), yaptıkları çalışmada *Bacillus sp.* PS719'den proteazı %80 doygunlukta (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesi ile %80 verimle 1,5 kat saflaştırmışlardır [55]. Sonuçlardan da görüldüğü gibi yapılan çalışma daha yüksek bir verimle gerçekleştirilmesine rağmen daha düşük bir saflaştırma katsayısına sahiptir. Nadeem ve arkadaşları (2013), *Bacillus licheniformis* UV-9 dan alkalın proteaz saflaştırması için yaptıkları çalışmada %60-70 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesi ile %62 verimle 6,41 kat saflaştırma gerçekleştirmişlerdir [69]. Bu çalışmada hem saflaştırma katsayısının hemde verimin daha yüksek elde edildiği görülmektedir.

Yapılan çalışmada saflaştırma işlemine DEAE selüloz anyon değişim kromatografisi ile devam edilmiştir. Alkali proteazlar genelde pozitif yüklüdürler ve DEAE selüloz gibi anyon değişim kromatografilerine bağlanmazlar. Dolayısıyla saflaştırdığımız enzim, bağlanmayan fraksiyonlarda gelmiş ve pH 9,5 glisin-NaOH tamponuyla elüe edilmiştir. Sonuç olarak proteaz bu kromatografik yöntem ile % 5,66 verimle 10,42 kat saflaştırılmıştır (Çizelge 4.1). Annamalai ve arkadaşları (2013), yaptıkları çalışmada *Bacillus alveayuensis* CAS 5' ten DEAE anyon değişimi kromatografisi ile alkali proteazı %6,29 verimle 15,88 kat saflaştırmışlardır [84]. Yapılan bu çalışmanın, yaptığımız çalışmayla karşılaştırıldığında az fark olmakla birlikte tutarlı olduğu görülmektedir. Yang ve arkadaşları (2000), yaptıkları çalışmada *Bacillus subtilis* ' ten proteazı DEAE selüloz iyon değişim kromatografisi ile %56 verimle 11 kat saflaştırmışlardır [56]. Bu çalışmanın yaptığımız çalışmaya göre daha iyi

saflaştırıldığı görülmektedir. Adinarayana ve arkadaşları (2003), *Bacillus subtilis* PE-11' den serin alkali proteazı benzer bir saflaştırma yöntemi olan Sefadex G-200 ile %7,5 verim ile 21 kat saflaştırmışlardır [57]. Bu çalışmada proteazın daha iyi verimle saflaştırıldığı görülmüştür. Kezia ve arkadaşları 2012 'de Sefadex G-100 yöntemi ile *Bacillus subtilis* DKMNR' den proteazı %30 verim ile 2,45 kat saflaştırdıkları görülmüştür. Bu çalışmada daha iyi bir verim elde edilmesine rağmen, daha düşük bir saflaştırma katsayısına sahip olduğu görülmüştür. Yaptığımız çalışmada aktivite kaybı sebepleri arasında, protein yapısında bozulmaların olabileceği, çalışma ortamlarındaki sıcaklık ve pH etkisi, ve ortamdaki diğer maddelerin bozucu etkisi gibi nedenler düşünülebilir.

Ham ekstrakta amonyum sülfat çöktürmesi ve diyalizi uygulanıp iyon değişimi ile saflaştırıldıktan sonra ikinci bir saflaştırma yöntemi olarak CNBr ile aktifleştirilmiş Sefaroz 4B-basitrasin afinite kromatografisi uygulanmıştır. Bu işlem ile proteaz enzimi %7,19 verimle 14,07 kat saflaştırılmıştır. Afinite kolonuna kolon kapasitesinden fazla miktarda ham ekstrakt uygulandığı için kromatogramda bağlanmadan gelen aktivite piki gözlenmiştir. Bu sebeple birlikte, kolon dolgu maddesinin yapısal özelliği, pH ve sıcaklık etkisi, ortamdaki bozucu maddelerin varlığı gibi nedenlerin verimin düşük elde edilmesine neden olduğu düşünülmüştür. Stepanov ve arkadaşları (1992) yaptıkları benzer çalışmada *Halobacterium mediterrane'* den proteaz saflaştırmak için Sefaroz 4B-basitrasin afinite kromatografisi yöntemini uygulamışlar ve %80 verimle 93 kat saflaştırmışlardır [85]. Bu çalışmada proteazın yaptığımız çalışmaya göre daha iyi saflaştırıldığı görülmektedir.

