

***Bacillus subtilis* M33'DEN HÜCRE DIŞI ALKALİ PROTEAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Münteha Nur SONUÇ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ**

**HAZİRAN 2011
ANKARA**

Münteha Nur SONUÇ tarafından hazırlanan “*Bacillus subtilis* M33’den HÜCRE DIŞI ALKALİ PROTEAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Elif LOĞOĞLU

Tez DanıŐmanı, Kimya Anabilim Dalı

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

Prof. Dr. Atilla ÖKTEMER

Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Ahmet YAŐAR

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Elif LOĞOĞLU

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tarih: 08/06/2011

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

Prof. Dr. Bilal TOKLU

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.

Münteha Nur SONUÇ

***Bacillus subtilis* M33'DEN HÜCRE DIŞI ALKALİ PROTEAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

(Yüksek Lisans Tezi)

Münteha Nur SONUÇ

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Haziran 2011

ÖZET

Alkali proteazlar, endüstrinin hemen her alanında kullanılmakta ve çok çeşitli kaynaklardan farklı metotlarla saflaştırılması gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmada, topraktan izole edilen yeni bir *B.subtilis* M33'den hücre dışı alkali proteaz üretimi 37°C'de, 180 rpm çalkalama hızında 24-26 saat süresince gerçekleştirildi. Proteaz enzimi, %35-80 amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE selüloz anyon değişim kromatografisiyle %38,66 verimle ham homojenata göre 15,50 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin molekül kütlesi sodyum dodesilsülfat poliakrilamit jel elektroforezi (SDS PAGE) ve jel filtrasyon kromatografisi ile yaklaşık 39 kDa olarak tayin edildi. Saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 10,0 ve 55°C olarak bulundu. Enzimin 1 hafta boyunca pH 8,0-11,0 aralığında kararlılığını koruduğu görüldü. Enzimin fenilmetilsülfonilflorür gibi spesifik proteaz inhibitörüyle tamamen inhibe olduğu, etilen diamin tetra asetik asit inhibitöründen etkilenmediği, 2-merkapt etanol ve ditiyoteritol varlığında aktivitesinin arttığı dolayısıyla tiyol bağımlı serin proteaz olduğu belirlendi. Proteaz enziminin Mn²⁺, Mg²⁺ gibi metal iyonlarıyla aktive olduğu, Fe³⁺ ile aktivitesini kısmen kaybettiği görüldü. Enzimin oksidantlar (H₂O₂), yüzey aktif maddeleri (SDS, Triton X-100, Tween-80) ile ve ayrıca dimetil sulfoksit , etanol, aseton, benzen, n-Butanol, heptan, oktanol, toluen, metanol, asetonitril, 2-propanol gibi organik çözücülerle kararlılığını koruduğu tespit edildi. Enzimin çeşitli endüstriyel

deterjanlar varlığında da aktivitesi incelendi. Proteaz enziminin, kazein, sığır serum albumini, ovalbumin gibi doğal substratlara olan spesifitesi incelendi. Saflaştırılan enzimin Km ve V_{mak} kinetik parametreleri kazein substratı kullanılarak sırasıyla 0,706 mg/ml, 3000 µM.min⁻¹ bulundu.

Bilim Kodu : 201.1.020
Anahtar Kelimeler : Alkali proteaz, *Bacillus*, serin, saflaştırma, karakterizasyon
Sayfa Adedi : 96
Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Elif LOĞOĞLU

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN EXTRACELLULAR
ALKALINE PROTEASE FROM *Bacillus subtilis* M33**

(M.Sc. Thesis)

Münteha Nur SONUÇ

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

June 2011

ABSTRACT

Alkaline proteases are important from an industrial perspective due to their wide scale applications and can be obtained from different sources. In this study, protease was produced at 37°C for 24-26 hours in a shaker incubator (180 rpm). An alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* M33 was purified by (%35-80) ammonium sulfate precipitation and DEAE cellulose anion exchange chromatography with %38,66 yield and 15,50 fold. The molecular mass of purified enzyme was determined approximately 39 kDa by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) and gel filtration chromatography. The enzyme exhibited pH and temperature optima of 10.0 and 55°C respectively, and was stable between a wide pH range of 8.0 and 11.0 for 7 days. Some spesific protease inhibitors such as phenylmethyl sulfonyl fluoride completely inhibited the enzyme activity, whereas, ethylenediaminetetraacetic acid did not effect the enzyme activity. However, the protease activity was increased in the presence of 2-mercaptoethanol and dithiothreitol, suggesting it to be a thiol-dependent serine protease. Mn²⁺ and Mg²⁺ ions increased the enzyme activity, Fe³⁺ slightly decreased protease activity. The enzyme was also stable towards laboratory bleaches (H₂O₂), surfactants (Tween 80, Triton X-100, SDS) and organic solvents such as benzene, toluene, acetone. The substrate specifity of purified protease was tested for the substrates such as casein, bovine serum albumin and egg albumin. Also,

different commercially available detergents were used to study the compatibility of the purified alkaline protease. The kinetic parameters K_m and V_{max} of the purified protease were determined by measuring the protease activity casein as a substrate 0.706 mg/ml , $3000 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ respectively.

Science Code : 201.1.020

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

Page Number: 96

Adviser : Assoc. Prof. Dr. Elif LOĞOĞLU

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca maddi, manevi tüm destekleri, yardımları ve çalışmalar haricinde de bana kazandırdıkları için, Sayın Hocam Doç. Dr. Elif LOĞOĞLU'na, kıymetli bilgi ve tecrübelerini ve sabrını benden esirgemeyen, aktardıklarıyla hayata ve tez çalıőmama farklı noktalardan bakmamı sağlayan Refik Saydam Hıfzısıhha Aőı-Serum bölümünden kimyager Sayın Mustafa HACİÖMEROĞLU'na, araőtirmalarımız boyunca sağladığı destekten ötürü Ankara Üniversitesi Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Atilla ÖKTEMER'e, laboratuardaki çalışma arkadaşlarım, Esmâ SARI ve Refiye TEKİNER'e, manevi desteğiyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan değerli arkadaşım Aslıhan ARĐUN'a, ve gösterdikleri sabır ve destekten ötürü çok sevgili aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
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. Kuramsal Temeller.....	3
2.1.1. Yaşamın anahtarı: enzimler.....	3
2.1.2. Enzimlerin saflaştırılması.....	5
2.1.3. Proteazlar, fizyolojik özellikleri ve sınıflandırılmaları	13
2.1.4. Proteaz enziminin kaynakları	30
2.1.5. Tez çalışmasında kullanılan <i>B. subtilis</i> M33 hakkında genel bilgi.....	33
2.1.6. Proteazların endüstriyel uygulama alanları.....	34
2.2. Kaynak Araştırması.....	37
3. DENEYSEL KISIM.....	48
3.1. Kullanılan Kimyasallar	48
3.2. Kullanılan Mikroorganizma	48
3.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	48

Sayfa

3.4. <i>Bacillus subtilis</i> M33'ün Çoğaltılması ve Proteaz Üretimi	49
3.5. <i>Bacillus subtilis</i> M33'den Alkali Proteaz Enziminin Saflaştırılması.....	49
3.5.1. Amonyum sülfatla çöktürme.....	49
3.5.2. DEAE selüloz anyon değişim kromatografisi.....	50
3.6. Proteolitik Enzim Aktivitesinin Tayini	51
3.7. Warburg & Christian ve Bradford Yöntemleriyle Protein Miktarı Tayini	52
3.8. <i>Bacillus subtilis</i> M33'den Saflaştırılan Alkali Proteaz Enziminin Karakterizasyonu.....	53
3.8.1. SDS poliakrilamid jel elektroforeziyle proteaz enziminin saflık kontrolü ve molekül kütlesinin belirlenmesi.....	53
3.8.2. Proteaz enziminin molekül kütlesinin jel filtrasyon kromatografisiyle Belirlenmesi	55
3.8.3. Saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH ve pH kararlılığının Belirlenmesi	56
3.8.4. Saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığının ve sıcaklık kararlılığının belirlenmesi	57
3.8.5. Bazı metal iyonlarının saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesine etkisinin belirlenmesi	57
3.8.6. Bazı organik çözücülerin saflaştırılan proteaz enzimi kararlılığına etkisinin belirlenmesi	58
3.8.7. Saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlarla spesifitesinin Belirlenmesi	58
3.8.8. Bazı inhibitörlerin, deterjan yüzey aktif maddelerinin ve oksidantların saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesine etkisinin belirlenmesi	59
3.8.9. Çeşitli endüstriyel deterjanların proteaz enzimi aktivitesi üzerine etkisinin Belirlenmesi	60
3.8.10. <i>B. subtilis</i> M33'den saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratıyla Michealis Menten kinetik parametrelerinin belirlenmesi	60

Sayfa

4. ARAŞTIRMA BULGULARI	61
4.1. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini için Hazırlanan Standart Eğri.....	61
4.2. Aktivite Testlerinde Yararlanılan Tirozin Standart Eğrisi.....	61
4.3. <i>Bacillus subtilis</i> M33'den Proteaz Enziminin Saflaştırılması Sonuçları.....	62
4.3.1. İlk adım: amonyum sülfat çöktürmesi.....	62
4.3.2. İkinci adım: DEAE selüloz iyon değişim kromatografisi	62
4.4. <i>Bacillus subtilis</i> M33'den saflaştırılan Proteaz Enziminin Karakterizasyonu.....	64
4.4.1. SDS poliakrilamid jel elektroforeziyle proteaz enziminin saflık kontrolü ve molekül kütlesinin tespiti.....	64
4.4.2. Jel filtrasyon kromatografisi ile enzimin molekül kütlesinin tayini.....	66
4.4.3. <i>Bacillus subtilis</i> M33'den saflaştırılan proteaz enziminin optimum reaksiyon pH'sı sonuçları.....	67
4.4.4. <i>Bacillus subtilis</i> M33'den saflaştırılan proteaz enziminin pH kararlılığı Sonuçları	67
4.4.5. <i>Bacillus subtilis</i> M33'den saflaştırılan proteaz enziminin optimum reaksiyon sıcaklığı sonuçları	70
4.4.6 <i>Bacillus subtilis</i> M33'den saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık kararlılığı sonuçları	71
4.4.7. <i>Bacillus subtilis</i> M33'den saflaştırılan proteaz enzime bazı metal iyonlarının etkisi.....	72
4.4.8. Bazı organik çözücülerin <i>Bacillus subtilis</i> M33'den saflaştırılan proteaz enzimi kararlılığına etkisi.....	73
4.4.9. <i>Bacillus subtilis</i> M33'den saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifitesi sonuçları	74
4.4.10. Bazı inhibitörlerin, deterjan yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanların proteaz aktivitesine etkileri	75

Sayfa

4.4.11. Bazı endüstriyel deterjanların <i>Bacillus subtilis</i> M33'den saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesine etkileri	76
4.4.12. <i>Bacillus subtilis</i> M33'den saflaştırılan proteaz enziminin Michaelis-Menten kinetik parametreleri	77
5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER	79
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	96

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Proteinlerin karakteristik özelliklerine göre bazı ayırma yöntemleri.....	8
Çizelge 2.2. Jel Filtrasyon Kromatografisinde kullanılan ticari adsorbentler.....	10
Çizelge 2.3. İyon Değişim Kromatografisinde kullanılan adsorbentler ve özellikleri.....	11
Çizelge 2.4. Bazı proteazların kullanım alanları	35
Çizelge 3.1. %10'luk 50 ml ayırma jelinin hazırlanışı.....	53
Çizelge 3.2. Örnek yükleme jelinin (%4,5) hazırlanışı.....	54
Çizelge 3.3. Örneklerin gümüş boyama tekniği ile boyanma prosedürü	55
Çizelge 4.1. <i>B.subtilis</i> M33 kaynaklı proteazın saflaştırılma basamakları sonuçları	64
Çizelge 4.2. <i>B.subtilis</i> M33 saflaştırılan proteaz enziminin bazı substratlar varlığında aktivitesindeki durum	75
Çizelge 4.3. Bazı inhibitörlerin, deterjan yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanların proteaz aktivitesine etkileri	76
Çizelge 4.4. Bazı endüstriyel deterjanların <i>B.subtilis</i> M33'den saflaştırılan proteaz aktivitesine etkileri	77
Çizelge 5.1. Bazı ticari deterjan proteazlarının özelliklerinin <i>B.subtilis</i> M33'den saflaştırılan proteaz ile kıyaslanması.....	85

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Proteazların genel mekanizması	13
Şekil 2.2. Katalizledikleri reaksiyona göre proteazların sınıflandırılması.....	16
Şekil 2.3. Bir serin proteaz olan kimotripsinin reaksiyon mekanizması.....	19
Şekil 2.4. Serin proteazların inhibisyon mekanizması	21
Şekil 2.5. Aspartil proteazların genel mekanizması.....	24
Şekil 2.6. Papainin genel reaksiyon mekanizması	26
Şekil 2.7. Bir metalo proteaz olan termolisininin reaksiyon mekanizması.....	28
Şekil 2.8. Dört endoproteaz türüne ait mekanizmaların genel özeti	29
Şekil 4.1. Protein tayininde kullanılan standart grafik.....	61
Şekil 4.2. Tirozin standart grafiği	62
Şekil 4.3. <i>B.subtilis</i> M33'den DEAE selüloz iyon değişim kromatografisiyle saflaştırılan proteaz enziminin aktivite-absorbans grafiği	63
Şekil 4.4. Kromatografi cihazından elüsyon sonucu alınan kromatogram	63
Şekil 4.5. <i>B.subtilis</i> M33'den saflaştırılan enzimin jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği	66
Şekil 4.6. Kısmen saflaştırılmış proteazın jel filtrasyon kolonundan alınan kromatogram	66
Şekil 4.7. <i>B.subtilis</i> M33'den saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesine çeşitli pH'ların etkisi	67
Şekil 4.8. Saflaştırılan proteaz enziminin farklı pH'larda 3 saat inkübasyonu neticesindeki stabilitesi.....	68
Şekil 4.9. Saflaştırılan proteaz enziminin pH 6.0, 7.0 ve 8.0 tamponlarında 1 haftalık inkübasyonunda 24 saatlik periyotlar sonundaki stabilitesi...69	69

Şekil	Sayfa
Şekil 4.10. Saflaştırılan proteaz enziminin pH 9.0, 10.0, 11.0 ve 12.0 tamponlarında 1 haftalık inkübasyonunda 24 saatlik periyotlar sonundaki stabilitesi	69
Şekil 4.11. Saflaştırılan proteaz enzime çeşitli sıcaklıkların etkisi.....	70
Şekil 4.12. Saflaştırılan proteazın 40-70 °C arasındaki sıcaklıklarla inkübasyonu neticesindeki stabilitesi.....	71
Şekil 4.13. <i>B.subtilis</i> M33'den saflaştırılan proteaz enzime bazı metal iyonlarının etkisi	73
Şekil 4.14. Saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesine bazı organik çözücülerin etkisi.....	74
Şekil 4.15. <i>B.subtilis</i> M33'den saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratıyla elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	78

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Proteazların metabolizmadaki bazı fizyolojik özellikleri	15
Resim 2.2. Sığır tripsinin aktif bölgesi.....	20
Resim 2.3. <i>B. thermoproteolyticus</i> 'dan thermolisinin yapısı.....	28
Resim 3.1. 37 °C'de 24-26 saat fermente edilen <i>B.subtilis</i> M33	49
Resim 3.2. Bioplot Pharmacia FPLC ve fraksiyon kolektörü.....	51
Resim 3.3. Örneklerin %10'luk SDS-PAGE'de yürütülmesi.....	54
Resim 4.1. Enzimin %10'luk SDS-PAGE görüntüsü.....	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Kısaltmalar	Açıklama
EDTA	Etilendiamin tetraasetik ait
DMSO	Dimetil sülfoksit
PMSF	Fenilmetilsülfonilflorid
SDS	Sodyumdodesil sülfat
PAGE	Poliakrilamit jel elektroforezi
TCA	Trikloroasetik asit
APS	Amonyum persülfat
DEAE	Dietilaminoetil
TEMED	N,N,N', N'-tetrametil etilendiamin
DTT	Ditiyoteritol
BSA	Sığır serum albumini
U	Ünite
Tris	Trihidroksimetil aminometan
Ser	Serin
His	Histidin
Asp	Aspartik asit
Glu	Glutamik asit
Cys	Sistein
B.	<i>Bacillus</i>
dH₂O	damıtık su

1. GİRİŞ

Canlıdaki hemen hemen tüm kimyasal reaksiyonlar özgün enzimler ile katalizlenmektedir. Bundan dolayı yaşamın kendisi, birleşmiş enzimatik reaksiyonlar serisi, bazı hastalıklar ise normal metabolik modeldeki düzenin bozulması olarak ele alınmaktadır [1].

Enzimlerden bazı hastalıkların tedavisinde yararlanıldığı gibi enzimlerin kalitatif ve kantitatif tayinlerinden hastalıkların tanısında da yararlanır. Bazı patolojik hallerde hücrelerarası sıvıdaki veya kan plazmasındaki enzim düzeyi artar. Bunun sebebi enzim sentezinin artması olacağı gibi hücre zarının geçirgenliğinin artması veya hücrenin parçalanması da olabilir [2].

Enzimler, hastalıkların tanı ve tedavisinin haricinde, yiyecek ve içeceklerin üretim süreçlerinde ve ayrıca deterjanlar gibi bir çok tüketim maddesinin katkı maddesi olarak da kilit rol oynamaktadır [3]. Ticari olarak enzim üretimi yılda binlerce tonu bulmaktadır. Bunun üçte biri Avrupa, geriye kalanı da Kuzey Amerika ülkeleri tarafından gerçekleştirilmektedir [4].

Proteazlar, (proteolitik enzimler olarak da bilinir) peptit bağlarını hidrolizleyerek proteinlerin parçalanmasını katalizleyen enzim grubudur. İnsan ve fare genomlarının bioinformatik analizleri kullanılarak en az 500-600 proteaz (genomların yaklaşık %2'si) tanımlanmıştır ve bunların çoğu ortologdur. Proteazlar, proteinleri parçalayarak hücre döngüsü, hücre çoğalması, hücre ölümü, DNA replikasyonu, doku yenilenmesi, hemostasis (koagülasyon), yara iyileşmesi ve immün yanıt gibi bir çok fizyolojik sürecin kontrolünde anahtar rol oynamaktadırlar [5].

Proteazlar, endüstriyel enzimler içerisinde %60'lık pazar payıyla ilk sırada yer almaktadır [6]. Gıda endüstrisinde; etin yumuşatılması, bebek mamalarının hazırlanması ve fırıncılık gibi proseslerde kullanılmaktadır. Ayrıca tıbbi teşhiste, deterjan katkı maddelerinde ve dericilikte kılların arındırılması gibi süreçlerde yer almaktadır [7].

Proteazlar bitki ve hayvansal kaynakların yanı sıra, bakteri, maya, küf gibi mikroorganizmalardan da üretilmektedir. *Bacillus* genusları, kısa sürede, yüksek aktivitede, çok büyük oranlarda proteaz enzimi ürettikleri için endüstriyel anlamda çok tercih edilmektedirler [8]. Proteaz üreticisi *Bacillus* türleri topraktan [9, 10], kontamine ham petrol örneklerinden [11], yerel fermente soslardan [12, 13, 14, 15], soda gölü ve çevresi [16, 17] gibi kaynaklardan izole edilebilmektedir. Mikrobiyal kaynaklardan, özellikle *Bacillus* türlerinden, proteaz enzimi çeşitli çöktürme ve jel filtrasyon, iyon değişim, hidrofobik etkileşim gibi çeşitli kromatografik tekniklerle [18, 9-12, 13-16, 19-36, 37] saflaştırılıp, karakterize edilmektedir. *Bacillus* türlerinden saflaştırılan proteaz enzimleri çoğunlukla alkali pH'larda ve yüksek sıcaklıklarda [8-15, 16, 18, 20-21, 28, 31, 33-35] aktiftirler. Alkali proteazların, oksitleyiciler, deterjan yüzey aktif maddeleri, organik çözücüler ve metal iyonları varlığındaki aktivitesindeki kararlılığının ölçüsü, deterjan formülasyonlarında [11, 19, 21, 29, 33-35, 37], deri endüstrisinde tüylerin hidrolizinde [9, 16, 19], kitin üretiminde [29], peptit sentezinde [35], X-ray filmlerinden gümüşün geri kazanımında [9, 38] kullanılabilirliğinin önerileriyle neticelenmektedir.