Yapılan çalışmada saflaştırılan proteazın karakterizasyon işlemleri için molekül kütlesini belirlemek amacıyla Doğal (Native)-PAGE yöntemi uygulanmıştır ve enzimin molekül kütlesi yaklaşık 36 kDa olarak tespit edilmiştir. Sundararajan ve arkadaşları (2011), *Bacillus cereus* VITSN04'ten saflaştırdıkları proteaz enziminin molekül kütlesini 32 kDa olarak elde etmişlerdir [74]. Kim ve arkadaşları (2001)'de *Bacillus cereus* 'tan farklı ortam şartları uygulayarak saflaştırdıkları proteazın molekül kütlesini SDS-PAGE yöntemi ile sırasıyla yaklaşık 36 ve 38 kDa olarak

bulmuşlardır [86]. Molekül kütesinin SDS-PAGE yöntemi ile bulunduğu benzer çalışmalarda Patel ve arkadaşları yaklaşık 30-32 kDa olarak [54], Shah ve arkadaşları (2010), 38 kDa olarak [65], Huang ve arkadaşları (2006), 30,9 kDa olarak [87], Bundela ve arkadaşları (2013), 30 kDa olarak elde ederlerken [67], Ramakrishna ve arkadaşlarının (2010) 20,5 kDa gibi daha küçük molekül küteleli olarak proteazı karakterize ettikleri görülmüştür [62].

*Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'ten saflaştırılan proteaz enziminin karakteristik diğer özelliklerini belirlemek amacıyla optimum pH ve sıcaklığının yanı sıra enzime karşı metal iyonlarının, doğal substratların, organik çözücülerin, yüzey aktif maddelerin, yükseltgenlerin ve amino asit inhibitörlerinin etkisi incelenmiştir.

Yapılan çalışmada proteaz enziminin optimum sıcaklığı 50 °C olarak belirlenmiştir. Benzer çalışmalarda Yang ve ark. (2000), *B. Subtilis* Y-108'den saflaştırdıkları proteaz enziminin optimum sıcaklığını 50°C olarak bulmuşlardır [56]. Rufo ve arkadaşları (1990), *Bacillus subtilis*'ten saflaştırdıkları metalloproteazın optimum sıcaklığını 50°C olarak buldukları görülmüştür [88]. Matta ve arkadaşları (1998), *Bacillus polymyxa* B-17' den saflaştırdıkları hücre dışı proteaz enziminin optimum sıcaklığını 50°C olarak tespit etmişlerdir [89]. Bu çalışmalar, *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'ten saflaştırılan proteaz enziminin bulunan optimum sıcaklığı ile uyumluluğunu göstermektedir.

Saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık kararlılığı incelendiğinde 40°C' de 3 saat boyunca kararlılığını koruduğu gözlenmiştir. 50°C de 90 dakika sonunda aktivitesinin yaklaşık %60 ını kaybettiği görülmüştür. 60 ve 70 °C de ise enzimin 40 ve 50°C deki aktivitelerine nazaran aktivitesini kısa sürede daha hızlı kaybettiği görülmüştür. Bu sonuçlardan proteaz enziminin düşük sıcaklıklarda aktivitesini daha iyi koruyabildiği ancak sıcaklık yükseldikçe hızla aktivitesini kaybettiği söylenebilir. Yang ve arkadaşları (2000), saflaştırdıkları proteazın kararlılığını 25-50 °C arasında koruduğu gözlerken, daha yüksek sıcaklıklardan örneğin 60°C'de tamamen aktivitesini kaybettiğini görmüşlerdir [56]. Benzer bir çalışmada Singh ve arkadaşlarının (2001), saflaştırdıkları proteazın 40°C'de 6 saat boyunca aktivitesinin

neredeysi tamamını koruduğunu, 50 ve 60°C gibi sıcaklığın yükselmesiyle aktivitenin düştüğünü gözlemlemişlerdir [29].

Saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH profili ve sıcaklık kararlılığı çalışmalarında enzim en yüksek aktivitesini pH 9,5'ta göstermiştir. Optimum pH'nın 9,5 gibi alkali koşullarda çıkması enzimin alkali proteaz olduğunu göstermektedir. Enzim kararlılığının pH 8, 9 ve 9,5'ta büyük bir kısmının korunduğu gözlenirken, pH 12'de aktivitesinin yaklaşık %40'ını kaybetmiştir. pH arttıkça enzimin kararlılığında bir azalış olduğu saptanmıştır. Adinarayana ve arkadaşları (2003), yaptıkları benzer çalışmada proteazın optimum pH'ını 10 olarak bulmuş ve pH 8-10 aralığında aktivitesini koruduğunu gözlemlemişlerdir [57]. Towatana ve arkadaşları (1999), proteaz enziminin optimum pH'ını 9 olarak bulmuşlar ve pH 8-10 arasında ise kararlılığını koruduğunu görmüşlerdir [55]. Bu çalışmalar, *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'ten saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH ve pH kararlılığı ile benzer uyum göstermektedir.

*Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'ten saflaştırılan proteaz enzime karşı metal iyonlarının etkisi incelendiğinde  $Ca^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  iyonları varlığında aktivitesinin arttığı gözlenirken,  $Al^{+3}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $K^{+}$  iyonları ise inhibitör etkisi göstermiştir.  $Fe^{+3}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Na^{+2}$  iyonlarının ise enzime çok fazla etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Kezia ve arkadaşlarının (2011), yaptıkları çalışmada *Bacillus subtilis* DKMNR' den saflaştırdıkları proteazın  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  and  $Mn^{+2}$  iyonları ile aktivitesinin arttığını,  $Fe^{+2}$  ve  $Ba^{+2}$  iyonlarıyla aktivitesinin düştüğünü gözlemlemişlerdir. Johnwesly ve arkadaşları (2001), *Bacillus sp.* 'ten elde ettikleri proteaza  $Mn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  iyonlarının aktivatör etkisi,  $Fe^{+3}$ ,  $Hg^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  iyonlarının ise inhibitör etkisi yaptığını gözlemlemişlerdir [30]. Ramakrishna ve arkadaşları (2010), ise saf proteazın  $Mg^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  ile aktivitelerinin arttığı görmüşler fakat  $Ca^{+2}$  ile aktivitesinin düştüğünü bildirmişlerdir [62]. Yaptığımız çalışmada saflaştırılan proteazın  $Ca^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ , ve  $Ni^{+2}$  ile aktivitesinin artması sonucunda, bu metallerin substratın enzimin bağlanma bölgesine olan ilgisini artırdığını göstermiştir.

Organik çözücüler varlığında kararlılığını koruyan enzimler, endüstride potansiyel uygulamalara sahiptir. Bazı organik ürünler suda kararsız olup çözünmezler. Bu gibi durumlarda enzimler organik ürünlerin yanında katalizör olarak kullanıldığı için enzimlerin organik çözücülere etkisi önem taşıyan bir faktördür [90]. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den saflaştırılan proteazında bazı organik çözücüler varlığında etkisi incelenmiştir ve aktivitesini etanolün yaklaşık %8, n-bütanolün %5 oranında artıran çözeltiler olarak belirlenmiştir. Metanolde ve asetonda aktivitesini hemen hemen tamamını koruduğu gözlenirken, benzen ve toluen varlığında enzim aktivitesinin yaklaşık %85'ini, ksilen ve DMSO varlığında ise yaklaşık %75'ini korumuştur. Bu sonuçlardan *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'ten saflaştırılan proteazın organik çözücülere karşı iyi bir spesifik aktivite sergilediği, dolayısıyla endüstride kullanılabilirliğini göstermiştir.

Yapılan çalışmada saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara karşı etkisi kazein, ovalbumin, soya fasulyesi unu, jelatin ve keratin substratları ile incelenmiş ve en iyi aktivite kazein substratı ile elde edilmiştir. Ovalbumin ile aktivitesinin yaklaşık %85'ini, soya fasulyesi unu ile yaklaşık %65'ini, jelatin ile yaklaşık %55 ini, keratin ile yaklaşık %45'ini koruduğu gözlenmiştir. Yapılan benzer çalışmalarda Adinarayana ve arkadaşları *B.subtilis* PE-11'den saflaştırılan proteazın en çok aktiviteyi sırayla, kazein (%100), sığır serum albumini (%41), yumurta albumini (%23) ve jelatin (%9) gösterdiğini bildirmişlerdir [57]. Nadeem ve arkadaşları benzer çalışmada bu aktiviteyi sırasıyla kazein (%100), Albumin (%52), Hemogloblin (%72), jelatin (%11), yumurta albumini (% 42), keratin (%8) ve kollagen (%2) şeklinde elde etmişlerdir [69]. Bu çalışmalarda proteazın en iyi aktiviteyi kazeine karşı göstermesi ve diğer substratlara karşı azalan oranlarda ilgisinin olması, yaptığımız çalışmayla hemen hemen örtüşmektedir. Fakat genel olarak literatür çalışmalarında, araştırmamızda incelediğimiz aynı substratlara karşı, saflaştırdığımız proteaz enziminin daha yüksek kararlılık gösterdiği gözlenmiştir.

*Bacillus subtilis* (RSKK-11014)' ten saflaştırılan proteaz enzime yüzey aktif maddelerin etkisini incelemek için %1' lik SDS ve TritonX-100, yükseltgenlerin etkisini incelemek için ise %2 ve %5' lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltileri kullanılmıştır. Proteaz

noniyonik bir madde olan TritonX-100 e karşı %38'lik bir aktivite artışı gösterirken, anyonik SDS varlığında ise aktivitesinin ancak %52'sini koruyabilmiştir. Yükseltgen reaktifler varlığında ise %2 ve %5 lik (v/v)  $H_2O_2$ ' in her iki konsantrasyonu varlığında genel olarak aktivitesini koruduğu görülmektedir. Johnwesly ve arkadaşları, yaptığı benzer çalışmada proteazın 1 saatlik sürede %0,5'lik SDS (v/v) ile aktivitesinin %75 ini koruduğunu, % 5'lik (v/v) TritonX-100 ile %78 ini koruduğunu, yüzey aktif maddelerden %5'lik (v/v)  $H_2O_2$  ile aktivitesinin %7 artış gösterdiğini belirtmişlerdir [30]. Bu çalışmadan saflaştırılan proteazın, *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'ten saflaştırılan proteaza nazaran SDS'e karşı daha iyi kararlılık sergilediği görülmektedir. Yaptığımız çalışmada saflaştırılan proteazın noniyonik yüzey aktif maddelere ve yükseltgenlere karşı dayanıklı olduğu görülmüştür.

Çalışmada saflaştırılan proteazın aminoasit inhibitörlerine karşı etkisi incelenmiş ve 2-merkaptetanol ve 2 ve 5 mM' lık DTT varlığında aktivitesini korumuştur. 2 mM' lık PMSF ile aktivitesinin yaklaşık %74'ünü, 5mM'lık PMSF ile aktivitesinin yaklaşık %92' sini kaybederek inhibe olmuştur. PMSF varlığında enzimin inhibe olması enzimin serin proteaz ailesinden olduğunu göstermektedir. EDTA varlığında ise 5 mM' lık konsantrasyonunda aktivitenin yaklaşık %88' ini korumuş, 2mM lık konsantrasyonunda ise ancak %52 sini koruyabildiği gözlenmiştir. EDTA varlığında aktivitede yaşanan düşüş enzimin metal bağlama bölgesine sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca DTT ve 2-merkaptetanol varlığında aktivitesinin kaybetmemesi proteazın sistein grubuna dahil olmadığını kanıtlamıştır. Seifzadeh ve arkadaşları da, yaptıkları benzer çalışmada saflaştırdıkları proteazın EDTA ve 2-merkaptetanol varlığında aktivitesinin büyük çoğunluğunu koruduğunu gözlemlerken, PMSF varlığında enzimin inhibe olduğu görerek serin proteaz olduğu kanısına varmışlardır [91].

Km değeri enzimin substrata olan ilgisini ortaya koyan bir faktördür. Km değeri ne kadar küçükse enzim substratına karşı o kadar fazla afinite gösterir. Tam tersine Km değeri büyük olan enzimin ise substratına karşı ilgisi o denli azdır ve enzimin yarı doyumluğa erişmesi için daha büyük substrat konsantrasyonu gerekir. *Bacillus*

*subtilis* (RSKK-11014)' ten saflaştırılan proteaz enziminin kinetik parametreleri Lineweaver-burk grafiği yardımıyla bulunmuştur ve  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 0,37 mg/ml ve 1,13  $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{dak}^{-1}$  olarak elde edilmiştir. Literatür araştırmalarında Towatana ve arkadaşları (1999), *Bacillus sp.* PS7 19'dan saflaştırdıkları proteazın  $K_m$  ve  $V_m$  değerlerini sırasıyla 0,6 mM ve 1,0  $\text{mol}\cdot\text{dak}^{-1}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}^{-1}$  olarak elde etmişlerdir[55]. Kim ve arkadaşları (2005), *Bacillus subtilis* JM3' ten saflaştırdıkları proteazın kinetik parametreleri olan  $K_m$  ve  $V_m$  değerlerini sırasıyla 1,75 mg/ml ve 318  $\mu\text{M}/\text{dak}$  olarak tespit etmişlerdir [92]. Yaptığımız çalışma bu çalışmalar ile karşılaştırıldığında elde ettiğimiz proteazın substrata ilgisinin daha fazla olduğu görülmektedir.