Bu çalışmanın amacı, topraktan izole edilen *Bacillus subtilis* M33'den alkali proteaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi gibi ön saflaştırma teknikleriyle kısmen, kromatografik tekniklerle de ileri derecede saflaştırmaktır. Ayrıca saflaştırılacak olan enzimin çeşitli karakterizasyon çalışmaları da araştırmanın amaçları arasındadır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kuramsal Temeller

2.1.1. Yaşamın anahtarı: enzimler

Proteinler, tüm hücrelerde ve hücrelerin tüm bölümlerinde en çok bulunan biyolojik makro moleküllerdir. Genetik bilginin tanımlandığı moleküler araçlardır. Çok farklı çeşitte bulunabilecekleri gibi büyüklükleri de ufak peptitlerden milyonlarca moleküler ağırlıktaki büyük polimerlere kadar değişebilmektedir. Ayrıca proteinler, biyolojik işlev manasında da aşırı çeşitlilik gösterirler [39].

Enzimler kimyasal reaksiyonları katalizleyen biyolojik polimerlerdir. Enzimler olmasaydı bildiğimiz şekliyle yaşam olanaksız olacaktı. Yürüyen bütün fizyolojik olayların hızlarını düzenleyen biyokatalizörler olarak enzimler, sağlıkta ve hastalıkta merkezi bir yer işgal eder. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç, bilinen enzimlerin çoğu protein yapısındadır [40].

Biyokimya tarihinin genelinde enzim araştırmalarına rastlamak mümkün. Biyolojik kataliz ilk olarak 1700'lerin sonunda midenin salgılarıyla etin sindirimi üzerine yapılan çalışmalarda keşfedilmiş ve daha sonra tükürük ve çeşitli bitki özütleriyle nişastanın şekere dönüşümü çalışmalarıyla sürdürülmüştür. 1800'lerin sonunda Louis Pasteur şekerin mayayla alkole fermentesinin “fermentler” tarafından katalizlendiğini ve bu “fermentlerin” canlı maya hücrelerinin yapılarından ayrılamaz olduğunu öne sürmüştür. Ama, Buchner maya özütlerinin şekeri alkole fermentlediğini, bunun da hücreden ayrıldığında işlevine devam eden moleküller tarafından sağlandığını keşfetmiştir. Frederic W.Kühne ise bu molekülleri “enzimler” olarak adlandırmıştır [39].

Enzimlerin belirli bileşik gruplarıyla reaksiyon verip, başka bileşiklerde etkili olmamasına enzim spesifikliği denir. Bazı enzimler dar bir spesifikliğe sahipken bazı enzimler bu anlamda daha genişirler. Üreyi, karbondioksit ve amonyağa parçalayan

ürez enzimi dar bir spesifite gösterir, bununla birlikte bir ince bağırsak proteazı olan kimotripsin ise substratına karşı daha az spesifiktir [41].

Grup aktarma ve diğer tepkimeleri katalizleyen bir çok enzim, substratlarına ek olarak koenzim adı ile bilinen ikinci bir organik molekül gerektirir ve bunlar bulunmuyorsa etkinlik göstermez. Koenzimler, metal iyon etkinleştiricileri ve bizzat enzimin kendisinden ayırt edilmeleri için, enzimlerin etkinliği için gereken, sıcağa dirençli, küçük molekül ağırlıklı organik bileşikler olarak tanımlanır. Sindirim enzimleri tarafından kataliz edilen hidrolitik tepkimeler dahil litik tepkimeleri katalizleyen enzimler koenzim gereksinmez. [40].

Bir enzim molekülünün katalitik aktivitesi genel olarak yapısının bütünlüğüne bağlıdır. Dolayısıyla yapıdaki herhangi bir bozulma aktivite kaybı ile beraberdir, bu süreç denatürasyon olarak bilinir. Eğer denatürasyon çok ilerlememişse, denatüre edici etkenin uzaklaştırılması ile aktivite geriye döner. Bununla beraber uzamış veya ileri derecedeki denatüre edici koşullar aktivitede geri dönüşümsüz bir kayba sebep olur [1].

Enzimler sıcaklıkla çoğunlukla denatüre olurken, kofaktörler ısıya dayanıklıdır. Katalitik bakımdan etkin olan enzim-kofaktör kompleksine “haloenzim” adı verilir. Kofaktörü kendisinden ayrılan enzim, aktivitesini kaybeder [42].

Genomik dizilimle ilgili araştırmalarla birlikte, çok sayıda enzim tanımlanmıştır. 2004 yılının ortalarından itibaren, 9800 farklı organizmadan 83000’den fazla farklı enzime dair bilgiye ulaşmak mümkün. Bütün enzimler katalizledikleri kimyasal reaksiyonlara göre 6’ya ayrılırlar [43]. Oksidoredüktazlar, transferazlar, Hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar. Oksidoredüktazlar; elektronların transferini, Transferazlar; Grup-transfer tepkimelerini, Hidrolazlar; hidroliz tepkimelerini, Liyazlar; çift bağlara grupların ilavesi ve grupların yer değişmesiyle çift bağların oluşmasını, İzomerazlar; İzomerik formları oluşturmak üzere moleküller içinde grupların transferini, Ligazlar; ATP’nin ayrılmasıyla eşleşmiş kondensasyon tepkimeleriyle C-C, C-S, C-O, ve C-N bağlarının oluşmasını katalizler [39].

2.1.2. Enzimlerin saflaştırılması

Enzimlerin canlı hücre yapısından ayrıldığında da fonksiyonlarını yitirmediğinin ispatı, biyokimyacıları birçok farklı enzimin izolasyonunu denemek ve onların katalitik özelliklerini incelemek için teşvik etmiştir. 1926'da James Sumner'in üreazı izole ve kristalize etmesi, spesifik enzimlerin özelliklerinin incelenmesi için bir adım olmuştur. Sumner, üreaz kristallerinin tamamen proteinden oluştuğunu bulmuş ve bütün enzimlerin protein olduklarını ileri sürmüştür. Bu düşünce, hali hazırda başka örneklerin olmaması sebebiyle bir süre için tartışmalı kalmıştır. 1938 yılında ise Northrop, Kunitz ve Herriott adlı araştırmacılar 'Kristalize Enzimler' adlı yayınlarında pepsinojen, pepsin inhibitörleri, karboksipeptidaz, ribonukleaz, heksokinaz, difteri antitoksini ve bir kaç farklı enzimi saflaştırıp, kristalize ettiklerini ve protein yapılarında olduğunu rapor etmeleri Sumner'ın ulaştığı sonucun geniş kabul görmesini sağlamıştır. Northrop ve arkadaşlarının bu çalışmaları 1946 Nobel Kimya Ödülü'nü beraberinde getirmiştir [3, 44].

1940lara gelinene dek protein saflaştırmalarının amacı çoğunlukla akademikti. Protein yapılarının temel gerçekleri tam manasıyla değerlendirilemiyordu. İkinci Dünya Savaşı boyunca kan proteinlerine şiddetli bir şekilde ihtiyaç duyulması, serumdan albumin ve diğer proteinlerin saflaştırma yöntemi olan Cohn prosedürünün gelişmesine sebep olmuştur. Edwin Joseph Cohn liderliğinde saflaştırılmış kan proteinleri bir çok askerin hayatta kalmasını sağlamıştır. Cohn yöntemi günümüzde de halen kullanılmaktadır.

1960'lı ve 1970li yılları, protein ve enzim araştırmalarının pik yaptığı yıllar olarak tanımlamak yanlış olmaz. Protein saflaştırmasına dair yöntemlerin ayrıntıları bu yıllarda temellendirilmiştir. Enstrümantasyondaki gelişmelerle protein metodolojisi de gelişmiş ve kendini optimize etmiştir [45-46].

Enzimatik reaksiyonlarla çalışılmak isteniliyorsa ilk yapılması gereken şey uygun bir kaynak bulup enzimi saflaştırmaktır. Enzim ister endüstriyel alanda kullanılmak istenilsin isterse de laboratuvar çalışmaları için gereksin, uygun kaynaktan

saflaştırılması elzemdir. Enzimin aktivitesini tayin etmek için substratın ürüne dönüşümünü kantitatif olarak ölçen bir yöntem de ihtiyaç vardır. Böylelikle saflaştırmanın her aşamasında enzim aktivitesinden haberdar olarak yola devam edilebilecektir. Her enzimin ve proteinin kendine has bir saflaştırma prosedürü ve aktivite tayini vardır [47].

Protein veya enzim izolasyonlarında yöntem belirlenirken genel amaç;

- Mümkün olduğunca az adımda ve
- Mümkün olduğunca kısa sürede saflaştırmayı tamamlamaktır.

Bir enzimin aktivitesini ifade etmek için standart bir birim tanımlanmış ve Uluslar arası ünite (IU) olarak adlandırılmıştır. Buna göre bir ünite enzim, bir dakikada 1 μmol ürünün oluşumunu (1 μmol substratın dönüşümünü) katalizleyen enzim miktarıdır.

Bir enzimin spesifik aktivitesi ise, 1 mg protein başına düşen enzim ünitesinin sayısıdır. Saf bir enzimin spesifik aktivitesi sabittir ve o enzime özgüdür.

Her ne kadar enzim aktivitesi için ünite birimi sıkça kullanılsa da Uluslararası Biyokimya birliği adlandırma komisyonu (the nomenclature commission of the international union of biochemistry) tarafından “katal” birimi de alternatif olarak geliştirilmiştir. 1 katal enzim aktivitesi, optimal koşullarda, 1 saniyede 1 mol substratı değiştiren enzim etkinliğini ifade eder ki bu da 6×10^7 IU enzim aktivitesine denktir. $1 \text{ katal} = 60 \text{ mol min}^{-1} = 6 \times 10^7 \text{ U}$; $1 \text{ Ünite} = 1 \mu\text{mol min}^{-1} = 16,67 \text{ nkat}$ 'dır [48].

Enzim aktivitesine etki eden faktörler; enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, pH, iyonik şiddet, sıcaklık, inhibitör ve aktivatörlerdir.

Enzim inhibitörleri enzimatik tepkimeleri yavaşlatan veya durduran moleküler ajanlardır. Enzimlerin neredeyse bütün hücrel süreçleri katalizlediği bilindiğine göre enzim inhibitörlerinin farmakolojik ajanlar olduğunu söylemek şaşırtıcı değil.

Örneğin aspirin (asetilsalisilat) bazı ağrı yaratan süreçlerde yer alan prostaglandinlerin sentezindeki ilk basamağı katalizleyen enzimi inhibe eder. Enzim inhibitörlerinin iki genel sınıfı vardır; geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz [39].

Bir proteinin diğerinden farklı özelliklerinin olması saflaştırma yöntemleri için önemli bir avantajdır. Örneğin pek çok protein özgül olarak başka biyomoleküllere bağlanır ve bu bağlanma özellikleriyle proteinler ayrılabilir. Protein kaynağı genellikle doku veya mikrobiyal hücrelerdir. Protein saflaştırmadaki ilk basamak bu hücreleri parçalamak ve ham özüt (ekstrakt) adı verilen çözeltiliye proteinlerin geçmesini sağlamaktır. Gerekirse althücre fraksiyonları hazırlamak veya özgül organelleri izole etmek için diferansiyel santifürülenme yapılabilir [39].

Peki fraksiyonun saf olduğu nasıl anlaşılır? Bunun için izole edilen fraksiyonun analitik yöntemlerle analiz edilmesi gerekir. Eğer bu yöntemler fraksiyonda tek bir proteinin olduğuna işaret ederse saflaştırılma tamamlanmış demektir [48].

Ayrıca başarılı bir protein saflaştırma prosedürünün her adımında spesifik aktivitede artış gözlenir ve protein tam manasıyla saflaştırıldığında maksimum değere ulaşır. Öte yandan verimin de maksimum değerlerde olması istenir [47].

Proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin çözünebilirlik, iyonik yük, moleküler büyüklük, polarite, bağlanma spesifitesi gibi karakteristik özelliklerine göre çeşitli ayırma yöntemleri bulunmaktadır. Bu ayırma yöntemlerine dair örnekler Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Proteinlerin karakteristik özelliklerine göre bazı ayırma yöntemleri [49]

Özellik	Yöntem
İyonik Yük	İyon değişim Kromatografisi Elektroforez
Polarite	Hidrofobik etkileşim kromatografisi
Büyüklik/Kütle	Jel filtrasyon kromatografisi SDS-PAGE Ultrafiltrasyon
Bağlanma Spesifitesi	Afinite kromatografisi
Çözünürlük	Fraksiyonel çöktürme

İyonik Gücün Arttırılmasıyla Çöktürme (*Salting Out*)

Saflaştırmada en önde gelen tabakalandırma (fraksiyonasyon) basamağında, proteinlerin pH, ısı, tuz derişimi ve diğer etkenlerden etkilenen bir kompleks işlevi olan çözünürlüklerindeki farklılıklardan faydalanılır [39].

Nötral tuzların ilavesiyle çöktürme proteinlerin fraksiyonlanarak ayrılmasında en çok kullanılan yöntemdir. Genel olarak yüksek tuz konsantrasyonlarında proteinlerin çözünürlüğü düşüktür ve buna tuz ilavesiyle çöktürme (salting out) denir.

Protein moleküllerinde hem hidrofobik hem de hidrofilik gruplar bulunur. Hidrofobik gruplar molekülün iç kısımlarında bazıları da yüzeyinde yerleşmiştir. Tuz ilavesiyle çöktürme (*salting out*) protein yüzeyindeki bu hidrofobik gruplarla ilişkilidir. Su, hidrofobik gruplarla temas kurmakta zorlanır ve bu grupların üzerinde su moleküllerinin dizilimi söz konusu olur. Protein çözeltisine çok miktarda tuz ilave edilirse hidrofobik gruplar yüzeyine yerleşmiş yeterli miktarda su molekülü tuz iyonları tarafından hidrate olur ve yüzeyden uzaklaşmış olur. Yüzeyden su uzaklaştıkça protein moleküllerindeki hidrofobik bölgeler birbiri ile etkileşir ve aggregasyon oluşur.

Farklı proteinler farklı amino asit kompozisyonlarında oldukları için, farklı protein molekülleri farklı tuz konsantrasyonlarında çökerler. Bu konsantrasyon, çeşitli denemelerle saflaştırılmak istenen proteine göre belirlenirse, istenmeyen diğer proteinler ortamdaki uzaklaştırılmış olur.

Bu yöntemle çöktürülen protein genellikle denatüre olmadığından, aktivite peletin uygun tamponla çözünmesiyle geri kazanılır. Buna ek olarak bu çeşit tuzlar proteinleri denatürasyon, proteoliz ve bakteriyel kontaminasyona karşı stabilize eder. Tuzla çöktürmeden sonra tuzun uzaklaştırılması “dializ” işlemiyle gerçekleştirilebilir. Kısmen saflaştırılmış özüt yarı geçirgen bir zarla yapılmış tüp veya torbaya konur. Bu torba uygun iyonik güçteki fazla miktardaki tampon çözeltisine asıldığında zar; tuz ve tamponun yer değiştirmesine izin verirken proteini geçirmez [49-50].

Jel Filtrasyon Kromatografisi

Kromatografi günümüz kimya laboratuvarlarında en geniş kullanım alanı bulan tekniklerden biridir. Yöntem genel olarak analizlerde, izolasyonlarda ve saflaştırmalarda kullanılır. Ayrıca endüstride üretim aşamasında nanogramların altında miktarlardan kilogramlara kadar çok geniş bir alanda kullanılabilir [51].

Bütün kromatografik ayırmalarda numune gaz, sıvı veya süperkritik akışkanı olan hareketli faz ile taşınır. Bu hareketli faz bir kolonda veya bir katı yüzeyde sabitleştirilmiş kendisi ile karışmayan bir durgun faz içinden geçmeye zorlanır. Bu iki faz numune bileşenlerinin hareketli ve durgun fazlarda farklı oranlarda dağılacığı şeklinde seçilir. Hareket hızlarının farklılığı sonucu numune bileşenleri birbirinden kalitatif ve/veya kantitatif olarak analizlenebilen bantlar veya bölgeler şeklinde ayrılırlar [52].

Molekül büyüklüklerine göre proteinleri ayırmada kullanılan en uygun ve etkili metod jel filtrasyon kromatografisidir. Bu metotta bir kolona kuvvetli hidratize

olmuş polimer materyal konulur. Bu materyal Sefadeks, Sefaroz gibi bir polisakkarit veya Biogel gibi bir poliakrilamid türevi olabilir. Jel partikülleri değişik büyüklükteki gözeneklere (porlara) sahip şekilde hazırlanabilir.

Polimer materyal (kolon matriksi) tamponla dengelendikten sonra, aynı tamponda çözülmüş olan protein karışımı kolona tatbik edilir. Büyük molekülü proteinler jel partiküllerinin porlarına giremezler hızlıca yürürler. Küçük molekülü proteinler ise porlara girerler, haliyle akışları engellenir. Böylece elüatta önce büyük molekülü proteinler daha sonra da küçülen molekül büyüklüğüne göre proteinler toplanır. Bu metot proteinlerin molekül ağırlığının tayininde de kullanılır [53]. Sıklıkla kullanılan ticari kromatografi adsorbentleri Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Jel Filtrasyon Kromatografisinde kullanılan ticari adsorbentler [54]

Adsorbent	Fraksiyon Aralığı (Da)	Matriks Bileşimi
Superdex	$1 \times 10^4 - 6 \times 10^5$	Dekstran/Agaroz
Superose	$1 \times 10^3 - 5 \times 10^6$	Agaroz
Sephacryl	$1 \times 10^3 - 8 \times 10^6$	Akrilamit
Bio-Gel P	$1 \times 10^2 - 1 \times 10^6$	Akrilamit
Sepharose	$1 \times 10^4 - 4 \times 10^7$	Agarose
Sephadex	$7 \times 10^2 - 2,5 \times 10^5$	Dekstran
Bio Beads (SX)	600 - 1400	Stiren divinilbenzen

İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisinin temeli, katı matriksin veya duran fazın yüklü gruplarıyla üzerinde net yük taşıyan moleküllerin diferansiyel elektrostatik afinitesi ilişkisine dayanır. Bu kromatografinin, anyon değişim ve katyon değişim olmak üzere iki çeşidi vardır. Katyon değişim kromatografisinde duran faz negatif yüklü gruplar içerir. Bunun manası çözeltideki pozitif yüklü moleküllerin duran faza ilgisinin artmasıdır (katyonlar gibi). Anyon değişim kromatografisinde ise durum tam tersidir, duran faz pozitif yüklü gruplar içerir ve bunun sonunda çözeltideki negatif yüklü gruplar duran faza bağlanır (anyonlar gibi).

Anyon ve katyon değiştiricilerin reğineleri zayıf veya kuvvetli olarak sınıflandırılır. En sık kullanılan anyon değiştirici reğine dietilaminoetil (DEAE) selülozdur. DEAE selüloz zayıf anyonik değiştiricidir ve genellikle pH 9'nın altında çalışır. Katyon değiştiricilerde ise en sık kullanılan reğine karboksimetil (CM) selülozdur. CM selüloz da zayıf iyon değiştiricilerdendir ve genellikle pH 4,5'un üzerinde çalışır [54]. Sıklıkla kullanılan adsorbentler izelge 2.3'de verilmiştir.

Protein karışımlarının DEAE selüloz kolonları üzerinde ayrılmasında ve her bir komponentin sırayla elüsyonunda, azalan pH'lı tamponların bir serisi veya artan iyonik şiddetli tuz çözeltilerinin bir serisi kullanılır. Bunların kolondan geçirilmesi sırasında anyonik proteinlerin bağlanması azalır. Çünkü pH'nın dışmesiyle birlikte iyon değiştiriciye tutunan proteinlerin negatif yüklü bölgeleri nötral hale gelir. Yine iyonik şiddetin artmasıyla pozitif iyonlar proteinin negatif yüklü bölgelerine bağlanırlar; negatif yüklü iyonlar ise proteinlerle iyon değiştiriciye bağlanma konusunda yarışa girerler. Böylece proteinler bu bölgeye daha yavaş bir kuvvetle bağlanır ve hatta koparlar [53].

Çizelge 2.3. İyon Değişim Kromatografisinde kullanılan adsorban ve zellikleri [54]

Adsorban	Fonksiyonel Grup	Uygulama
Mono Q	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Kuvvetli anyonik
Q Sepharose	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Kuvvetli anyonik
AG 2	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{C}_2\text{H}_4\text{OH}$	Kuvvetli anyonik
AG 1	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Kuvvetli anyonik
DEAE Sepharose	$\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_3)_2$	Zayıf anyonik
Mono S	$-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	Kuvvetli katyonik
AG 50W	$-\text{SO}_3^-$	Kuvvetli katyonik
CM-Sepharose	$-\text{CH}_2\text{COO}^-$	Zayıf katyonik
Bio- Rex 70	$-\text{COO}^-$	Zayıf katyonik

Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS PAGE)

Elektroforez doğru akımın uygulandığı bir tampon çözeltide yüklü taneciklerin diferansiyel göç hızlarına dayanan bir ayırma yöntemidir. Bu ayırma yöntemi, ilk olarak İsveçli kimyacı Arne Tiselius tarafından serum proteinleri üzerinde çalışırken bulunmuş ve bu çalışma kendisine 1948'de Nobel ödülünü getirmiştir.