Özetle çalışmada *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den proteaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE selüloz anyon değişim kromatografisi ve Sefaroz 4B-basitrasin afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Enzimin karakterizasyonu incelenmiştir ve Doğal (Native)-PAGE ile molekül kütlesi yaklaşık 36 kDa olarak elde edilmiştir. Saflaştırılan proteazın optimum pH' ı 9,5 ve optimum sıcaklığı 50 °C olarak belirlenmiştir. En iyi aktiviteyi kazein substratıyla gösteren proteaz enziminin  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$  metal iyonlarıyla aktive olduğu görülmüştür. PMSF ile inhibe olması ve EDTA ile aktivitesinin düşmesi ise enzimin metal bağlama bölgesine sahip, serin proteaz olduğunu göstermektedir. Bunların yanı sıra enzimin TritonX-100 gibi noniyonik deterjanlar, hidrojen peroksit gibi okside ve ağartıcı yükseltgenler ve organik çözücüler ile aktivitesini genel olarak koruması, saflaştırılan proteazın endüstriyel alanda kullanılabilirliğine potansiyel oluşturmaktadır. Kinetik parametreleri incelendiğinde ise saflaştırılan proteazın yüksek afiniteye sahip katalitik bir rol sergilediği gözlenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. İnternet: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üni. “Enzimlerin kullanım Alanları” <http://jes.ksu.edu.tr/public/journals/1/backIssues/sayi/eski/sayi/91/91.12-19.pdf> (Ekim 2013).
2. Kutay, F., “İnsan Biyokimyası”, Onat, T., Emerk, K., Sözman, E., *Palme Yayıncılık*, Ankara ,197-221 (2002).
3. Wiseman, A., “Handbook of Enzymes Biotechnology”, Second Edition, Chapter 3’, *The Application of Enzymes in Industry*, 274-373 (1987).
4. Horikoshi, K., “Alkaliphiles-from an industrial point of view”, *FEMS Microbiology Reviews*, 18:259-270 (1996).
5. 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).
6. Igarashi, K., Hatada, Y., Hagihara, H., Saeki, K. Takaiwa, M. Andito, S., “Enzymatic properties of a novel liquafying  $\alpha$ -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences”, *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9): 3282-3289 (1998).
7. Kumar, C.G., Takagi, H., “Microbial Alkaline Proteases: From a Bioindustrial Viewpoint”, *Biotechnology Advances*, 17: 561-594 (1999).
8. İnternet: Afyon Kocatepe Üniveristesi “Enzimler hakkında” <http://www2.aku.edu.tr/~mkonuk/enzimler.pdf> (Ekim2013).
9. İnternet: Anadolu Üniversitesi “ Enzimler” <http://w2.anadolu.edu.tr/aos/kitap/ehsm/1214/unite09.pdf> (Ekim2013).
10. İnternet: Mustafa Altınışık “Enzimler” <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/09-tbl102-0809enzimler.ppt> (Ekim 2013).
11. İnternet : Mikrobiyoloji “Enzimler” <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAAF6AA849816B2EFDBA70C97114F1A29> (Ekim 2013).
12. İnternet : Dokuz Eylül Üniversitesi “Enzimler” [http://www.deu.edu.tr/UploadedFiles/Birimler/16928/enzimler\\_sun.pdf](http://www.deu.edu.tr/UploadedFiles/Birimler/16928/enzimler_sun.pdf) (Ekim 2013).
13. İnternet: Mustafa Altınışık “Enzimler”



<http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-09.pdf> (Ekim 2013).