Elektroforetik ayırmada numunedeki taneciklerin göç hızları taneciklerin yüküne ve büyüklüklerine bağlıdır. Böylece numunedeki çeşitli analitlerin ayrılması yük/boyut oranlarındaki farklılara dayanır [52].

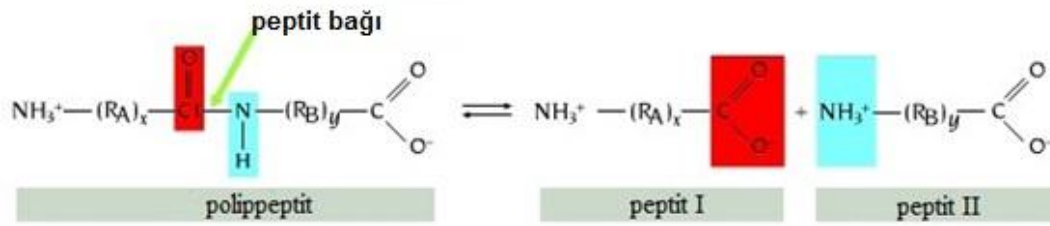
Jel elektroforezinde moleküller polimerik bir jel matriksi destekli ortamda yürütülürler. Elektroforetik sistemlerde jel benzeri bir çok materyaller kullanılır, agaroz (bir poligalaktoz polimeri) bunlardan biridir ve nükleik asitler, lipoproteinler gibi büyük makromoleküllerin uygulamalarında idealdir. Poliakrilamit jeller çok yönlü kullanım avantajlarından dolayı en çok tercih edilen jel türüdür. Poliakrilamit jeller akrilamit monomeriyle N-N'-metilen-bis-akrilamit çapraz bağlayıcısının polimerizasyonu sonucu oluşur. Poliakrilamit jel bir elek gibi iş görür ve yük/kütle oranına göre proteinlerin göçünü yavaşlatır.

Elektroforetik yöntem çoğunlukla saflık ve molekül kütlelerinin tayini için de kullanılır. Örnek hazırlama tamponuna bir deterjan türü olan sodyum dodesil sülfat (SDS) konur. SDS molekül ağırlıklarına göre proteinlere bağlanır ve bağlı SDS net negatif yükü artırır, proteinin iç yükü maskelenir ve her proteinin yük/kütle oranı benzer olur. Ayrıca SDS bağlandığında proteinin doğal şekli de değişir. Böylece SDS PAGE'de proteinler tamamen kütle temel alınarak ayrılır, ufak peptitler daha hızlı göç ederler. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel analizi farklı yöntemlerle yapılabilir. En fazla kullanılan yöntemde, destek materyali bir boya ile muamele edilerek ayrılmış fraksiyonların tanınması sağlanır. En yaygın boyalar: Amido Black, Coomassie Brilliant Blue, Fat Red 7B ve gümüş nitrattır. Bilinmeyen protein, molekül kütlesi bilinen proteinin jeldeki göçüyle kıyaslanarak tanımlanabilir.

Eğer protein iki veya daha fazla altbirim içeriyorsa, bu altbirimler genellikle SDS'le ayrılır ve her biri ayrı bir bant olarak gözlenir [39, 52, 54]

2.1.3. Proteazlar, fizyolojik özellikleri ve sınıflandırılmaları

Farklı özellikteki ve kombinasyondaki bir çok enzim; proteinlerin amino asitlerine yıkılmasına gerek duyar. Proteazlar (proteinazlar veya peptidazlar) su ile peptit bağlarını yıkıp proteinleri hidrolizleyen ve organik çözücüler varlığında peptit sentezini katalizleyebilen enzim grubudur [55] (Şekil 2.1.). Proteazlar sadece sindirim yolunda değil her hücre içerisinde bulunurlar [56].



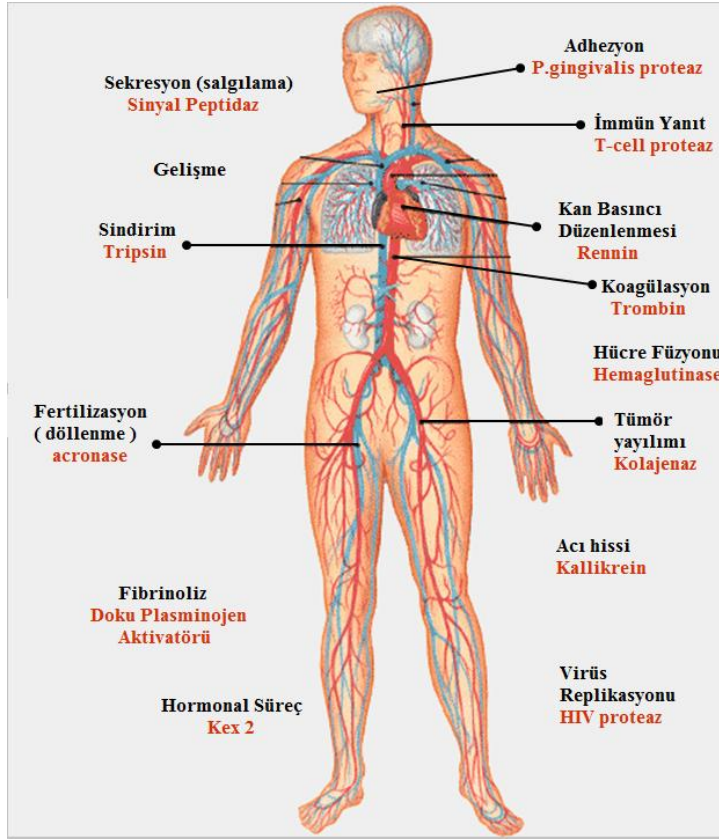
Şekil 2.1. Proteazların genel mekanizması

Proteolitik enzimler tüm canlı organizmalarda büyüme ve farklılaşmayı ve hücrenel bileşenlerin ihtiyaç duyduğu iç dengeyi (homeostasiyi) sağlar. Organizmada sentezlenen proteinlerin kompozisyonunun, büyüklüğünün, biçiminin ve döngüsünün kontrolünde elzem olan bu enzimler kanın pıhtılaşması, kontrollü hücre ölümü, doku farklılaşması, gen ekspresyonu gibi yaşam için önemli biyolojik süreçlerde de rol oynar [6, 57].

Bu fonksiyonlarının direkt bir sonucu olarak proteazlar; DNA replikasyonu ve transkripsiyonuna, doku morfojenizine ve yeniden şekillenmesine, hücre çoğalması ve farklılaşmasına, ısı şok protein yanıtına, damar genişlemesi (anjiyogeneze), sinir dokusu oluşumu (nörojenez), ovülasyona, fertilizasyona, yara iyileşmesine, kök hücre mobilizasyonuna, inflamasyona, bağışıklığa, otofajiye (otoliz) yaşlanmaya, nekroz, ve apoptoze etkir. Proteazların hücrenel davranışlarda ve organizmanın

yaşamla ölüm arasındaki dengesinde bu kadar etkin olması; proteolitik sistemlerdeki bir bozulmanın, kanser, nörodejenerasyon, inflamatuvar ve kardiyovaskular hastalıkların temelini oluşmasına sebep olabilir (Resim 2.1). Bu sebepten ötürü, ilaç endüstrisi için proteazlar, teşhis için tasarlanan hedef ilaçların temel noktasıdır. Proteazlar bitkilerde de; olgunlaşma ve yıkım süreçlerinin gelişiminde ve değişen çevresel koşullara uyum gibi noktalarda kilit rol oynar. Aynı şekilde bir çok infeksiyöz mikroorganizma replikasyon için proteazlara gereksinir veya AIDS gibi insan hayatıyla doğrudan ilişkili hastalıkların proteaz hedefli tedavisinin gelişiminde proteazı zehirlilik (viryülans) faktörü olarak kullanır [58].

Proteolitik enzimler, hücrel metabolik süreçlerde önemli rol oynamalarının haricinde endüstriyel çevrelerin de oldukça dikkatini çekmektedir. Endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılan enzimlerin dünya genelindeki toplam satışının 1 milyar doların üzerinde olduğu tahmin edilmektedir. Proteazlar ise endüstride en çok kullanılan üç enzimin içerisinde yaklaşık %60lık pazar payıyla başı çekmektedir [6]. Proteazlar endüstrinin deterjan, protein, bira, fotoğraf, deri ve süt alanlarında oldukça çok kullanılmaktadır [59].



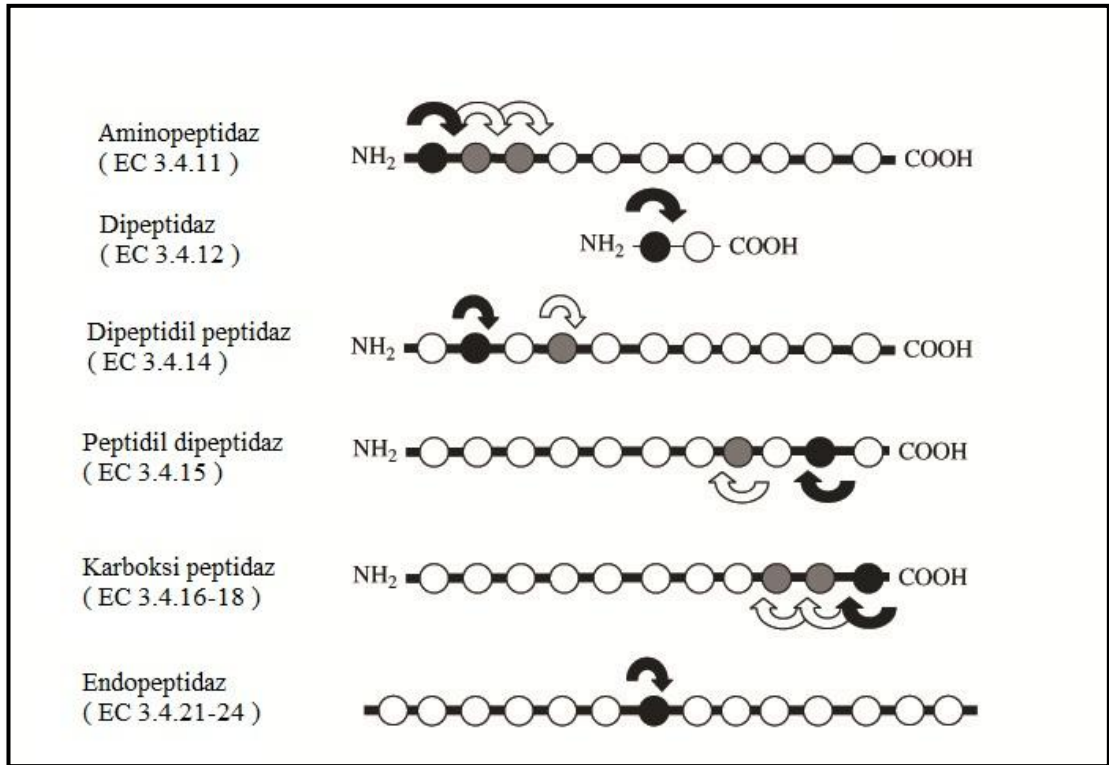
Resim 2.1. Proteazların metabolizmadaki bazı fizyolojik özellikleri [60]

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği - Numaralandırma Komitesine göre proteazlar sınıf 3'ün (hidrolazlar) alt sınıfı 4'e (peptidazlar ya da peptid hidrolazlar) mensupturlar. Bununla birlikte proteazların, sahip oldukları geniş etki ve yapı çeşitliliklerinden ötürü enzimlerin sınıflandırıldığı genel sistem ile sınıflandırılmaları da güçtür. Hali hazırda proteazlar, katalizledikleri reaksiyon tipine göre, aktif bölgelerinin kimyasal doğasına göre ve referans alınan yapıyla evrimsel ilişkisine göre 3 ana kriter temel alınarak sınıflandırılırlar [6].

Proteazlar etki bölgelerine göre kabaca ikiye ayrılabilirler; ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar (Şekil 2.2). Ekzopeptidazlar; peptit bağlarını substratın amino (-NH₂) veya karboksi (-COOH) ucuna yakın bir yerden parçalarken endopeptidazlar ise uzak bir noktadan parçalar [21]. Aktif bölgesindeki fonksiyonel grubun varlığına ve katalitik mekanizmasına göre proteazlar için 6 farklı gruplandırma daha yapmak

mümkündür; aspartik, glutamik, ve metalloproteazlar, sistein, serin, ve treonin proteazlar. Glutamik proteazlar, memelilerde henüz bulunamamıştır [58].

Proteazlar aktivite gösterdikleri pH aralığına göre de, asidik, nötral ve alkali proteazlar olarak sınıflandırılmışlardır.



Şekil 2.2. Katalizledikleri reaksiyona göre proteazların sınıflandırılması [61].

Farklı yapıdaki proteazlar için amino asit dizilimlerinin kıyaslanmasıyla ileri bir gruplandırma yapılabilir ve bu gruplar 3 boyutlu yapıların benzerliği çerçevesinde bir araya getirilebilir [6, 58].

Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar, polipeptit zincirinin amino veya karboksil ucundaki peptit bağlarını hidroliz eder. Amino ucunu hidrolizleyen ekzopeptidazlar; aminopeptidazlar,

karboksil ucunu hidrolizleyen ekzopeptidazlar karboksipeptidazlar olarak adlandırılır.

Aminopeptidazlar; proteinin amino ucundaki peptit bağlarını hidroliz ederler ve tek amino asit veya dipeptit veya da tripeptit kalıntısı açığa çıkarırlar. Aminopeptidazlar bakteriler ve mantarlarda olmak üzere bir çok mikroorganizmada bulunur. Genel olarak, aminopeptidazlar hücre içi enzimlerdir ama *A. oryzae*'in hücre dışı aminopeptidaz ürettiği rapor edilmiştir. Enzimin, substrat spesifitesi ve diğer özellikleri alınan mikroorganizmaya göre değişkenlik göstermektedir.

Eshcherichia coli'den Aminopeptidaz I adlı enzim büyük bir proteazdır (400 kDa) ve pH 7,5'tan 10,5'e kadar geniş bir aralıkta çalışır ve optimum aktivite için Mg^{2+} veya Mn^{2+} 'e gereksinim duyar. Bununla birlikte *Bacillus licheniformis* aminopeptidazının moleküler kütlesi 34 kDa'dır ve aktivitesi Co^{2+} iyonları varlığında artar. Öteki taraftan, *B. stearothermophilus* 'tan saflaştırılan aminopeptidaz II moleküler kütlesi 80 ile 100 kDa arasında değişen bir dimer yapıdır ve aktivitesi Zn^{2+} , Mn^{2+} veya Co^{2+} iyonları varlığında artar.

Karboksipeptidazlar; proteinin karboksil ucundaki peptit bağlarını hidroliz ederler. Karboksipeptidazlar, enzim aktif bölgesindeki amino asit kalıntısı temel alınarak, serin karboksipeptidazlar, sistein karboksipeptidazlar ve metalokarboksipeptidazlar olmak üzere 3 ana gruba ayrılabilirler. *Penicillium spp.*, *Saccharomyces spp.*, ve *Aspergillus spp*'den izole edilen serin karboksipeptidazlar benzer substrat spesifitesine sahipken, optimum pH, kararlılık, molekül kütlesi ve inhibitör etkisi gibi özelliklerinde farklılık teşkil ederler. *Saccharomyces spp*'den saflaştırılan metalokarboksipeptidaz, aktivitesi için Zn^{2+} veya Co^{2+} gereksinir [6].

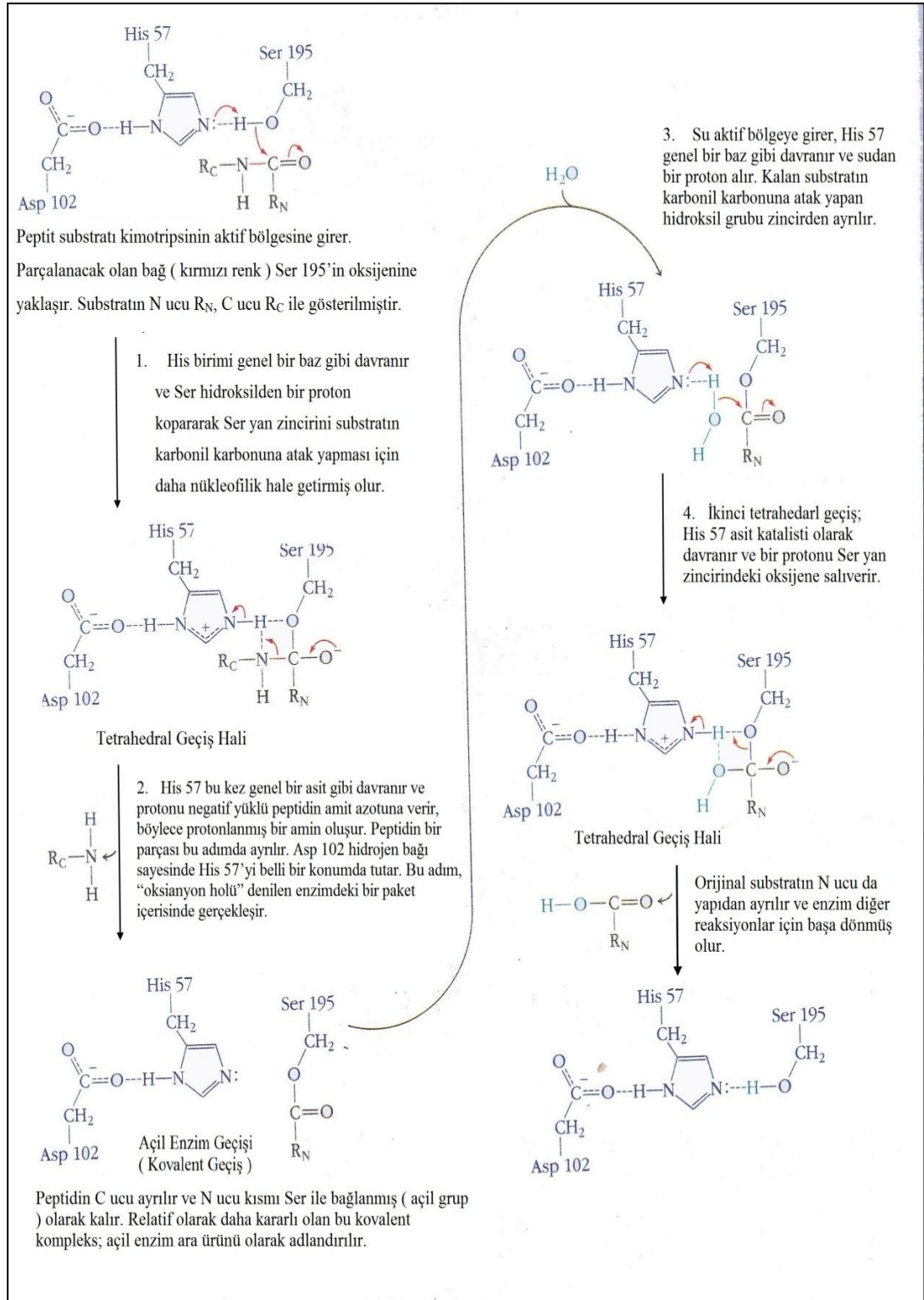
Endopeptidazlar

Endopeptidazlar, peptit bağlarına N veya C ucundan uzakta, iç kısımlarda etkirler. Serbest amino veya karboksil gruplarının varlığı enzim aktivitesine negatif yönde etki eder. Endopeptidazlar, katalitik mekanizmalarına göre serin proteazlar (E.C.

3.4.21) sistein proteazlar (E.C.3.4.22) aspartat proteazlar (E.C.3.4.23) ve metallo proteazlar (E.C.3.4.24) olarak sınıflandırılır [6].

Serin Proteazlar (E.C.3.4.21)

Serin proteazlar, aktif merkezlerinde aspartik asit (Asp-102), serin (Ser-195) ve histidinden (His-57) oluşan üçlü katalitik yapı ile karakterize edilir. Bu yapı içinde serin; substrat ile kovalent bağ oluşturur ve yapı adını da buradan alır. Serin proteazlara örnek olarak; tripsin, kimotripsin, elastaz gibi sindirim enzimleri ile koagülasyon faktörleri, plazmin fibrinolitik enzimi ve aktivatörleri de verilebilir [56]. Kimotripsinin reaksiyon mekanizması Şekil 2.3 'de anlatılmış ve üç boyutlu yapısı Resim 2.2'de verilmiştir.

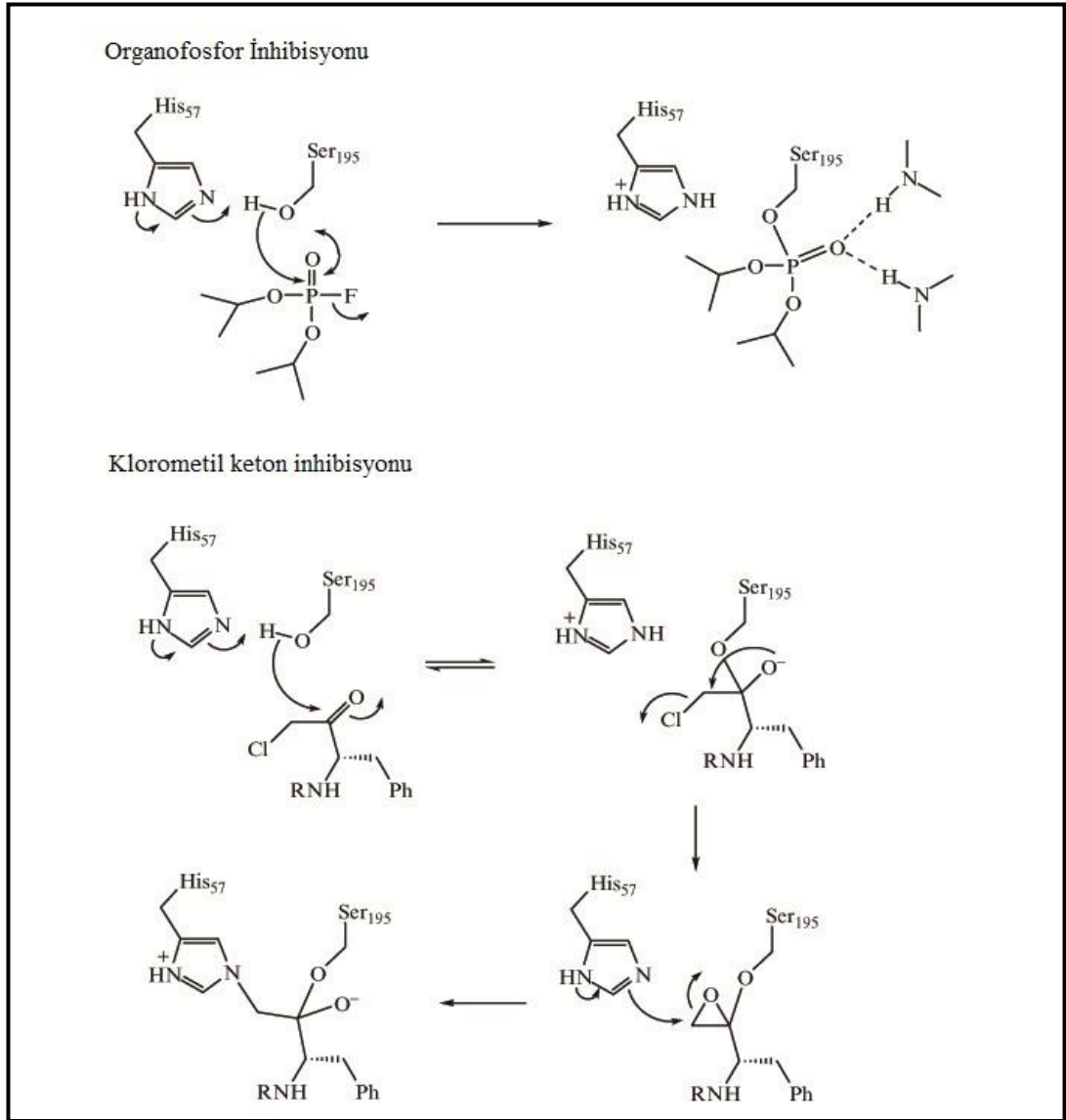


Şekil 2.3. Bir serin proteaz olan kimotripsinin reaksiyon mekanizması [62]



Resim 2.2. Sığır tripsinin (kırmızı) aktif bölgesi [47]
(Soldan sağa doğru katalitik üçlü; Asp-102, His-57 ve Ser-195. Gly-193 tarafından oluşturulan oksianyon holü ve siyahla gösterilmiş bağlı haldeki boronik asit inhibitörü)

Serin proteazlar; 3,4-dikloroisokumolin (3,4-DCI), L-3-karboksitrans 2,3-epoksipropil-löçilamido (4-guanidin) bütan (E.64), diisopropilflorofosfat (DFP), fenilmetilsulfonilflorid (PMSF) ve tosil-L-lizin klorometil keton (TLCK) gibi bileşiklerin geri dönüşümsüz inhibisyonuyla tanımlanabilir. Bazı serin proteazlar; aktif bölgenin yakınındaki sistein kalıntısı varlığından dolayı p-kloromerkuribenzoat gibi tiyol reaktifleriyle de inhibe edilebilir [6]. Serin proteazlara ait iki inhibisyon mekanizması Şekil 2.4’de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Serin proteazların inhibisyon mekanizması [47]

Serin proteazlar genellikle 7-11 arasında değişen nötral ve alkali pH'larda aktif olmakla birlikte daha uç pH'larda aktif serin proteazlara da rastlanmaktadır. Bu enzimler; esterolitik ve amidaz da dahil olmak üzere geniş bir substrat spesifitesine sahiptirler. Molekül kütleleri 18 ile 35 kDa olmakla birlikte *B. subtilis (natto)*'dan 90 kDa'lık bir proteazın izole edildiğine dair de raporlar vardır [63]. Serin proteazların isoelektrik noktaları genellikle pH 4-6 arasında değişmektedir [64].

Trombin, doku plasminojen aktivatörü, ürokinaz tipi plasminojen aktivatörü ve plasmin gibi iyi karakterize edilmiş hücre dışı serin proteazlar merkezi sinir sisteminde önemli yer tutmaktadır. Tripsin ve tripsin benzeri serin proteazlar nöral gelişme, plastisite, nörodejenerasyon ve nörorejenerasyonda kilit rol oynarlar. Bir serin proteaz olan nöropsin hücre dışı matriks bileşenleri parçalar ve beynin hafıza ve öğrenme işlevlerini ayarlar. Mutant bir nörotripsin çocuklarda zeka geriliği sebeplerine katkıda bulunabilmektedir. Nörosinin, MS (multiple skleroz), Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif bozuklukların patojeneziyle ilgili olduğu görülmektedir [65].

Kan pıhtılaşmasında serin proteazlar; bir peptit bağının yıkılması için aktif noktadaki serinin kullanılmasına sindirim ve kan pıhtılaşması olaylarında yer alan proteolitik enzimlerde sık rastlanır. Kan pıhtıları, kanda inaktif bir öncül olan fibrinojen halinde bulunan bir protein olan fibrinden oluşur. Serin proteaz türünde olan trombin aktif fibrin vermek üzere fibrinojendeki bir peptit bağını kırar. Trombin kimotripsinde bulunan aynı aspartat-histidin-serin katalitik üçlüsüne sahip olup esas olarak aynı tarzda etki yapar. Trombin aktif olmayan öncülü olan protrombin halinde de bulunmakta olup bu öncül, bir diğer kan pıhtılaşma serin proteazı tarafından proteolitik kırılma ile aktive edilir [66].

Serin alkali proteazlar; bir çok bakteri, küf, maya ve mantarlar tarafından üretilir. DFP veya patates proteaz inhibitörleriyle inhibe edilebilmelerine rağmen, TPCK veya TLCK'yla inhibe olmazlar. Parçalanacak bağın karboksil ucundan tirozin, fenilalanin veya lözin bulunduran bir peptit bağını hidroliz ederler. Optimum pH'ları 10, isoelektrik noktaları ise pH 9 civarındadır. İstisnalar olmakla birlikte molekül kütleleri genellikle 15-30 kDa arasında değişmektedir.

Alkali serin proteazlar *Arthrobacter*, *Streptomyces*, ve *Flavobacterium* spp gibi bir çok mikroorganizma tarafından üretilmesine rağmen en bilinenleri *Bacillus* spp. tarafından üretilenlerdir.

Subtilisinler; *Bacillus* kaynaklıdır ve serin proteazların ikinci en büyük ailesidir. Molekül kütleleri genellikle 20,000 ile 45,000 dalton arasında değişmektedir. *Bacillus amyloliquefaciens*'dan üretilen Novo veya diğer adıyla BPN9 yapısı aydınlatılmış ilk subtilisindir. O zamandan beri, *Bacillus subtilis*'ten subtilisin E, *B. licheniformis*'den subtilisin Carlsberg, *B. subtilis (natto)* den subtilisin NAT gibi bir çok serin proteazın aminoasit dizilimi tayin edilmiştir. Subtilisin Carlsberg deterjan endüstrisinde kullanılmakta ve bu saf enzimin yıllık üretimi 500 tonu bulmaktadır. Subtilisin Novo ve Carlsberg benzer özellikleri göstermektedir; optimum pH'ları 10 ve sıcaklıkları da 60°C'dir. Her ikisi de geniş substrat spesifitesine sahiptir ve aktif bölgelerinde Ser²²¹, His⁶⁴ ve Asp³² üçlüsü bulundurlar [6].

Serin proteazlar için ayrıca, yan zincirlerin spesifitesine ve daha önce tanımlanmış proteazlarla benzerliklerine göre ileri sınıflandırmalar da yapılmaktadır [64].

Aspartil Proteazlar (EC.3.4.22)

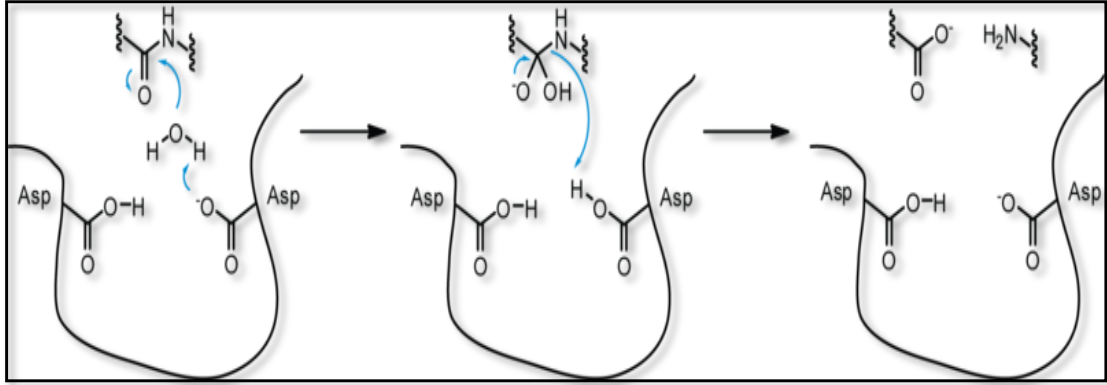
Asit endopeptidazlar olarak da bilinen aspartil proteazlar katalitik bölgelerinde aspartik asit bulundurlar. Asidik (aspartil) proteazlar 3 aileye ayrılabilirler; pepsin(A1), retropepsin(A2), ve pararetvovirüslerden elde edilen enzimler(A3).

Aspartik proteazların çoğu düşük pH'larda etkindir (pH 3-4) ve isoelektrik noktaları pH 3 ile 4,5 arasında değişmektedir. Moleküler kütleleri genellikle 30-45 kDa arasındadır. Bazı aspartil proteazlara örnek olarak; HIV-1 proteaz, Chymosin, Renin, Cathepsin D, Pepsin, Plasmepsin, Nepenthesin verilebilir.

Aspartil proteazlar, pepstatin ile inhibe edilirler. Ayrıca; bakır iyonları varlığında diazoasetil-DL-norlösün metil ester (DAN) ve 1,2 epeoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan (EPNP) gibi diazoketon bileşiklerine karşı da hassastırlar.

Mikrobiyal asit proteazlar, pepsinlere benzer olarak aromatik ve hacimli amino asit kalıntılarına karşı peptit bağlarının her iki yanında spesifte gösterirler. Mikrobiyal aspartik proteazlar iki ana gruba ayrılabilirler; (i) *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*,

ve *Neurospora*'dan üretilen pepsin benzeri enzimler ve (ii) *Endothia* ve *Mucor spp*'den üretilen rennin benzeri enzimler [6].



Şekil 2.5. Aspartil proteazların genel mekanizması [67]

Aspartil proteazlar için bir çok mekanizma önerilmiştir ama içlerinde en genel kabulü gören; su molekülüyle yüksek korunumlu aspartat kalıntıları arasındaki koordinasyonu ilgilendiren asit baz mekanizmasıdır (Şekil 2.5).

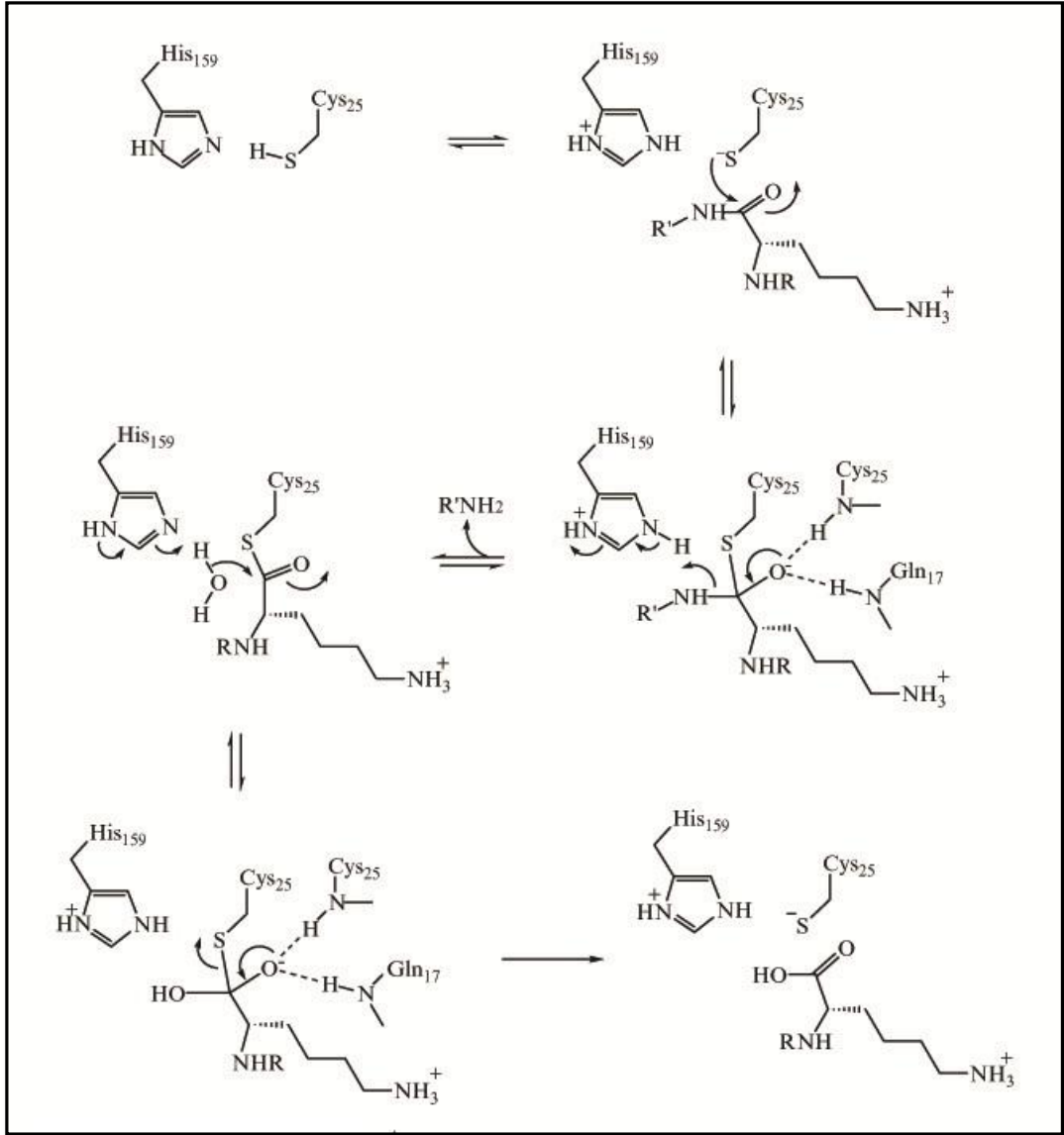
Aspartat yan zinciri, su molekülünün bir protonunu alarak harekete geçirir ve böylece su molekülü substratın karbonyl karbonuna atak yapar, bağ açılmasını ve tetrahedral oksianyon ara yapısının oluşmasını sağlar. Bu yapının tekrar düzenlenmesi parçalanmış amidin protonasyonuna öncülük eder.

Sistein (tiyol) Proteazlar (EC.3.4.23)

Sistein proteazlar hem ökoryotlarda hem de prokaryotlarda bulunur. Yaklaşık 20 tane sistein proteaz ailesi tanımlanmıştır. Sistein proteazların katalitik aktivitesi sistein ve histidin kalıntıları bulundurmasına bağlıdır. Bu sistein ve histidin yapılarının düzenlenmesi her ailede farklılık göstermektedir. Genellikle sistein proteazlar sadece HCN veya sistein varlığında aktiftirler. Yan zincirlerinin spesifitesine göre 4 ana gruba ayrılırlar; (i) papain benzeri (ii) tripsin benzeri olanlar (iii) glutamik asite özgü olanlar ve (iv) diğerleri. Papain en çok bilinen sistein proteazdır. Sistein proteazlar

genellikle nötral pH'ya sahip olmalarına rağmen, lizozomal proteazlar asidik pH'ta aktiftir. PCMB gibi sülfhidril ajanlara karşı hassastırlar ama DFP ve metal şelatlaştırıcı ajanlardan etkilenmezler [6, 68].

Sistein proteazlar açıl-tiyol ara ürününün hidrolizlendiği genel asit-baz oluşumunu gerektiren iki yer değiştirme reaksiyonunun gerçekleştiği hidroliz mekanizması ile karboksilik asit türevlerini hidrolizlerler. Açıl tiyol ara ürününün oluşumundan dolayı tiyol proteazlar olarak da adlandırılırlar. Mekanizmaları serin proteazların mekanizmalarına çok benzemektedir. Katalitik prosesin ilk basamağı serbest enzim ile substratın kompleks formda nonkovalent bağlanmasını gerektirir. Bu basamağı enzimin açılması izler ve ilk ürün $R'-NH_2$ oluşur ve ayrılır. Takip eden deaçilasyon basamağında açıl-enzim kompleksi su molekülü ile tepkir ve ikinci ürün ayrılır serbest enzimin rejenerasyonu gerçekleşir [6]. Bir sistein proteaz olan papainin genel reaksiyon mekanizması Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Papainin (bir sistein proteaz) genel reaksiyon mekanizması [47]

Sistein proteazlara daha çok papaya, ananas, incir ve kivi gibi meyvelerde sıkça rastlanır. Meyvenin olgun olmayan halinde proteaz oranı daha fazladır.

Sistein proteazlar, fizyolojik manada çok fazla role sahiptir, örneğin bitkilerin büyüme ve gelişiminde, kontrollü hücre ölümünde, çekirdeklerdeki depo proteinin birikimi ve mobilizasyonunda görev alırlar. Ayrıca, metabolik yolların uyarımında, biyotik ve abiyotik strese yanıtla da doğrudan ilgilidirler [69].