14. John, F.K., "Enzyme Technology", (H.J. Rehm., G. Reed editör), ***Biotechnology***, 7A:37-62 (1987).
15. Nelson, D.L., Cox, M.M., "Principles of Biochemistry", Fourth edition, ***W. H. Freeman and Company***, New York, 192 (2005).
16. Wiseman, A., "Handbook of Enzymes Biotechnology", Second Edition, Chapter 3, ***The Application of Enzymes in Industry***, 274-373 (1987).
17. Aiba, S.S., Humphrey, A.E., Milles, N.F., "Biochemical Engineering", 2nd ed., ***Academic Press Inc***, New York, 92:127 (1973).
18. Bailey, J.E. and Ollis, D.F., "Biochemical Engineering and Bitechology", 2nd Edition, ***Mc Graw Hill***, New York, 1-6 (1986).
19. Schmid, R.D., "Stabilized Soluble Enzymes", ***Adv. Biochem. Eng.***, 12:41 (1979).
20. 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).
21. John, W., and Sons, I., "Industrial Enzymes and Their Applications", ***United States of Amerika***, 435 (1998).
22. Gessesse, A., "Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases From an Alkaliphilic *Bacillus* sp.", ***Applied and Enviromental Microbiology***, 3533-3535 (1998).
23. Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., Saxena, R.K., and Gupta, R., "Characterization and wash performance analysis of an SDS-resistant alkaline protease from a *Bacillus* sp.", ***World J. Microbiol Biotechnol.***, 17:493-497 (2001).
24. Rosovitz, M.J., Voskuil, M.I., Chambliss, G. H., "*Bacillus*, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology", 9nd Edition, by edited Collier L., Balows, A. and Susman, M., ***Oxford University Pres***, New York, 2:709-730 (1998).
25. Wipat, A., Harwood, CR., "The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium", ***FEMS Microbiology Ecology***, 28: 1-9 (1999).
26. Gerçeker, D., "Bacillus", Ustaçelebi, Ş., ***Temel ve Klinik Mikrobiyoloji***, Güneş Kitapevi, Ankara, 411-418 (1999).

27. Kalender, N., “Biyoteknolojik Üretim İçin Rekombinant Mikroorganizma Geliştirilmesi”, *Yüksek Lisans Semineri*, Ankara Üniversitesi, Ankara, (1999).
28. Barredo, J. L., “Microbial Enzymes and Biotransformations”. *Humana Pres*, Totowa, New Jersey, 16-17 (2005).
29. Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C., “Serine Alkaline Protease From a Newly Isolated *Bacillus sp.* SSR1”, *Process Biochemistry*, 36 : 781-785 (2000).
30. 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).
31. Aunstrup, K., “Industrial Aspects of Biochemistry”, (B. Spencer editör), *FEBS*, Dublin, 23-29 (1981).
32. 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).
33. Setyorini, E., Kim, Y-J., Takenaka, S., Murakami, S., Aoki, K., “Purification and characterization of a halotolerant intracellular protease from *Bacillus subtilis* strain FP-133”, *J.Basic Microbiol.*, 46(4): 294-304 (2006).
34. Keskin, H., “Besin Kimyası”, *Güryay Matbaacılık Tic. Ltd. Sti*, İstanbul, 49-51 (1987).
35. Hedstrom, L., “Serin Protease Mechanisim and Specificity”, *Chem. Rev.*, 102:4501-4523 (2002).
36. Chaplin, M.F., and Bucke, C., “Enzyme Technology”, *Cambridge University Press*, Cambridge, 20-35 (1990).
37. Duran, K., E, Bozacı., Karahan A.H., “Protein Esaslı Mamüllerin Enzimatik Ön Terbiyesi”, Ege Üniversitesi Tekstil Mühendisliği Bölümü, *Tekstil ve Konfeksiyon*, 1-8 (2007).
38. Raksakulthai, R., and Haard, F. N., “Exopeptidases and Their Application to Reduce Bitterness in Food”, A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (4): 401–445 (2003).
39. Flores, M., Aristoy, M.C., and Toldra, F., “Hydrolysis of alanine oligopeptides by porcine muscle alanyl aminopeptidase”, *Eur. Food Res. Technol.*, 208(4): 264 (1999).

40. Shimogaki, H., Takeuchi, K., Nishino, T., Ohdera, M., Kudo, T., Ohba, K., Iwama, M. Irie, M., "Purification and properties of a novel surface-active agent and alkaline-resistant protease from *Bacillus sp.*", *Y. Agric. Biol. Chem.*, 55(9): 2251-8 (1991).
41. Kato, T., Yamagata, Y., Arai, T., Ichishima, E., "Purification of a new extracellular 90-kDa serine proteinase with isoelectric point of 3.9 from *Bacillus subtilis (natto)* and elucidation of its distinct mode of action", *Biosci Biotech Biochem*, 56:1166–1168 (1992).
42. Bugg, T., "An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry", *Blackwell Science*, 657-689 (1996).
43. Suckling, C. J., Gibson, C. L., Adrew, R. P., "Enzyme Chemistry", Third Edition, *Blackie Academia & Professional*, 92 (1998).
44. Dash, C., Kulkarni, A., Dunn B., Rao, M., "Aspartic Peptidase Inhibitors: Implications in Drug Development", *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 38(2): 89–119 (2003).
45. Genckal, H., Tari, C., "Alkaline Protease Production From Alkalophilic *Bacillus sp.* Isolated From Natural Habitats", *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 703-710 (2006).
46. Dubey, V. K., Pande, M., Singh, M. P., Jagannadham, M.V., "Papain Like Proteases: Application of Their Inhibitors", *African Journal of Biotechnology*, 6 (9):1077-1086 (2007).
47. Metzler, D., E., "Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells", *Harcourt Academic Press*, 1:625-627 (2001).
48. Deshpande, V.V., Rao, M., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. "Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (3):597-635 (1998).
49. Hase, C.C., Finkelstein, R.A., "Bacterial Extracellular Zinc-Containing Metalloproteases", *Microbiological Reviews*, 57: 823-837 (1993).
50. Saghatelian, A., Jessani, N., Joseph, A., Humphrey, M., Cravatt B. F., "Activitybased probes for the proteomic profiling of metalloproteases", *Proceeding of the National Academy of Science (PNAS)*, 101(27): 10000-10005 (2004).
51. Internet : Wikipedia "Papain"  
<http://en.wikipedia.org/wiki/Papain#Structure>, (Kasım 2013).