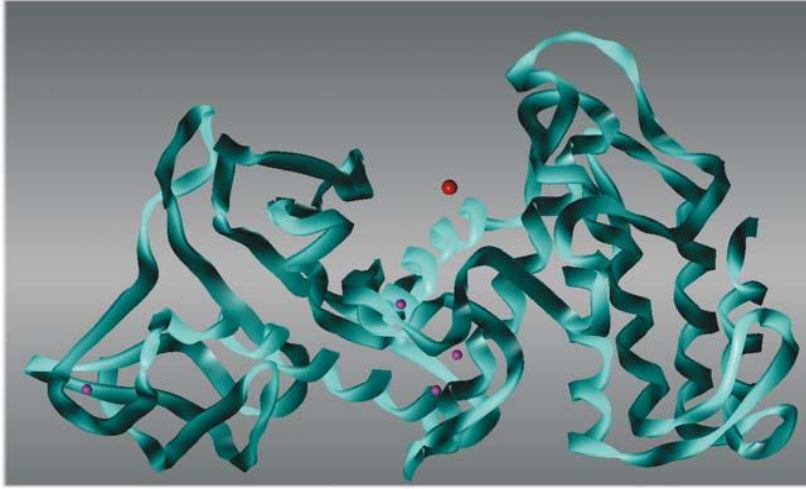
Metallo Proteazlar (EC.3.4.24)

Metallo proteazlar, proteazların belki de en eski sınıfıdır. Diğer proteazlardan protein dizilimleri ve yapılarıyla ayrılmalarının yanı sıra aktivite için çinko iyonuna gereksinim duymalarıyla karakterize edilirler. Bazı durumlarda, çinko; kobalt veya nikel gibi metallerle aktivitesini kaybetmeden yer değiştirebilir [70]. Yaklaşık otuz sınıfı tanımlanmıştır ve bunların on yedisi sadece endopeptidaz, on ikisi sadece ekzopeptidaz, biri hem endo hem de ekzopeptidaz içerir. İşlev spesifiklerine göre; nötral, alkali, *Myxobacter* I ve *Myxobacter* II olmak üzere dört gruba ayrılırlar.

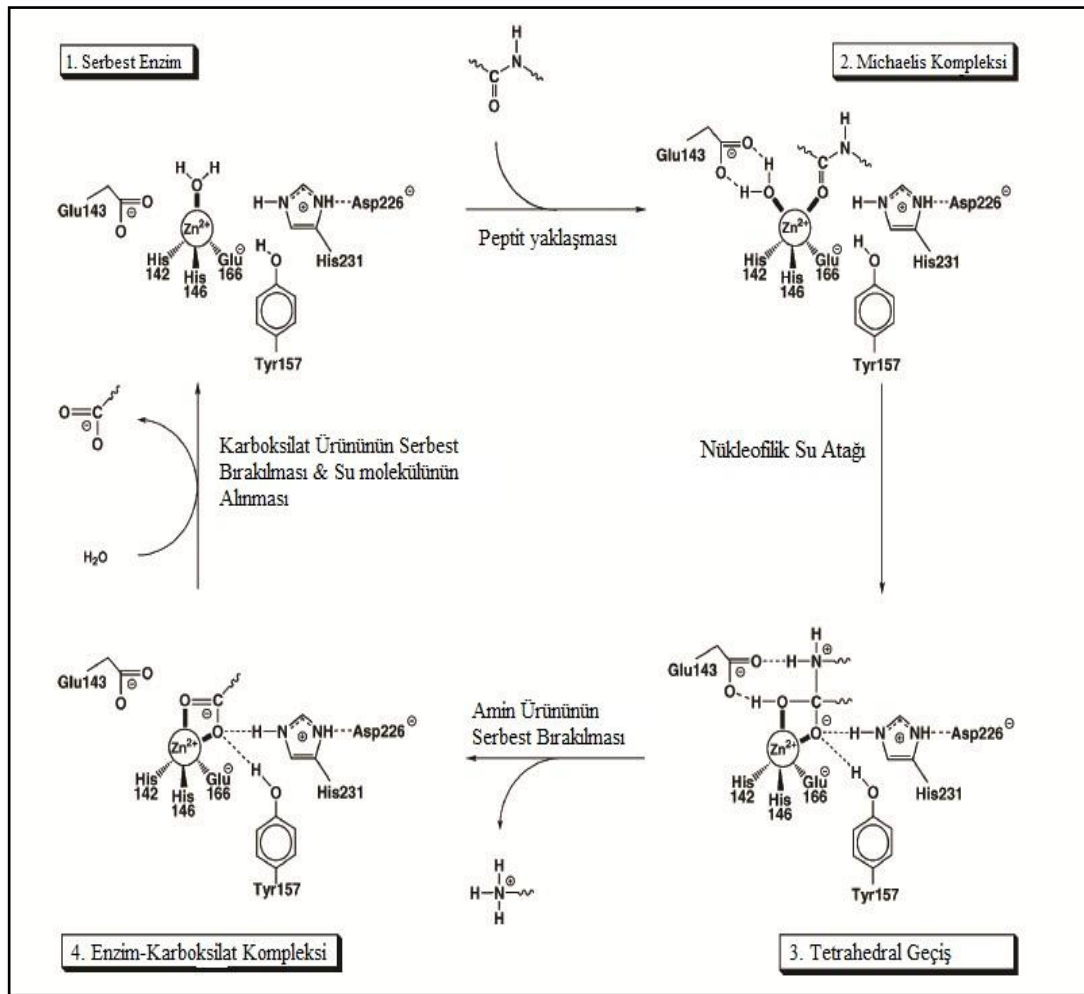
Alkali metallo proteazlar çok geniş bir spesifikite gösterirken, nötral metallo proteazlar hidrofobik amino asitlere karşı spesifikite gösterirler. *Myxobacter* I, ayrılan bağın her iki tarafındaki küçük amino asit kalıntılarına karşı spesifik iken, *myxobacter* II peptid bağının amino tarafındaki lizin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

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

Metallo proteazların mekanizması diğer tür proteazlardan oldukça farklıdır. Bir metallo proteaz olan termolisin yapısı Resim 2.3'de ve termolisin önerilen mekanizmalarından biri, Şekil 2.7'de verilmiştir.

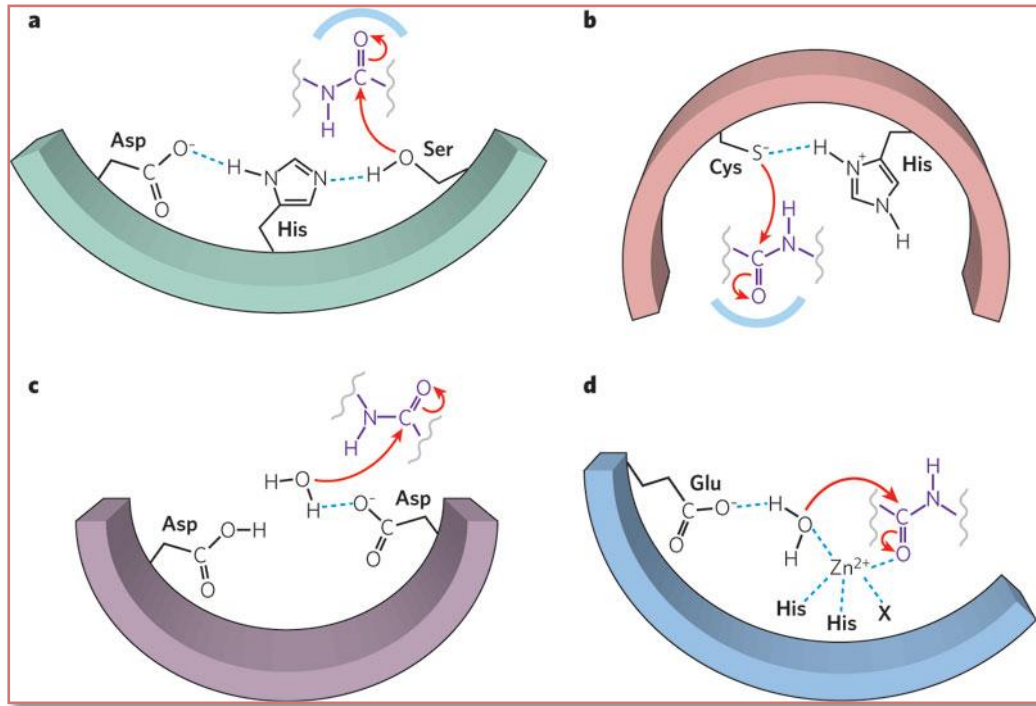


Resim 2.3. *B. thermoproteolyticus*'dan thermolisinin yapısı
(Merkezdeki büyük küre aktif bölgedeki Zn^{2+} iyonu,
dört küçük küre, moleküle bağlanan Ca^{2+} iyonları) [61]



Şekil 2.7. Bir metalo proteaz olan termolisinin reaksiyon mekanizması [71]

Proteazların 5 büyük katalitik sınıfı tetrahedral geçişlerini stabilize etmek için farklı katalitik mekanizmalar kullanırlar. Serin, treonin ve sistein tip proteazlarda katalitik nükleofil amino asit yan zincirinin reaktif gruplarından ya bir hidroksil grubu (serin ve treonin proteazlarda) ya da bir sülfhidril grubudur (sistein proteazlarda). Aspartil ve metalo proteazlarda ise nükleofil genellikle aktive edilmiş bir su molekülüdür. Aspartil proteazlarda su molekülü doğrudan aspartil kalıntısının yan zincirinden bağlanır. Metaloproteazda ise bir veya iki divalent metal iyonu su molekülünü belli bir konumda tutar. Yüklü amino asit yan zincirleri metal iyonları için bir ligandır [5]. Dört endoproteaz türünün mekanizmalarının özeti Şekil 2.8’de verilmiştir.



Şekil 2.8. Dört endoproteaz türüne ait mekanizmaların genel özeti
(a) serin proteaz, b) sistein proteaz, c) aspartil proteaz ve d) metalo proteaz) [72]

2.1.4. Proteaz enziminin kaynakları

Yaşayan bütün organizmalar proteazlara fizyolojik olarak gerek duydukları için, bu enzim bitkiler hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi kaynaklardan elde edilebilmektedir. Bundan dolayı proteazlar kaynağına göre, bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal olmak üzere üç farklı grupta incelenir.

Bitkisel Kaynaklar

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

Bilinen en güçlü bitkisel proteaz kaynakları; papaya (*Carica papaya*), ananas (*Anana sativa*), bazı *Ficus* türleri (*F. carica*, *F. glabrata*), enginar (*Cynera cardunculus*) ve soya fasulyesi (*Soya hispida*) dir [6].

Papain, vücudumuzda karbonhidrat ve yağlar gibi diğer bileşikler de etkileyerek tüm sindirim sistemini olumlu yönde düzenleme yeteneğine de sahiptir. Papaine, mide tarafından salgılanan ve proteinleri parçalayan enzim olan pepsine benzerliği nedeni ile bitkisel pepsin adı da verilir [73]. Papain bir sistein proteazdır ve enzimin performansı, yetiştirildiği iklimsel koşullara, bitki kaynağına, saflaştırılması ve ekstraksiyonu için kullanılan metotlara bağlıdır. Enzim pH 5-9 arasında aktiftir ve substrat varlığında 80 ya da 90°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda kararlıdır [6, 69].

Hayvansal Kaynaklar

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

Tripsin (EC 3.4.21.4), pankreasta salgılanan, ince bağırsakta proteinlerin sindiriminden sorumlu olan ana enzimdir. Tripsin bir serin proteazdır ve peptid bağlarını lizin ve arginin kalıntılarından sonra gelen karboksil gruplarından hidrolizler.

Tripsin öncelikle pankreasta inaktif formu olan tripsinojen (zimojen) halinde üretilir sonra ince bağırsağa salgılanır. Orada enteropeptidazlar proteolitik parçalanma yardımıyla tripsinin aktivasyonunu başlatır. Bu aktivasyon mekanizması pankreasın kendi kendini sindirmemesi için elzemdir ve çoğu serin proteazlar için geneldir. Tripsinin optimum pH'sı yaklaşık 8 ve optimum sıcaklığı da yaklaşık 37°C'dir. Böceklerin bağırsaklarındaki enzimler, enzim inhibitörleri tarafından inhibe edilebileceğinden tripsin enzimi zararlı haşaratın biyokontrolünde dikkatleri üzerine toplamaktadır [6, 73].

Kimotripsin, (EC 3.4.21.1) hayvansal pankreatik ekstraktlarında bulunan sindirim enzimidir. Bir serin proteazdır ve peptid bağlarını fenilalanin, tirozin ve triptofan kalıntılarından sonraki karboksil gruplarından hidrolizler.

Pepsin, (EC 3.4.23.1) gıda proteinlerini parçalamak için hemen hemen tüm omurgalıların midelerinde ana hücreler tarafından salgılanan asidik proteazdır. Keşfedilen ilk hayvansal enzimdir, ayrıca kristalize edilen ilk enzimler arasındadır. Aktif enzim, zimojen formu olan pepsinojenden HCl varlığında salınır. Pepsin bir aspartil proteazdır ve midenin pH'sı 2-4 arasındayken enzim pH 1-2 arasında optimum aktivite gösterir, pH 6'nın üzerinde inaktive olur ve iki hidrofobik amino asit arasındaki peptid bağlarının hidrolizini katalizler [6, 74].

Mikrobiyal Kaynaklar

Bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteazların bazı yetersizlikleri günümüz dünyasının mikrobiyal proteazlara olan ilgisini arttırmıştır. Mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamalar için neredeyse tüm karakteristik özelliklerinin istenen yönde değiştirilebilmesi mümkün olduğu için mikrobiyal kaynaklı proteazlar bitki ve

hayvansal kaynaklı proteazlara tercih edilmektedirler [6]. Mikrobiyal proteazlar enzimolojinin gelişiminden beri kapsamlıca çalışılan en önemli hidrolitik enzim grubudur [64] ve dünya enzim endüstrisinin % 40'ını oluşturmaktadır [59].

Fungal proteazlar pH 4-11 gibi geniş bir pH aralığında aktivite gösterirler. Bakteriyel kaynaklı enzimler ile karşılaştırıldıklarında daha düşük reaksiyon hızı ve daha düşük bir sıcaklık toleransına sahiptirler. Fungal enzimler katı hal fermentasyon prosesi ile üretilirler. Fungal asit proteazlar pH 4-4,5 arasında optimuma sahiptirler, pH 2.5-6 arasında kararlıdır. Dar pH ve sıcaklık spesifisitelerinden dolayı özellikle peynir yapımı endüstrisinde kullanılırlar. Fungal nötral proteazlar ya da metaloproteazlar, pH 7'de aktiftirler ve şelatlayıcı ajanlar tarafından inhibe olurlar. Peptidaz aktiviteleri ve hidrofobik amino asit bağlarının hidrolizindeki spesifik fonksiyonlarından dolayı besin protein hidrolizatlarının acılığının azaltılmasında kullanılırlar. Fungal alkali proteazlar ise gıda proteinlerinin modifikasyonunda kullanılırlar [6].

Viral proteazlar AIDS ve kanser gibi hastalıklara sebep olan virüs proteinlerinin prosesiyle fonksiyonel olarak ilgili olduklarından çok önemlidirler. 20 yıldan fazladır süren çalışmalar göstermektedir ki bir çok virüs bir veya daha fazla proteaz kodlamaktadır [75]. Serin, aspartil, ve sistein peptidazlar çeşitli virüslerde bulunmuştur. Virüs kodlu tüm peptidazlar endopeptidazdır, metalopeptidaz bulunmaz. Yapılan araştırmalarda viral proteazların üç boyutlu yapısı ve sentetik inhibitörler ile etkileşimi odak noktası olmuştur [6].

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

Ekstremofiller, volkanların yüksek sıcaklıklarında, kutupların düşük sıcaklıklarında, çok düşük ve çok yüksek pH değerlerinde (pH 0-3 veya pH 10-12) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5-30) yaşamak için adapte olmuş organizmalardır. Ekstremofiller ekstrem çevre koşullarına göre; termofiller, asidofiller, alkalofiller, psikrofiller, barofiller, halofiller ve diğerleri olarak sınıflandırılır. Sonuç olarak, bu mikroorganizmalar özellikle endüstriyel proseslerin gelişiminde kullanılabilen ekstrem koşullara dayanıklı biyokatalizörler üretirler [76-77].

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

2.1.5. Tez çalışmasında kullanılan *B. subtilis* M33 hakkında genel bilgi

Bacillaceae ailesine ait olan *Bacillus* cinsi, çubuk şekilli, endospor oluşturan, aerob veya fakültatif anaerob bakterilerden oluşur. Hücreleri, gram pozitif boyanır ancak bazıları kültür yaşına bağlı olarak gram negatif boyanabilirler. *Bacillus*'lar sporları nedeniyle biyosferde birçok farklı çevreden izole edilebilirler. Cinsin asıl habitatu çok çeşitli topraklardır.

Tez çalışmasında kullanılan *Bacillus subtilis* M33 suşu Miraç Yılmaz'ın 2003 yılında yaptığı doktora çalışmasında izole ettiği bir dizi *Bacillus* cinsinden biridir ve bu

çalışmadan temin edilmiştir. Çalışmada *Bacillus subtilis* M33 suşu Ankara'nın Ahlatlıbel toprağından (pH 8,33) izole edilip karakterize edilmiştir. *Bacillus subtilis* M33 izolasyonu ve tanımlanması çalışmalarında Nutrient sıvı ve Nutrient Agar besi ortamları kullanılmıştır. Proteolitik aktivite çalışmaları ise Skim Milk Agar'dan yararlanılarak gerçekleştirilmiştir. SMA besiyortamında *Bacillus subtilis* M33'ün proteolitik aktivite zon çapı $7,4 \pm 1,2$ bulunmuştur. Bakterilerin toplam protein profilleri SDS-PAGE ile belirlenmiştir [80].

2.1.6. Proteazların endüstriyel uygulama alanları

Mikroorganizmalardan elde edilen proteolitik enzimler dünya çapında deterjan endüstrisinde en fazla kullanım alanı bulan enzimlerdir. 2010 yılı için endüstriyel enzimlerin küresel piyasası yaklaşık 3,3 milyar dolar olarak tahmin edilmiştir. Novozymes'in açıkladığı rapora göre bu satışların %32'sini deterjan enzimleri oluşturmuştur [81-82].

Alkali proteazlar geniş pH ve sıcaklık aralıklarında stabil kalabilmesi, düşük değerlerde bile (%0,4-0,8) etkili olabilmesi, oksitleme ve ağartıcı ajanlarla birlikte kullanılabilmesi ve raf ömrünün uzun olmasından dolayı deterjan endüstrisi için ideal enzim grubudur [78]. Bir deterjan çözeltisindeki proteazın en iyi performansının anahtar parametresi enzimin pI'sıdır. Deterjan çözeltisinin pH'sı ile enzimin pI'sı birbirine uyumlu ise proteazın bu uygulama için çok uygun olduğu kabul edilir. Alkalofilik *Bacillus spp.* tarafından üretilen Esperase ve Savinase T (Novo Endüstrisi) çok yüksek izoelektrik noktaya sahip (pI 11) iki ticari proteazdır, dolayısıyla bu enzimler yüksek pH değerlerine dayanabilirler [6].

Deterjan endüstrisinde kullanılan proteazların büyük çoğunluğunu subtilisinler oluşturmaktadır. Subtilisinler yüksek sıcaklıklardaki kararlılıkları, yüksek substrat özgülükleri ve oldukça kısa sürede üretilebilmelerinden dolayı her türlü çamaşır ve bulaşık deterjanlarında kan, süt, yumurta gibi protein içerikli lekelerin giderilmesinde başarıyla kullanılmaktadır [83].

Deri sanayisinde en zorunlu operasyon derinin kıllarından arındırılmasıdır. Bu işlemin kimyasal maddeler ile yapılması ciddi anlamda kirlenmeye ve işçilerde sağlık sorununa neden olmaktadır. Proteazlar, tüy, deri ve boynuzların kullanılabilir biyokütleyle çevrilmesi amacı ile fibröz proteinlerin hidrolizlenmesinde kullanılmaktadır [18]. Derinin kıllarından arındırılmasında proteazların kullanılması kirlenmeyi ve sağlık sorunlarını da azaltmaktadır [84].

Proteazların bir diğer önemli kullanım alanı atık fotoğraf filmlerindeki jelatini hidroliz ederek içindeki gümüşü geri elde etmektir. Bu atık filmlerin jelatin tabakaları içinde yaklaşık %1,5-2 oranında gümüş bulunmaktadır ve gümüşün bu yolla geri kazanımı çok önemlidir [38, 78].

Tüm bunların haricinde proteazlar, fırın ürünlerinde, süt ve peynir üretiminde, bira endüstrisinde, kozmetik ve ilaç sanayinde oldukça çok kullanılmaktadır. Proteazların bazı kullanım alanları Çizelge 2.4’de verilmiştir.

Çizelge 2.4. Bazı proteazların kullanım alanları [61]

Enzimin Adı	Ticari Kullanımı
Pepsin A	Protein dizilimi
Kimosin	Peynir yapımı
Mucorpepsin	Peynir yapımı
Endotiyapepsin	Peynir yapımı
Phytpsın	Tohum taneciklerinin maltaştırılması
Omptin	Rekombinant füzyon proteinlerinin yıkımında spesifik endopeptidaz
Papain	Gıda prosesinde
Kimopapain	Kontakt lens temizliği, Kök hücre izolasyonu, bel fitiği tedavisi
Glisil Endopeptidaz	Protein dizilimi
Kök bromelain	Kan grubu tayini
Ficain	Kan grubu tayini
Ananain	Yanık debridmanı

Çizelge 2.4. (Devam) Bazı proteazların kullanım

Aminopeptidaz C	Peynir yapımı
Nuclear inclusion A	Rekombinant füzyon proteinlerinin prosesi
Pyroglutamil-peptidaz I	Protein diziliminde pyroglutamil gruplarının ayrılması
Mikrobiyal kolajenaz(<i>Vibrio</i> sp)	Doku hücresi ayrılması, yanık debridasyonu
Ecarin	Hematolojide laboratuvar kullanımı
Lysostaphin	Staphylococcal hücre duvarlarının liziz edilmesinde ajan olarak.
Bontoxilysin	Botoks olarak, Nöromüsküler fonksiyonun lokal felcinde terapötik kullanım
Deuterolysin	Soya sosunda tatlandırıcı
Glutamil Aminopeptidaz	Peynir olgunlaşması
Peptidil-Asp metaloendopeptidaz	Protein diziliminde reaktif
Kimotripsin A	Protein dizilimi, süt protein hidrozatlarından alerjenlerin uzaklaştırılması
Tripsin I	Protein dizilimi, Bakteriyal ortamların hazırlanması, deri prosesi.
Subtilisin Carlsberg	Ticari olarak kullanılan subtilisinin formları, Alcalase (<i>Bacillus licheniformis</i> 'ten), Esperase(<i>Bacillus</i> genuslardan) Maxatase (<i>Bacillus</i> 'lardan) ticari deterjanlarda. Alcalase, gıda endüstrisinde evcil hayvan yemi prosesinde de kullanılır.
Epiderm degrade eden endopeptidaz	Böceklerin ve zararlı pestisitlerin biyokontrolünde kullanılan organizmaların etkinliğinin ayarlanması
Karboksipeptidaz S1	Gıdaların lezzetini arttırmada.

2.2. Kaynak Araştırması

Ramakrishna ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada mezbağa toprağından izole edilen bir *Bacillus Subtilis* (KHS-1) den alkali proteaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ve sefadeks G- 200 kolonu adımlarını takip ederek 20,6 kat ve % 8,6 verimle saflaştırmışlardır. SDS-PAGE ve zimogram testi ile enzimin saflık kontrolünü yapmışlar ve moleköl kütlesini 20,5 kDa bulmuşlardır. Saflaştırılan enzimin optimum pH'sı 10,5 optimum sıcaklığı 55°C olarak tayin etmişlerdir. Araştırmacılar enzimin katalitik bölgesindeki grubu tayin etmek için PMSF ve EDTA inhibitörlerini kullanmışlar ve enzimin PMSF'yle tamamen inhibe olduğunu dolayısıyla serin proteaz olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin metal testinde Hg^{2+} , Zn^{2+} ve Al^{3+} ile inhibe olurken Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} ile aktivitesinin arttığını bulmuşlardır. Saf enzimin, kan lekesinin giderilmesinde, keçi kılının arındırılmasında ve x-ray filmi yüzeyindeki jelatinin degradasyonunda potansiyel uygulamalara sahip olduğunu yaptıkları testlerle vurgulamışlardır [9].

Rao ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada *Bacillus circulans*'dan saflaştırılan alkali proteazın deri işleme prosesi ve deterjan endüstrisindeki çevreye duyarlı uygulamalarını incelemişlerdir. Saf enzimin moleköl kütlesi 39,5 kDa bulunmuştur. Enzimin alkali koşullardaki optimum sıcaklığı 70°C olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda araştırmacılar enzimin herhangi bir kimyasal gereksinim olmadan kılları arındırabilmesi deri endüstrisinde, kan lekelerini giderebilmesi ise deterjan endüstrisinde kullanılabilirliğine bağlamışlardır [19].

Gahafoor ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada süs bitkisi fidanlığından izole edilen *Bacillus subtilis* EAG-2 den hücre dışı proteaz saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir. Saflaştırma adımları olarak, amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE sefaroza anyon değişim kromatografisi yollarını takip etmişlerdir. Sonuçta %29 verimle enzimi 11 kat saflaştırmışlardır. %10 luk SDS PAGE ile enzimin moleköl kütlesini 27 kDa bulmuşlardır. Saf proteazın optimum proteolitik aktivitesini pH 8,5 ve 65°C olarak tayin etmişlerdir. Kararlılık çalışmalarında ise 30-50°C arasında 1

saat boyunca aktivitesinin %80'nini koruduğunu ayrıca pH 6,5-9,0 arasında 4 saat boyunca stabil kaldığını gözlemlemişlerdir. PMSF inhibitörüyle enzimin neredeyse tamamen inhibe olmasını serin proteaz olmasına bağlamışlardır. Enzimin aktivitesinin Ca^{2+} , Zn^{2+} ve Ba^{2+} ve doğal substratlar varlığında artış gösterdiğini karakterize etmişlerdir [10].

Shah ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada, kontamine ham petrol örneklerinden izole ettikleri bakterilerden biri olan *Bacillus cereus* dan organik çözücüler, deterjanları ve okside edici ajanları tolere edebilen bir proteaz saflaştırmışlardır. Saflaştırmayı 3 adımda (amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE iyon değişim kromatografisi ve Sefadex Jel filtrasyon kromatografisi) yaklaşık %11 verimle 58 kat olarak gerçekleştirmişlerdir. Enzimin optimum pH'sını 8, sıcaklığını ise 60°C olarak kayıtlara geçmişlerdir. Enzimin Li^{+} , Ba^{2+} , K^{+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} metallere etkilenmediğini, ama Cr^{3+} , Hg^{2+} ve Cu^{2+} gibi ağır metaller varlığında inaktif olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca saf enzimin noniyonik deterjanlar (Triton X-100 ve Tween 80), okside ve ağartıcı ajanlar (hidrojen peroksit) varlığında kararlılığını koruduğunu rapor etmişlerdir. SDS PAGE yöntemi ile de enzimin molekül kütlesini 38 kDa olarak tayin etmişlerdir. Yaptıkları karakterizasyon çalışmalarıyla, saflaştırdıkları proteazın deterjan formülasyonunda, enzimatik peptit sentezinde, biotransformasyon reaksiyonlarında ve çürüme önleyici ajanların formülasyonlarında kullanılabileceği sonucuna varmışlardır [11].

Cho ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada meju'dan (Kore'nin geleneksel bir soya fasülyesi fermentasyonu başlatıcısı) *Bacillus amyloliquefaciens* FSE-68 bakterisini izole etmişler ve bu bakteriden hem nötral metaloproteaz (NPR68) hem de serin alkali proteazı (APR68) amonyum sülfat çöktürmesi ve Mono-S HR 5/5 kation değişim kromatografisi yollarını takip ederek saflaştırmışlardır. Metaloproteazın ve serin alkali proteazın molekül kütleleri sırasıyla yaklaşık 33 kDa ve 27 kDa ve yine saflaştırma basamakları sırasıyla %60,1 verim 7,1 kat, %66,8 verim 4,5 kat olarak rapor edilmiştir. Ayrıca saflaştırılan proteazların substrat spesifitlerini belirlemek için oksitlenmiş insülin A ve insülin B zincirleri substrat olarak kullanılmış ölçümler LC/MS ve MS/MS teknikleriyle alınmıştır [12].

Kumar C.G 2002 yılında yaptığı çalışmada, alkalofilik bir *Bacillus pumilis* MK6-5'i %1 peynir altı tuzu suyu, %0,25 mısır maserasyon sıvısı, %1 glukoz, %0,5 tripton, %1 sodyum sitrat, %0,02 MgSO₄.7H₂O, ve %0,65 Na₂CO₃ den oluşan ortam içerisinde pH 9,6 da 35°C 250 rpm çalkalama hızında 60 saat boyunca fermente etmiştir. Enzimi saflaştırmayı %80lik amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE sefaroz anyon değişim kromatografisi, CM sefaroz katyon değişim kromatografisi (2 defa) ve Sefarisil S-200 jel filtrasyon kromatografisiyle toplamda 5 adımda %26,2 verimle 36,6 kat olarak gerçekleştirmiştir. Saf enzimin molekül kütleini SDS PAGE ile yaklaşık 28 kDa bulmuştur. Enzimin optimum pH'sını 11,5 optimum sıcaklığını 55-60⁰ C olarak karakterize etmiştir. Enzimin Glu-Gly-Ala-Phe-pNA substratına karşı Km ve k_{cat} değerlerini sırasıyla 1,1 mmol l⁻¹ ve 624 s⁻¹, Glu-Ala-Ala-Ala-pNA substratıyla 3,7 mmol l⁻¹ ve 826 s⁻¹ olarak hesaplamıştır. Enzimin PMSF ile inhibe olması alkali serin proteaz olduğunu kanıtlamıştır. Sonuçta araştırmacı, saflaştırdığı enzimin kalsiyum bağımlı termostabil alkali serin proteaz olduğunu ve geniş pH'larda aktivite gösterebilmesi sayesinde ultrafiltrasyon membranlarının temizliğinde kullanışlı olabileceği yorumuna varmıştır [20].

Gessesse ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada, alkalafilik çevrede bulunan bir soda gölünden izole edip tanımladıkları *Nesternkonio* sp. (AL-20) ve *Bacillus pseudofirmus*, (AL-89) bakterilerinden proteaz saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Enzim üretimini tavuk tüyünün de içinde bulunduğu optimize bir ortamda gerçekleştirmişlerdir. Saflaştırma adımlarını sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi, hidrofobik etkileşim ve jel filtrasyon kromatografisi izlemiştir. *Nesternkonio* sp.den saflaştırdıkları proteazın molekül kütleini 23 kDa ve *Bacillus pseudofirmus*den saflaştırılanı ise 24 kDa bulmuşlardır. AL-20 enziminin pH 7,5 ile 11,5 arasında kararlılığının yaklaşık %90'nını koruduğunu ve optimum pH'sının 10 olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca diğer serin proteazlardan farklı olarak saflaştırdıkları enzimin termostabilitesinin Ca²⁺ bağımlı olmadığına işaret etmişlerdir. Ama AL-89 enziminin Ca²⁺ bağımlı olduğunu optimum pH'sının 11 sıcaklığının ise 60°C olduğunu tayin etmişlerdir. Saflaştırdıkları enzimlerin tüylerin mikrobiyal ve enzimatik hidrolizinde ilginç bir

potansiyele sahip olduğunu ve sonucun hayvan yemi olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir [16].

Joo ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada *Bacillus clausii* I-52 den bazı oksidantlara ve SDS'ye karşı stabil alkali proteaz üretmişlerdir. Saf enzimin optimum pH'sının 11 optimum sıcaklığını 60°C bulmuşlardır. Enzimin %5lik SDS ile 72 saat sonunda %75'in üzerinde aktivitesini koruması, %10'luk H₂O₂ ile 72 saat sonunda aktivitesinin %110'a çıkması çalışmanın öne çıkan noktasıdır. Araştırmacılar saflaştırdıkları bu enzimin geniş pH ve sıcaklık aralığında etkin olması, SDS gibi anyonik yüzey aktif maddelerini ve peroksitler ve perboratlar gibi oksidantları tolere edebilmesinden ötürü deterjan formülasyonlarına önerilebileceğinden bahsetmişlerdir [21].

Rahman ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa* tür K'dan organik çözücülerle stabil bir alkali proteaz saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve anyon değişim kromatografisiyle 124 kat saflaştırmışlardır. SDS-PAGE ile saf enzimin molekül kütlesini 51 kDa olarak bulmuşlar ve enzimin alkali bir metaloproteaz olduğunu inhibitörler vasıtasıyla tespit etmişlerdir. Enzimin optimum pH'sını 10, sıcaklığını ise 70°C olarak kayıtlara geçmişlerdir. Saf enzimin organik çözücüler varlığında kararlılığını koruduğunu tespit etmişlerdir. 14 gün inkübasyondan sonra, 1-dekanol, izooktan, dekan, dodekan ve heksadekan varlığında enzim aktivitesinde artış olduğunu bulmuşlardır [22].

Gasparin ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada, *Myrothecium verrucaria*'dan kümes hayvanları tüyünü degrade edebilen etkili bir proteaz saflaştırmışlar ve saf enzimi karakterize etmişlerdir. Enzim saflaştırma Sefadeks G-100 jel filtrasyon kromatografisiyle tek adımda % 62 verimle gerçekleştirilmiş ve saf enzimin spesifik aktivitesi 12851,8 U/mg olarak kayıtlara geçmiştir. Enzimin monomerik yapıda ve yaklaşık 22 kDa olduğunu tespit etmişlerdir. Saf enzimin pH 5-12 arasında geniş bir aktiviteye sahip olduğu ve optimum pH'sının 8,3 olduğunu tayin etmişlerdir. Enzimin kümes hayvanı tüylerini degrade edip amino asit ve

çözünebilir peptitler açığa çıkarmada % 80,3 etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Enzimin herhangi bir kimyasala ihtiyaç duymadan β -keratin hidrolizleyebildiğini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, günümüzde büyük bir çevre sorunu olan kümes hayvanı tüylerinin degrade edilmesinde saflaştırdıkları proteazın kullanışlı olabileceği yorumuna varmışlardır [23].

Dodia ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları çalışmada Hindistan'nın doğusundaki Saurashtra sahilinden izole edilen haloalkalifilik bir bakteriden (EU118361) alkali proteaz saflaştırmışlardır. Saflaştırma fenil sefroz 6 FF kromatografisiyle %28 verimle tek adımda gerçekleşmiştir. Enzimin molekül kütlesi SDS-PAGE ile 40 kDa olarak tayin edilmiştir. Enzimin optimum pH'sının 9-11 arasında olduğu bulunmuştur. Enzim 0-4 M NaCl konsantrasyonunda stabil iken, 37°C de optimum kataliz için 150 mM NaCl'ye gereksinildiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte artan sıcaklıklarda optimum kataliz için tuza gerek duyulduğu belirtilmiştir. NaCl'nin enzimin sadece sıcaklık profilini arttırmadığını substrat afinitesini de etkilediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca enzimin kalsiyum bağımlı olduğunu ve 2 mM Ca^{2+} varlığında, 50 °C'de enzim aktivitesinin maksimuma ulaştığını tayin etmişlerdir. Enzim aktivitesinin PMSF ile inhibe olduğunu ve dolayısıyla enzimin serin proteaz ailesine mensup olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca enzim aktivitesinin Tween-80 ve Triton X-100 varlığında kısmen arttığını, SDS varlığında ise kısmen azaldığını tespit etmişlerdir [24].

Yadav ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa*'dan fenil sefroz CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisiyle proteaz enzimini %28 verim ile 1,2 kat saflaştırmışlardır. Enzimin molekül kütlesi ESI kütle spektroskopisiyle 36,18 kDa olarak tespit edilmiştir. Enzimin optimum sıcaklığı 40°C olarak tayin edilmiş ve pH 5-8 arasında aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Saflaştırılan enzimin, EGTA, fosforamidon ve fenantrolin inhibitörleri varlığında aktivitesini neredeyse tamamen kaybetmesi enzimin metalloproteaz olduğunu göstermiştir [25].

Shankar ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada, hayvan gübresinden bir mantar kültürü izole etmişler ve yeni bir *Beauveria sp* MTCC 5184 türü olarak tanımlamışlardır. Bu mantardan pH 9 ve 50°C de aktif bir proteaz saflaştırmışlardır. Saflaştırma işlemi %38,6 verimle ve spesifik aktivitede 10,2 katlık bir artışla tamamlanmıştır. Enzimin molekül kütlesi 29 kDa ve izoelektrik noktası 9,3 olarak tespit edilmiştir. Enzimin N-ucu dizilimi subtilisin benzeri proteazlara benzerlik göstermektedir. Enzimin 40°C üzerindeki sıcaklıklarda ve pH 3-11 arasında kararlılığını koruduğunu gözlemlemişlerdir. Enzimin Cd^{2+} , Hg^{2+} ve Mn^{2+} ile tamamen inhibe olduğu bulunmuştur. Enzim 1 mM PMSF ile de inhibe olmaktadır ve bu serin proteaz olduğuna işaretir. Saflaştırılan proteaz kazein substratıyla maksimum aktivite göstermekte ve bunu hemoglobin ile BSA takip etmektedir. Saf proteazın endotelial hücreleri ayırabileceğini ve hayvan hücresi kültürlerinde kullanılabileceğini vurgulamışlardır [26].

Sookkheo ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları çalışmada, *Bacillus stearothermophilus* TLS33'den S, N ve B kodlu üç farklı kuvvetli termostabil proteaz saflaştırmışlardır. Saflaştırma, lizin afinite kromatografisi, Q hyperD kuvvetli anyon değişim kromatografisi ve Ultrigel AcA44 jel filtrasyon kromatografisiyle gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan enzimlerin molekül kütleleri SDS-PAGE ve zimografi ile sırasıyla 36, 53 ve 71 kDa bulunmuştur. Termostabil proteaz S lizin afinite kolonuna kuvvetle bağlanmış ve tek adımda saflaştırılabilmiştir. Proteazların optimum pH'ları sırasıyla 8,5, 7,5 ve 7 olarak tayin edilmiştir. S,N ve B proteazlarının sırasıyla 72°C, 78°C ve 90°C da 5 mM $CaCl_2$ varlığında 30 dakika sonunda aktivitelerinin yarısını koruduğunu tespit etmişlerdir. 3 termostabil proteaz da metal şelatörü olan EDTA tarafından kuvvetlice inhibe olmuş ve $ZnCl_2$ ve 1,10 fenantrolin ilavesi ile aktivite yeniden kazanılmıştır. Bu, enzimlerin Zn^{2+} metaloproteaz olduğunu göstermiştir [55].

Divakar ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada endüstriyel atıklardan izole edilen ve mezofilik bir bakteri olan *Aeromonas veronii* PG01'in hücre dışı termostabil ve organik çözücülerini tolere edebilen proteaz ürettiğini tespit etmişlerdir. Hücre çoğalması ve proteaz üretimi için optimum koşulların nutrient broth

besiyerinde pH 7 ve 30°C olduğunu vurgulamışlardır. Amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi yollarını takip ederek proteazı sonuçta 53 kat saflaştırmışlardır. Ayrıca jel filtrasyon kromatografisini enzimin molekül kütesini tespit etmek için de kullanmışlar ve saf proteazın molekül kütesini 67 kDa olarak bulmuşlardır. SDS-PAGE ile enzimin 33 kDa'luk iki altbirim içerdiğini tespit etmişlerdir. Enzimin pH 6-10 arasında aktif olduğunu ve optimum pH'sının 7,5 olarak belirlemişlerdir. Saf proteazın optimum pH'sı ise 60°C olarak kayıtlara geçmiştir. Enzimin, benzenle inkübasyondan sonra kararlılığını koruduğunu ve hatta n-heksan ve n-dodekan organik çözücüleri ile proteolitik aktivitenin sırasıyla 1,3 ve 1,5 kat arttığını tayin etmişlerdir. Proteaz, EDTA gibi inhibitörlerle inhibe olurken PMSF gibi serin proteaz inhibitörlerinden etkilenmemiştir. PG01 proteazın mol başına 1,901 mol çinko içerdiği induktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektroskopisi ile analiz edilmiştir [27].

Cheng ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada alkali topraklardan hücre dışı alkali proteaz üreten *Bacillus alcalophilus* TCCC11004 türünü izole etmişlerdir. Proteaz üretimi için çeşitli konsantrasyonlarda maltodekstrin, maya ekstraktı, pamuk tohumu unu, K_2HPO_4 , trisodyum sitrat ve $CaCl_2$ içeren ortamı geliştirmişlerdir. Alkali proteaz TC4, amonyum sülfat çöktürmesi, Sefadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ve SP-Sefaroz iyon değişim kromatografisiyle %15,2 verimle 6,8 kat saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ile proteazın molekül kütesini yaklaşık 26 kDa bulunmuştur. Araştırmacılar enzimin optimum pH'sını 11, optimum sıcaklığını 50°C olarak tayin etmişler ve $CaCl_2$ varlığında saf proteazın termostabilitesinin arttığını tespit etmişlerdir. Saflaştırılan proteazın diizopropil florofosfat ve fenilmetilsülfonil florit ile inhibe olmasını enzimin katalitik bölgesinde serin grubu içermesine bağlamışlardır. Proteaz %0,5lik SDS varlığında kararlılığını 1 saat koruyabilmiştir. Ayrıca enzim Triton X-100 ve H_2O_2 okside edici ajanı varlığında da kararlılığını sürdürebilmektedir [28].