52. Internet : Herbal Extracts Plus “Bromelain ”  
<http://www.herbaextractsplus.com/bromelain.html>, (Kasim 2013).
53. Uhling, H., “Industrial Enzymes and Their Applications”, *John Wiley and Sons*, England, 1-13 (1998).
54. Patel, R. K, Dodia, M.S, Joshi, R. H., Singh, S. P., “Purification and characterization of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus sp.* ”, *Process Biochemistry*, 41:2002–2009 (2006).
55. Towatana, N., Painupong, A. and Suntinanalert, P., “Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus sp.* PS7 19”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87: 581-587 (1999).
56. Yang, J., Shih, I., Tzeng, Y. and Wang, S., “Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes”. *Enzyme and Microbial Technology*, 26:406-413 (2000).
57. Adinarayana, K., Ellaiah, P., Prasad, D. S., “Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE-11”, *AAPS Pharm SciTech*, 4(4): 1-9 (2003).
58. Dias, D.R., Vilela, D.M., Silvestre M.P.C., Schwan R.F. “Alkaline protease from *Bacillus sp.* isolated from coffee beangrown on cheese whey”., *World J. Microbiol Biotechnol.*, 24:2027–2034 (1-8) (2008).
59. Padmapriya, M., and Williams B.C., ‘Purification and characterization of neutral protease enzyme from *Bacillus subtilis*’ *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2 (4):612-618 (2012).
60. Reddy, L., Wee, Y., Ryu, H., “Purification and characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus sp.* RKY3.”, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83: 1526-1533 (2008).
61. Safey, E. M. El., Abdul-Raouf, U. M., “Production, purification and charactrization of protease enzyme from *bacillus subtilis*” *International Conferences For Development And The Environment In The Arab World*, Assiut Univ., March, 14: 23-25 (2004).
62. Ramakrishna D.P.N, Gopi Reddy, N., and Rajagopal, S.V., “Purification and Properties of an Extra Cellular Alkaline Protease Produced By *Bacillus subtilis* (MTTC N0-10110)”, *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6 (4): 493-504 (2010).

63. Das, G., and Prasad, M.P., "Isolation, purification & mass production of protease enzyme from *Bacillus subtilis*", *International Research Journals of Microbiology*, 1(2): 26-31 (2010).
64. Joo, H. S., Chang, C.S., "Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties", *Process Biochemistry*, 40: 1263-1270 (2005).
65. Shah, K., Mody, K., Keshri, J., Jha, B., "Purification and characterization of a solvent, detergent and oxidizing agent tolerant protease from *Bacillus cereus* isolated from the Gulf of Khambhat", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67: 85-91 (2010).
66. Cho, S.J., Oh, S.H., Pridmore, R.D., "Purification and Characterization of Proteases from *Bacillus amyloliquefaciens* Isolated from Traditional Soybean Fermentation Starter", *J. Agric. Food Chem.*, 51: 7664-7670 (2003).
67. Bundela, V., and Mandal, S.K., "Purification and characterization of an extracellular alkaline protease produced from an isolated *Bacillus subtilis*" *Department of Biochemical Engineering and Food Technology*, 4(2): 112-118 (2013).
68. Kumar, M.D., J, Priyadharshini, A. D, Suresh K, Saranya G.M, Rajendran, K and Kalaichelvan, P.T., "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).
69. Nadeem M., Qazi J. I., Syed Q., and Gulsher M.. "Purification and characterization of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis* UV-9 for detergent formulations", *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 35(2): 187-195 (2013).
70. Jin, F., Matsushita, O., Jin, S., "Purification, characterization, and primary structure of *Clostridium perfringens* lambda-toxin, a thermolysin-like metalloprotease", *Infection and Immunity*, 64(1): 230-237 (1996).
71. Huang, Q., Peng, Y., Li X., Wang, H., Zhang, Y., "Purification and Characterization of an Extracellular Alkaline Serine Protease with Dehairing Function from *Bacillus pumilus*", *Current Microbiology*, 46: 169-173 (2003).
72. Kazan, D., Denizci, A., Öner, M. and Erarslan, A., "Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42", *The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32:335-344 (2005).
73. Kumar, C.G., "Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*", *Letters in Applied*