Son zamanlarda karides endüstrisinde karides atıklarındaki artış, araştırmacıları karides atıklarının yok edilebilmesi için yeni metodlar arayışı içine sokmaktadır. Manni ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada, *Bacillus cereus* SV1'den hücre dışı,

organik çözücülerini tolere edebilen ve oksidantlarla stabil bir metaloproteaz üretmişlerdir. Besi yerinde karides atığı tozu, karbon kaynağı olarak kullanılırsa aktivitenin maksimumuna (5900 U/ml) ulaştığını tespit etmişlerdir. Ham enzimin 60 gün boyunca %50 dimetilsulfoksit (DMSO) ve etil eterle 30°C de inkübasyonunda aktivitede hiç kayıp olmadığı görülmüştür. Ayrıca proteazın, anyonik (SDS), ve noniyonik (Tween 80, Tween 20 ve Triton X-100) yüzey aktif maddelerine karşı da oldukça stabil olduğu hatta okside edici ajanlar varlığında aktivitesinde önemli derecede bir artış olduğu tayin edilmiştir. Sonuçta üretilen bu özelliklerdeki enzimin deterjan formülasyonları, enzimatik peptit sentezi ve karides artıklarının kitin üretimi için deprotenizasyonunda ideal olduğu yorumuna varmışlardır [29].

Zambare ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada, solucan gübresinden izole ettikleri *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327'den kılların arındırılmasında kullanılabilir proteaz saflaştırmışlar ve kısmen karakterize etmişlerdir. Optimum proteaz aktivitesinin soya fasulyesi ve tripton'un bulunduğu ortamda pH 7 ve 30°C şartlarında maksimuma ulaştığı gözlenmiştir. Ham enzimin native-PAGE'deki zimogramında 56 ve 67 kDa'luk iki bant gözlenmiş ve her iki bandın da kıllardan arındırma aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Enzimin optimum pH'sı 8 ve optimum sıcaklığı 35°C olarak kayıtlara geçmiştir. Proteaz aktivitesinin spesifik inhibitörlere karşı kuvvetlice inhibe olmadığını tespit etmişlerdir. Enzimin substrat spesifitesinin kinetik çalışmaları sonucunda *P. aeruginosa* MCMB-327 'den saflaştırılan proteazın deri endüstrisindeki kılların arındırılması çalışmalarında çevreye duyarlı uygulamalara sahip olabileceği vurgulanmıştır [30].

Toyokawa ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada fermente Tayland balık sosundan (yerel bir fermentör) izole ettikleri sıcaklık tolere edebilen *Bacillus licheniformis* RKK-04'den %18 verimle 80 kat saflaştırdıkları proteolitik enzimin molekül kütlesini 31 kDa ve izoelektrik noktasını 9,3den büyük olarak bulmuşlardır. Enzimin optimum pH'sı 10, optimum sıcaklığı ise 50°C olarak tayin edilmiştir. Enzimin inhibitörle muamelesi sonucunda saflaştırılan proteazın subtilisin benzeri serin alkali proteaz olduğu belirlenmiştir. Proteazın yüksek tuz konsantrasyonlarında (%30 NaCl) bile aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir. Ayrıca balık proteinin

miyozin ağır zinciri bu enzimin verdiği reaksiyonla tamamen parçalanmaktadır. Dolayısıyla araştırmacılar *Bacillus licheniformis* RKK-04 den saflaştırılan, tuz tolere edebilen proteazın balık sosu fermentasyonunda anahtar enzim olduğu yorumuna varmışlardır [13].

Tanskul ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada, Phang Nga Tayland'dan toplanan yarasa pisliğinden izole edilen *Bacillus sp.* PN51den bir alkali serin proteinaz saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Enzimin molekül kütlesi yaklaşık 35 kDa olarak tespit edilmiştir. N-ucu amino asit dizilimi %70 *Natrialba magadii* halosin benzeri hücre dışı serin proteaz gibidir. Enzim maksimum proteinaz aktivitesini 60°C ve pH 10,0 da göstermektedir. Enzim kimostatin ve PMSF varlığında kuvvetlice inhibe olmuştur. Proteinaz aktivitesi %2 üre, %2 H₂O₂, %12 SDS, %15 Triton X-100 ve %15 Tween 80 varlığında etkilenmemiştir. Z-Val-Lys-Met-MCA substratı için k_{cat} , K_m , ve k_{cat}/K_m değerleri sırasıyla $16,8 \pm 0,14 \text{ min}^{-1}$, $5,1 \pm 0,28 \mu\text{M}$ ve $3,3 \pm 0,28 \mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ olarak bulunmuştur [31].

Olajuyigbe ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları çalışmada, fermente keçiyoynuzundan izole ettikleri 35 tane *Bacillus* türünden çeşitli biyokimyasal testlerle karakterize ettikleri ve proteolitik aktivite gösteren *Bacillus licheniformis* Lbbl-11'den hücre dışı proteaz üretilen bazı özelliklerini incelemişlerdir. Fermentasyon ve proteaz üretimi nutrient broth besi yeri içerisinde 150 rpm çalkalama hızında 37°C de 18 ile 72 saat arasında gerçekleştirilmiş ve maksimum aktiviteye 48. saatte ulaşıldığı gözlenmiştir. Enzimin optimum sıcaklığı 60°C optimum pH'sı 8,0 olarak bulunmuştur. Enzimin 60°C ve 70°C da 1 saatlik inkübasyon sonucunda kararlılığının yarısından fazlasını koruduğu tespit edilmiştir. Ayrıca proteazın pH 5.0-11.0 aralığında oldukça stabil olduğu görülmüştür [14].

Bhaskar ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada balık prosesi atık sularından izole ettikleri *Bacillus proteolyticus* CFR3001 den alkali proteaz üretmiştir. Hücre çoğalması ve proteaz üretimi, optimum koşullar olan nutrient broth besi yeri içerisinde 37°C da 96 saat boyunca pH 9 da 100 rpm çalkama hızında gerçekleştirilmiştir. Saf proteazın kısmi karakterizasyonu enzimin 40-50°C da aktif

olduğunu ve 60°C civarında aktivitesinin %20'den fazlasını kaybettiğini göstermiştir. Enzimin molekül kütlesinin yaklaşık 29 kDa olduğu ve *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* ve *Yersinia enterocolytica* gibi patojenik organizmanın büyümesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. SEM sonuçları da enzimin bu patojenik bakterilerin hücrelerini parçaladığını göstermiştir [32].

Kazan ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmada, *Bacillus clausii* GMBAE 42 den proteince zengin bir besi yeri ortamında 3 gün pH 10,5 da 37°C de serin alkali proteaz üretmişlerdir. Enzim homojenattan, amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE selüloz iyon değişim kromatografisiyle 16 kat %58 verimle saflaştırılmıştır. Enzimin molekül kütlesi SDS-PAGE ile 26,50 kDa bulunmuştur. Enzimin optimum sıcaklığı 60°C ve optimum pH'sı 11,3 olarak kayıtlara geçmiştir. Enzimin %1 (w/v) Tween-20, Tween-40, Tween-60, Tween-80 ve %0,2 (w/v) SDS varlığında 30°C 1 saat boyunca stabil kaldığını rapor etmişlerdir. Enzimin kimotripsin benzeri serin proteaz olduğunu ve N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA için K_m ve k_{cat} değerlerinin sırasıyla 0,655µM ve $4,21 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ olduğunu bildirmişlerdir [18].

Adinarayana ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada, yeni izole edilmiş bir *Bacillus subtilis* PE-11den termostabil serin alkali proteazı saflaştırıp kısmen karakterize etmişlerdir. Saflaştırma; amonyum sülfat çöktürmesi ve Sefadeks G-200 jel filtrasyon kromatografisiyle iki adımda, 21 kat ve %7,5 verimle gerçekleşmiştir. Enzimin en çok aktif olduğu sıcaklık ve pH 60°C ve 10,0 olarak bulunmuştur. Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} ile enzimin kuvvetlice aktive olduğunu bildirmişlerdir. Enzimin PMSF ve DFP gibi inhibitörlerle kuvvetlice inhibe olduğunu, EDTA inhibitöründen etkilenmediği ve β-merkaptolanol ile kısmen inhibe olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca saf proteazın 10mM CaCl_2 ve 1 M glisinle birlikte kan lekesinin giderilmesinde etkin olduğunu tespit etmişler ve dolayısıyla deterjan formülasyonunda kullanılabileceği yorumuna varmışlardır [33].

Uchida ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları bir çalışma, Vietnam'a özgü bir balık sosundan izole edilen *Bacillus subtilis* CN2 tarafından üretilen proteazı saflaştırıp bazı özelliklerini incelemişlerdir. Proteaz saflaştırması %75 amonyum sülfat

çöktürmesi, DEAE sefadeks, CM-sefadeks iyon değişim kromatografisi ve Sefadeks G-100 jel filtrasyon kromatografisiyle 4 adımda gerçekleşmiştir. Enzimin moleköl kütlesi 27,636 Da, optimum pH 10.0 ve optimum sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur [15].

Beg ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada, *Bacillus mojavensis*'den oksidantlara karşı stabil, tiyol bağımlı bir serin proteaz saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığı 60°C, optimum pH'sı 10,5 bulunmuştur. Saflaştırma için Q-sefaroze kolon kromatografisi kullanılmıştır. Cu^{2+} ve Mn^{2+} gibi metallerin enzim aktivitesini %36'nın üzerinde arttırdığı tespit edilmiştir. Proteazın, jelatin, elastin, albumin, hemogloblin ve yağsız süt gibi doğal substratları hidrolizeleyebildiğini dolayısıyla deterjan katkı maddesi olarak uygun olabileceğini vurgulamışlardır [34].

Rai ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada, *Bacillus subtilis* DM-04'den saflaştırdıkları organik çözücülerle stabil alkali serin proteazın (Bsubap-I) moleköl kütlesinin 33,1 kDa, optimum sıcaklık ve pH aralığının ise sırasıyla 37-45°C ve 10-10,5 olarak rapor etmişlerdir. Bsubap-I enziminin aktivitesinin Fe^{2+} varlığında önemli derecede arttığını tespit etmişlerdir. Bsubap-I'in yüzey aktif maddeler, deterjanlar ve organik çözücüler varlığında termal direnci kararlılığı ve kıllardan arındırma aktivitesi, bu enzimin deterjan formölasyonlarında, ultrafiltrasyon membranlarının temizliğinde, peptit sentezinde ve deri endüstrisinde uygulanabilir olabileceğini göstermiştir [35].

Pawar ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada, *Bacillus sp.* 158'den kısmen saflaştırdıkları enzimi karakterize edip, kontakt lenslerin temizliğindeki uygulamalarını araştırmışlardır. Saflaştırdıkları proteazın optimum pH'sı 7.0, sıcaklığı ise 30°C olarak kayıtlara geçmiştir. Yaptıkları deneyler sonucunda, enzimin kontakt lenslerin geçirgenliğini potansiyel olarak arttırmasını, proteazın, protein kalıntılarının etkili bir şekilde uzaklaştırılmasına bağlamışlardır [85].

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Kullanılan Kimyasallar

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

3.2. Kullanılan Mikroorganizma

Tez çalışmasında kullanılan *Bacillus subtilis* M33 Miraç Yılmaz'ın 2003 yılında yaptığı izolasyon çalışmasından temin edildi [80].

3.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar

- Hassas Terazî (Denver Instrument)
- Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter 64R)
- Manyetik Karıştırıcı (Chiltern Hotplate HS31)
- pH metre (Hanna Instrument pH300)
- No Frost Buzdolabı (Ariston)
- Derin dondurucu (Bosch, -40⁰ C)
- Spektrofotometre (UV-1700 Shimadzu PharmaSec.)
- Kromatografi Kolonu (Bioplot Pharmacia FPLC)
- Elektroforez Tankı (Bio-Rad Protean Ilxi Cell)
- Vorteks (FISONS)
- Çalkalamalı İnkübatör (Shel-Lab)
- Otoklav (Alp)
- Çalkalamalı Su Banyosu (Clifton)
- Otomatik pipetler (Ependorf)

3.4. *Bacillus subtilis* M33'ün Çoğaltılması ve Proteaz Üretimi

Nutrient Agar katı besiyerinde +4°C'de saklanan *Bacillus subtilis* M33; 121°C'de 1,5 atmosfer basıncında 15 dakika sterilize edilip, pH'sı 7±1,1 de tutulan Nutrient Broth (pepton 5,0 g/L; et ekstraktı 3,0 g/L, MgCl₂) sıvı besiyerine 200 ml ortam içeren 1000 ml'lik erlenler halinde ekildi (Resim 3.1). *Bacillus subtilis* M33'ün fermentasyonu 37°C'de, 180 rpm çalkalama hızında 24-26 saat süresince gerçekleştirildi [78, 80].



Resim 3.1. 37⁰C'de 24-26 saat fermente edilen *B. subtilis* M33

3.5. *Bacillus subtilis* M33'den Alkali Proteaz Enziminin Saflaştırılması

Fermentasyon sonrasında *Bacillus subtilis* M33 + 4°C 13000 g'de 10 dakika santrifüjlenerek hücre izolatlarının ortamdaki uzaklaşması sağlandı. Ham ekstraktın toplam protein miktarı kısım 3.7'de anlatılan Bradford yöntemiyle belirlendi. Ham ekstraktın proteaz aktivitesi ise kısım 3.6'da anlatılan yöntemle göre tayin edildi.

3.5.1. Amonyum sülfatla çöktürme

Homojenatta, %10 ile %90 arasında 10-30, 30-50, 50-70 ve 70-90 olacak şekilde amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda, çökelekte ve süpernatantta enzim aktivitesine kısım 3.6 anlatılan yöntemle göre

bakıldı. %10-30 aralığında kayda değer bir aktiviteye rastlanmadı. Aktivitenin pik yaptığı aralıklar toplandı ve enzimin %35-80 aralığındaki çökelekte maksimum aktivite gösterdiği belirlendi. Belirlenen aralık için gerekli amonyum sülfat miktarı tartılıp homojenata ilave edildi ve magnetik karıştırıcının düşük devrinde buz banyosu içerisinde 1 saat boyunca karıştırıldı. Tuzlu homojenat, +4 °C'de gece boyu bekletildi. Bekletilen sıvı, 15000 g'de 20 dakika +4 °C'de santrifüjlendi ve çökelti 50mM pH 9,0 glisin-NaOH tamponuyla mümkün olan en düşük hacimde çözüldü. Elde edilen çözelti por çapı 14000 Da olan diyaliz torbalarına konuldu ve aynı tampona karşı gece boyu diyalizlendi. Amonyum sülfatla presipite edilip diyalizlenmiş enzim örneğinin aktivite testi kısım 3.6'da anlatıldığı yapıldı. Örneğin toplam protein miktarı ise kısım 3.7'de anlatılan Bradford yöntemine göre belirlendi [20, 36].

3.5.2. DEAE selüloz anyon değişim kromatografisi

1,6×20 cm'lik DEAE (dietilaminoetil) selüloz kolonu, kolon hacminin 5 katı miktarda 50 mM pH 9,0 glisin-NaOH tamponunun geçirilmesiyle dengelendi (Resim 3.2).

Dengelenmiş olan DEAE selüloz anyon değiştirici kolona, %35-80 amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak gece boyu tamponda diyalizlenmiş örnek yüklendi. 32 ml örnek, 3ml/min akış hızında kolondan elüe edildi ve fraksiyonlar 90 saniye aralıklarla toplandı. 1 M NaCl eşliğinde lineer gradient uygulandı ve tuz 50. dakikadan itibaren geçirilmeye başlandı. Fraksiyonlardaki protein miktarı kısım 3.7'de anlatıldığı gibi 280 nm'de ölçüldü, fraksiyonlara kısım 3.6'da anlatıldığı gibi enzim aktivitesi testi uygulandı ve aktivite gösteren fraksiyonlar toplanarak enzim havuzu oluşturuldu. Toplanan fraksiyonlardaki toplam protein miktarı kısım 3.7'de anlatılan Bradford yöntemiyle belirlendi.



Resim 3.2. Bioplot Pharmacia FPLC ve fraksiyon kollektörü

3.6. Proteolitik Enzim Aktivitesinin Tayini

Proteaz aktivitesi, Takami ve ark. (1989) daha önce rapor ettikleri yöntemin kısmen modifiye edilmesiyle belirlendi. Seyreltik 500 µl enzim örneği çözeltisi, 50mM pH 9,0 glisin-NaOH tamponunda hazırlanmış %0,6 (w/v) 2500 µl kazein çözeltisi ile karıştırıldı ve 30 °C'lik su banyosunda 100 rpm'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda, tüpteki karışıma TCA çözeltisi (0,11 M trikloroasetik asit, 0,22 M sodyum asetat ve 0,33 M asetik asit) ilave edildi ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek reaksiyonun durması sağlandı. Daha sonra karışım 5000 g'de +4 °C'de 5 dakika santrifüjlendi ve filtrattan 500µl alınarak üzerine 2500 µl 0,5 M Na₂CO₃ çözeltisi ve %50 (v/v) 0,5 ml Folin-Ciocalteau çözeltisi eklendi. Karışım oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi ve daha sonra absorbans değerleri 660 nm'de köre karşı (50 mM pH 9,0 glisin-NaOH tamponu) ölçüldü. Enzim aktivitesi daha önce oluşturulmuş tirozin standart grafiğinin eğimi yardımıyla hesaplandı. Bir ünite proteaz enzimi aynı şartlarda 1 µg min⁻¹ tirozin açığa çıkartan enzim miktarı olarak tanımlandı [86].

3.7. Warburg & Christian ve Bradford Yöntemleriyle Protein Miktarı Tayini

Kromatografi işlemleri sonunda kolondan alınan elüsyonların protein tayini Warburg & Christian yöntemine göre yapıldı. Bu yöntemde 280 ve 260 nm'de absorbanslar alınıp sırasıyla 1,5 ve 0,76 düzeltme katsayılarıyla çarpılıp birbirinden çıkarılır. Bu metodun esası, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan fenilalanin, triptofan ve tirozinin maksimum absorbans göstermelerine dayanır [50].

Kromatografi işlemleri dışındaki tüm adımlarda protein tayini Marion M. Bradford'un 1976'da önerdiği, Coomassie Blue G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinde değişik şiddette mavi renk ortaya koymasına yönelik yöntemle gerçekleştirildi. Coomassie G-250 boyası fosforik asitli ortamlarda proteinlere bağlanır ve oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbans verir. Coomassie G-250 boyasının 2 dakika gibi kısa bir sürede proteine bağlanıp renk vermesi, 1 saat stabil kalabilmesi ve bazı katyonların varlığında kararlılığını koruması yöntemin avantajları arasındadır [87].

Çalışmanın her aşamasında protein miktarının tayin edilebilmesi için standart protein olarak sığır serum albuminin kullanıldığı bir standart grafik hazırlandı. 0,2 mg/ml standart serum albumin çözeltisinden, 15, 30, 60, 90, 120 µl alınarak saf su ile 2400 µl'ye tamamlandı. Her bir tüpe 600 µl Coomassie Blue reaktifinden eklendi. Kör olarak ise 2400 µl saf su üzerine 600 µl Coomassie blue reaktifi eklenmesiyle hazırlanan çözelti kullanıldı. 595 nm'de köre karşı absorbansları okundu ve okunan değerlerle standart grafik hazırlandı. Protein miktarı tayin edilirken ise, protein miktarı bilinmeyen numuneden 150 µl alınıp, saf su ile 2400 µl'ye tamamlandı ve üzerine 600 µl Coomassie Blue reaktifi eklendi. 5 dakika içerisinde 595 nm dalga boyunda köre karşı okundu ve protein miktarı yukarıda bahsedildiği gibi hazırlanan kalibrasyon grafiğinin eğiminden yararlanılarak hesaplandı [88].

3.8 *Bacillus subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enziminin karakterizasyonu

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

Saflaştırılan enzimin molekül kütesi ve saflık kontrolünün tespiti için ham ekstrakt, amonyum sülfatlaama sonrası örnek ve DEAE selüloz kolonundan elüe edilen enzim havuzu, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde yürütüldü [89].