- Microbiology*, 34: 13-17 (2002).
74. Sundararajan, S., Kannan, N., Chittibabu, S., “Alkaline protease from *Bacillus cereus* VITSN04: Potential application as a dehairing agent”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(2): 128-133 (2011).
  75. Beg, Q., and 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).
  76. Paoletti, M., Castroviejo, M., Bégueret, J. and Clavé, C., “Identification and characterization of a gene encoding a subtilisin-like serine protease induced during the vegetative incompatibility reaction in *Podospira anserina*”, *Current Genetics*, 39: 244-252 (2001).
  77. 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).
  78. Bradford, M. M., “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254 (1976).
  79. Yapasan, E., “Partial purification and characterization of lipase enzyme from a *Pseudomonas* strain”, Yüksek Lisans Tezi, *İzmir İleri teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 25-26 (2008).
  80. Erarslan, A., Kazan, D., Denizci, A.A., Öztürk, D., Karahan, N., “Enzim saflaştırmada temel yöntemler, VIII. Uygulamalı eğitim kursu”, *Tübitak*, Kocaeli, 49-53 (2005).
  81. 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).
  82. Rahman, R. N. Z. R, Geok, L. P., Basri, M., Salleh, AB., “An organic solventstable alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: Enzyme purification and characterization”, *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 1484–1491 (2006).
  83. Rai, S. K., Mukherjee, A. K., “Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04”, *Biochemical Engineering Journal*, 48: 173–180 (2010).

84. Annamalaia, N., Rajeswarib, M. V., Balasubramania, T., “Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveayuensis* CAS 5 using marine wastes”, *Food and Bioproducts Processing*, 1-8 (2013).
85. Stepanov, V. M., Rudenskaya, G. N., Revina, L. P., Gryaznova, Y. B., Lysogorskaya, E.N., Filippova, I. Y., “A serine proteinase of an archbacterium, *Halobacterium mediterranei*”, *Biochem J.*, 285:281-286 (1992).
86. Kim, S. S., Kim, Y. J., Rhee., I., “Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Bacillus cereus* KCTC 3674”, *Arch Microbiol*, 175 :458–461 (2001).
87. Huang, G., Ying, T., Huo, P. and Jiang, J., “Purification and characterization of a protease from *Thermophilic bacillus* strain HS08”, *African Journal of Biotechnology*, 5(24):2433-2438 (2006).
88. Rufo, G.A., Sullivan, B.J., Slom, A., Pero, J., “Isolation and characterization of a novel extracellular metalloprotease from *Bacillus subtilis*”, *Journal of Bacteriology*, 172(2): 1019 (1990).
89. Matta, H., Punj, V., “Isolation and partial characterization of a thermostable extracellular protease of *Bacillus polymyxa* B-17”, *International Journal of Food Microbiology* , 42:139–145 (1998).
90. Ogino, H., Ishikawa, H., “Enzymes which are stable in the presence of organic solvents”, *Journal of bioscience and bioengineering*, 91(2): 109-116 (2001).
91. Seifzadeh, S., Sajedi, R.H., Sariri, R., “Isolation and characterization of thermophilic alkaline proteases resistant to sodium dodecyl sulfate and ethylene diamine tetraacetic acid from *Bacillus* sp. GUS1”, *Iranian journal of biotechnology*, 6:4 (2008).
92. Kim, W.J. and Kim, S.M., “Purification and characterization of *Bacillus subtilis* JM-3 protease from anchovy sauce”, *Faculty of Marine Bioscience & Technology Kangnung National University Gangneung*, Gangwondo Korea, 210-702 (2005).

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÖZDEN, Seda  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 29.03.1987 Ankara  
Medeni hali : Bekar

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi /Kimya Bölümü	2014
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Kimya Bölümü	2011
Lise	Seyranbağları Yab. Dil. Ağr. Lise	2005

### Yabancı Dil

İngilizce