Ayırma Jelinin Hazırlanması (%10)

Literatür bilgileri ışığında [19], enzimin molekül kütesine göre en uygun jel konsantrasyonun %10 olduğu tespit edildi ve ayırma jeli (50 ml) bu konsantrasyona göre hazırlandı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. %10'luk 50 ml ayırma jelinin hazırlanışı

dH ₂ O	19,8 ml
%30 poliakrilamid karışımı	16,7 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	12,5 ml
%10 SDS	0,5 ml
%10 amonyum persülfat (APS)	0,5 ml
TEMED	0,02 ml

İlk dört madde ilave edildikten sonra, katalizör olarak TEMED ve APS'nin eklenmesiyle polimerizasyon başlatıldı. Jelin döküleceği cam plakaların son derece temiz olmasına dikkat edilerek yaklaşık 16-20 cm yükseklikten jel dolduruldu. Bu jelin polimerizasyonu için 90 dakika beklendi. Bu sırada %4,5 (v/v) 10 ml örnek yükleme jeli hazırlandı (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Örnek yükleme jelinin (% 4,5) hazırlanışı

dH ₂ O	6.1 ml
0,5 M Tris-Cl, pH:6.8	2,5 ml
Akrilamit % 30	1,3 ml
SDS %10	0,1 ml
APS	0,05 ml
TEMED	0,005 ml

Hazırlanan bu jel ayırma jeline eklendi ve uygun bir tarak yavaşça jele yerleştirildi. Bu polimerizasyon için ise yaklaşık 60 dakika beklendi. Bu sırada numuneler hazırlandı.

Numunelerin Elektroforez için Hazırlanması

Ham Ekstrakt örneği, amonyum sülfatla presipite edilip diyalizlenmiş örnek ve DEAE selüloz kolonundan alınan örneklerin belli miktardaki hacimleri denatürasyon çözeltilsinin (5 ml %25 gliserol, 5 ml %10 SDS, 5 ml merkaptotanol, 2,5 ml pH 6,8 Tris-HCl tamponu, 12 ml H₂O, bromofenol mavisi) 25 µl'si ile karıştırılıp kaynayan suda 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra örnekler ve markerlar kuyucuklara tatbik edilip 350 V 200 miliamperde örnekler yürütüldü. Yürütme (running) tamponu ise 14,4 g glisin, 3 g Tris ve 1 g SDS'in 1 litre suda çözülmesiyle hazırlandı. Yaklaşık 4 saatlik yürütmeden sonra jel tanktan çıkarıldı ve fiksasyon aşamasına geçildi (Resim 3.3).



Resim 3.3. Örneklerin %10'luk SDS-PAGE'de yürütülmesi

Gümüş boyama Tekniği ile Jellerin Boyanması

Dikkatlice çıkartılan jel, Çizelge 3.3’de belirtilen aşamalardan geçirilerek gümüş boyama tekniği ile boyandı.

Çizelge 3.3. Örneklerin gümüş boyama tekniği ile boyanma prosedürü

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

Marker olarak 14,2 kDa (laktoalbumin), 29 kDa (karbonik anhidraz), 45 kDa (ovalbumin) ve 66 kDa (bovin serum albumin) içeren protein standart karışımı (Sigma-Aldrich, USA) kullanıldı.

3.8.2. Proteaz enziminin molekül kütlelerinin jel filtrasyon kromatografisiyle belirlenmesi

Amonyum sülfatla presipite edilip diyalizlenmiş örnekten 10 ml alınıp 50 mM glisin-NaOH ile dengelenmiş Superdex 75 jel filtrasyon kolonundan (2,6×60 cm) 3 ml/min akış hızında elüe edildi. Elüatlar, 90 saniye aralıklarla toplandı. Fraksiyonlara kısım

3.6'da belirtildiği gibi proteaz aktivitesi testi uygulandı ve kromatogram yardımıyla da enzimin kaçınıcı tüpte ve dakikada geldiği tespit edildi. Ayrıca moleköl kütleleri belli protein standartları da kolondan aynı şekilde elüe edildi ve elüe oldukları süreye göre bir standart grafik hazırlandı. Bu standart grafik yardımıyla enzimin moleköl kütleleri yaklaşık olarak hesaplandı [27].

3.8.3. Saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH ve pH kararlılığının belirlenmesi

Bacillus subtilis M33'den saflaştırılan proteazın optimum pH'sının belirlenmesi için, 500 µl seyreltik enzim çözeltisi ile pH 4,0 ile 12,0 arasındaki tamponlarda hazırlanan %0,6 (w/v) 2500 µl kazein çözeltisi karıştırıldı ve kısım 3,6'da belirtildiği gibi aktivite tayini yapıldı. pH 4,0, 5,0 için 50 mM sodyum asetat tamponu, pH 6,0 ve 7,0 için potasyum fosfat tamponu, pH 8,0 için 50mM Tris –HCl tamponu, 9,0, 10,0, 11,0, 12,0 için ise 50 mM glisin-NaOH tampon sistemi hazırlandı. Enzimin optimum pH'sını tayin etmek için çizilen grafikte en yüksek aktivitenin olduğu pH değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer değerler de buna göre konumlandırıldı [17, 36].

Enzimin pH kararlılığını belirlemek için, 100 µl enzim çözeltisi ile 400 µl farklı pH'larda hazırlanmış tamponlar karıştırıldı ve oda sıcaklığında 3 saat pre-inkübasyona bırakıldı. 3 saat sonunda, her bir pH için aktivite tayini kısım 3.6'da belirtildiği gibi yapıldı. Ayrıca, saflaştırılan enzimin ileri sürelerdeki pH kararlılığının belirlenmesi adına, yukarıda anlatılan enzim tampon karışımları 1 hafta boyunca da oda sıcaklığında inkübe edildi ve her 24 saatte bir aktivite tayini yapıldı. İnkübasyon öncesinde ölçülen aktivite değerleri 100 olarak kabul edildi inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi olarak verildi [17].

3.8.4. Proteaz enziminin optimum sıcaklığının ve sıcaklık kararlılığının belirlenmesi

Bacillus subtilis M33'den saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için 500 µl seyreltik enzim çözeltisi ile 50 mM pH 9,0 glisin-NaOH tamponunda hazırlanan %0,6 (w/v) 2500 µl kazein çözeltisi karıştırıldı ve 20–80°C aralığındaki su banyolarında 20 dakika inkübasyona bırakılıp her bir sıcaklık değeri için kısım 3.6'da belirtilen yöntemle göre aktivite tayini yapıldı. Enzimin optimum sıcaklığını tayin etmek için çizilen grafikte en yüksek aktivitenin olduğu sıcaklık değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer değerler de buna göre konumlandırıldı [17].

Enzimin sıcaklık kararlılığını belirlemek içinse, 50 µl enzim çözeltisi 950 µl 50 mM pH 9,0 glisin-NaOH tamponuyla seyreltildi ve 40°C de 3 saat inkübasyona bırakıldı ve her 30 dakikada bir kısım 3.6'da belirtildiği gibi aktivite tayini yapıldı. 50°C ve 55°C'de ise 2 saat inkübasyona bırakıldı ve her 15 dakikada bir aktivitesine bakıldı. 60°C'de ise 1 saat inkübasyona bırakıldı ve 10 dakikalık periyotlarla aktivite tayini yapıldı. 70°C de ise yarım saat inkübasyona bırakıldı ve her 5 dakikada bir aktivitesi ölçüldü. Sıcaklık kararlılığı grafiği çizilirken, inkübasyondan önceki değerler 100 olarak kabul edildi ve inkübasyon sonrasında elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi olarak konumlandırıldı [36].

3.8.5. Bazı metal iyonlarının saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesine etkisinin belirlenmesi

Bacillus subtilis M33den saflaştırılan proteaz enziminin bazı metal iyonlarının varlığında aktivitesindeki durumu incelemek adına bir dizi test yapıldı. Bunun için, tek değerlikli metal iyonlarından K^+ ve Na^+ , iki değerlikli metal iyonlarından; Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Sn^{2+} ve ayrıca Fe^{3+} , Al^{3+} iyonları denendi. Mg^{2+} ve Zn^{2+} 'nin sülfatlı diğer tüm metallerin klorürlü tuzları kullanıldı ve 50 mM pH 9,0 glisin-NaOH tamponuyla son konsantrasyonları 2 ve 5mM olacak şekilde çözeltileri hazırlandı. 50 µl seyreltik enzim çözeltisi hazırlanan çözeltilerin 450 µl'si ile karıştırılıp oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. İçinde metal iyonu

bulundurmayan bir örnek ise “kontrol” olarak aynı şartlarda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında aktivite tayini kısım 3.6’da anlatıldığı gibi yapıldı. İnkübasyondan sonra kontrol numunesinin aktivitesi 100 olarak alındı ve diğer örneklerin aktivitesi kontrol grubuna göre konumlandırıldı [22, 36].

3.8.6. Bazı organik çözücülerin saflaştırılan proteaz enzimi kararlılığına etkisinin belirlenmesi

Bacillus subtilis M33’den saflaştırılan proteaz enziminin bazı organik çözücüler varlığında aktivitesindeki durum tayin edildi. Bunun için organik çözücüler olarak 1,0 ml DMSO (dimetil sulfoksit) , etanol, aseton, benzen, n-Butanol, heptan, oktanol, toluen, metanol, asetonitril ve 2-propanol 3,0 ml seyreltik enzim çözeltisiyle 30⁰ C’de 100 rpm çalkalama hızında 1 saat inkübe edildi. İçinde organik çözücü bulundurmayan bir örnek ise “kontrol” olarak aynı şartlarda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kısım 3.6’da belirtilen yöntemle göre aktivite tayini yapıldı. İçinde organik çözücü bulunmayan kontrol numunesinin aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğer örneklerin bağıl aktiviteleri buna göre konumlandırıldı [22].

3.8.7. Saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlarla spesifitesinin belirlenmesi

Bacillus subtilis M33’den saflaştırılan proteaz enziminin bazı substratların varlığındaki aktivitesinin tayini için; kazein, sığır serum albumini (BSA), ovalbumin (yumurta albumini), jelatin ve soya fasulyesi unu 50 mM pH 9,0 glisin-NaOH tamponunda, %0,6 (w/v) konsantrasyonda hazırlandı. 2500 µl substrat çözeltileri, 500 µl seyreltik enzim çözeltisiyle karıştırıldı ve kısım 3.6’da belirtilen yöntemle göre aktivite tayini yapıldı. En yüksek aktivite gösteren substratın (kazein) aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğer substratlarla ölçülen aktiviteler buna göre konumlandırıldı [36].

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

Bacillus subtilis M33'den saflaştırılan proteaz enziminin katalitik bölgesinde hangi grubun yer aldığını tespit etmek amacıyla enzim; serin proteaz inhibitörü olan PMSF (2 ve 5 mM), metaloproteaz inhibitörü olan EDTA (2 mM ve 5 mM) ile 2-merkaptoetanol ve DTT (ditiyoteritol) inhibitörleri ile test edildi. PMSF haricindeki inhibitörlerin çözeltileri 50 mM pH 9,0 glisin-NaOH tamponunda hazırlandı. PMSF'nin stok çözeltisi ise %96 (v/v) etanol çözeltisinde hazırlanıp son konsantrasyonu 2 ve 5 mM getirildi. 2-merkaptoetanol %0,1(v/v) konsantrasyonunda hazırlandı. Seyreltik proteaz enzimi hazırlanan inhibitör çözeltileriyle 1:1 oranında karıştırılıp 30°C de 1 saat inkübe edildi. İnhibitör bulunmayan kontrol numunesi de aynı şartlarda inkübe edildi ve inkübasyon sonrası örnekler kısım 3.6'da anlatıldığı gibi aktivite testi uygulandı. İçinde inhibitör bulunmayan kontrol numunesinin aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğer örneklerin aktiviteleri buna göre konumlandırıldı.

Bacillus subtilis M33'den saflaştırılan proteaz enziminin sodyumdodesil sülfat (SDS), gibi anyonik yüzey aktif maddeleri, Triton X-100, Tween-80 gibi noniyonik yüzey aktif maddeleri, H₂O₂ (hidrojen peroksit) gibi okside edici ajanlar varlığında aktivitesini belirlemek amacıyla %0,2 (w/v) SDS, %1 (v/v) Triton X-100, %1 (v/v) Tween-80 ve %5 (v/v) H₂O₂ hazırlanıp seyreltik enzim çözeltisiyle 1:1 karıştırıldı. Örnekler 30°C de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler kısım 3.6'da anlatıldığı gibi proteolitik aktivite testi uygulandı. Kontrol numunesinin aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğer örneklerin aktiviteleri buna göre konumlandırıldı [34].

3.8.9. Çeşitli endüstriyel deterjanların proteaz enzimi aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi

Bacillus subtilis M33'den saflaştırılan proteaz enziminin Bingo (Hayat Kimya, İstanbul), Ariel (Procter&Gamble), Tode Matik (ABC, İstanbul), Art (Beyaz Kağıt, Adana), OMO (Unilever, Kocaeli), Tursil (Henkel) gibi endüstriyel deterjanlar varlığında aktivitesinin durumu tayin edildi. Bunun için, bahsedilen markalara ait deterjanların %1 (w/v) konsantrasyonlarındaki çözeltileri çeşme suyunda hazırlandı. Enzim çözeltisi, hazırlanan deterjan çözeltileriyle karıştırıldı ve 30°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İçinde deterjan çözeltisi bulundurmeyen bir örnek ise aynı şartlarda "kontrol" olarak inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kısım 3.6'de belirtilen yöntemle göre aktivite tayini yapıldı. Kontrol numunesinin aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğer örneklerin aktiviteleri buna göre konumlandırıldı [52]

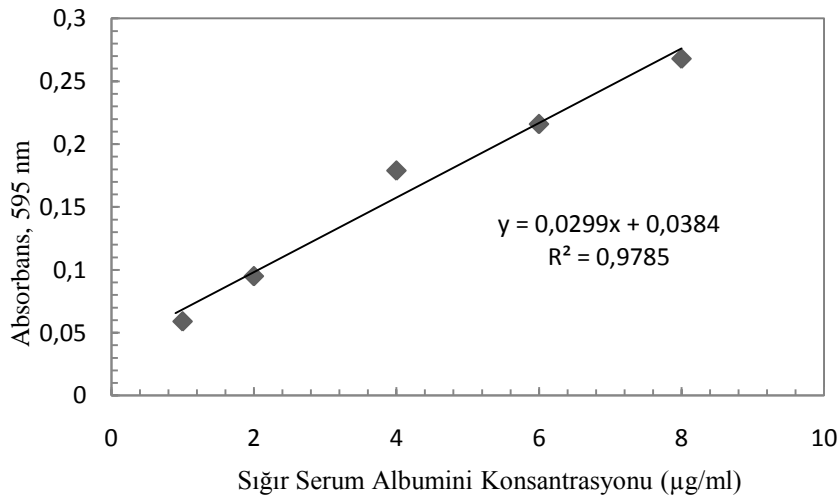
3.8.10. *Bacillus subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratıyla Michealis Menten kinetik parametrelerinin belirlenmesi

Bacillus subtilis M33'den saflaştırılan proteaz enziminin Michealis Menten kinetik parametreleri (V_{maks} ve K_m) substrat olarak kazeinin pH 9,0'da 50 mM glisin-NaOH tamponunda, 30°C'de 0,1–2 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarında hazırlanan örnekleriyle tayin edildi. Enzim substrat çözeltisi, 30°C su banyosunda 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kısım 3.6'de anlatıldığı gibi aktivite tayini yapıldı. Enzimin başlangıç hızlarının resiprokal değerlerine karşı ($1/V$) başlangıç substrat konsantrasyonlarının resiprokal değerleri ($1/[S]$) Lineweaver-Burk grafiğine yerleştirilerek K_m ile V_{maks} sabitleri bu grafik doğrultusunda hesaplandı [90].

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini için Hazırlanan Standart Eğri

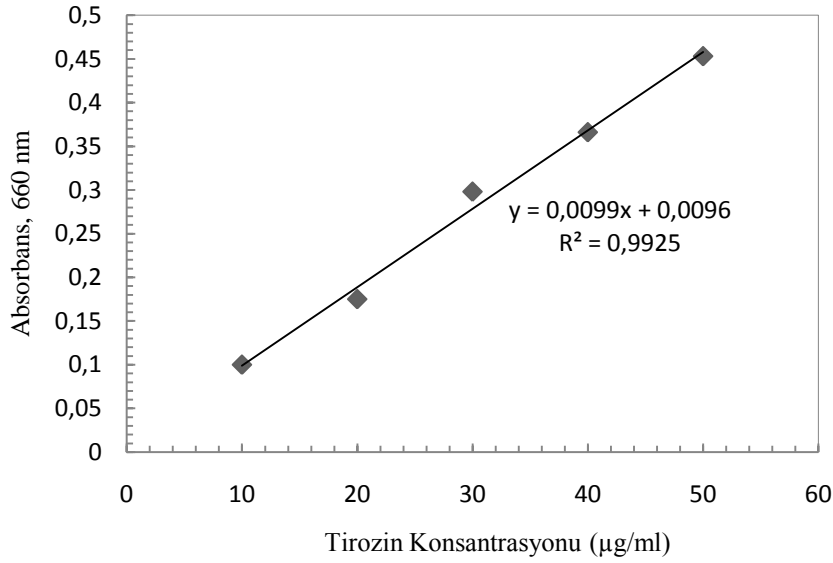
Araştırma boyunca protein tayini sığır serum albuminin standart olarak kullanıldığı Bradford yöntemiyle yapıldı. Tayine ait standart eğri, Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Protein tayininde kullanılan standart grafik

4.2. Aktivite Testlerinde Yararlanılan Tirozin Standart Eğrisi

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



Şekil 4.2. Tirozin standart grafiği

4.3. *Bacillus subtilis* M33'den Proteaz Enziminin Saflaştırılması Sonuçları

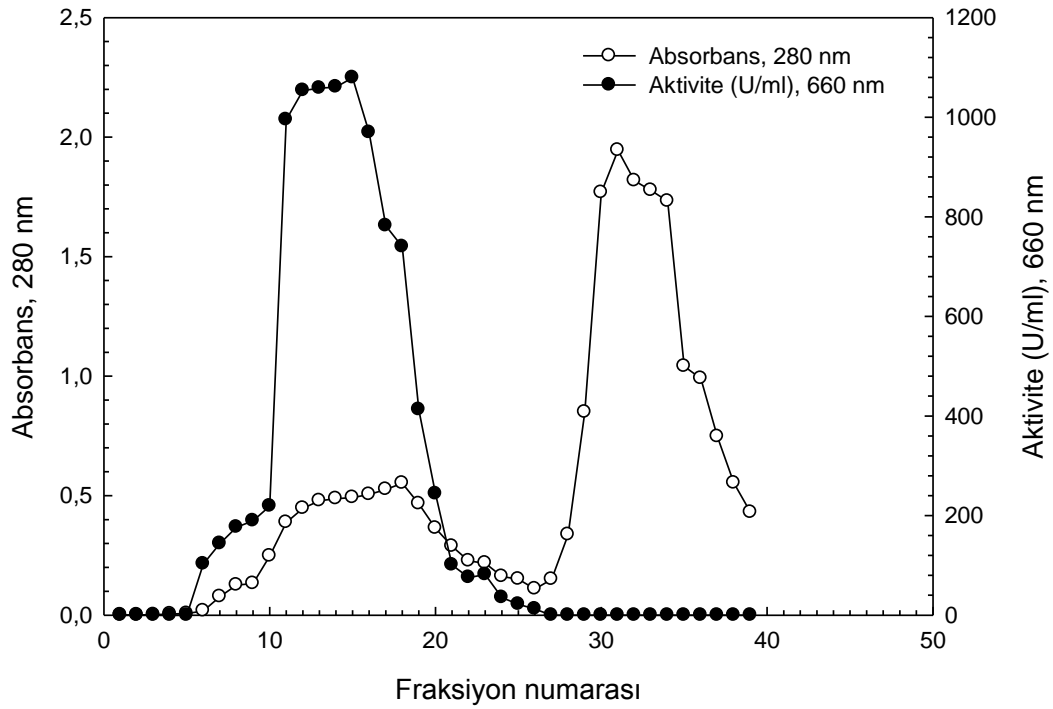
4.3.1. İlk adım: amonyum sülfat çöktürmesi

Bacillus subtilis M33'den proteaz enzimi saflaştırılması ilk olarak amonyum sülfat çöktürmesi ile gerçekleştirildi. Belirlenen %35-80 konsantrasyonunda amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve çökelekler pH 9,0 glisin-NaOH tamponunda çözülüp gece boyu aynı tampona karşı +4°C'de diyalizlendi. Diyalizlenen örneğe kısım 3.6'da anlatıldığı gibi proteaz aktivitesi testi uygulandı. Saflaştırma adımlarına ait sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi ham ekstrat, amonyum sülfat çöktürmesi neticesinde %53 verimle 2,51 kat saflaştırılmış oldu.

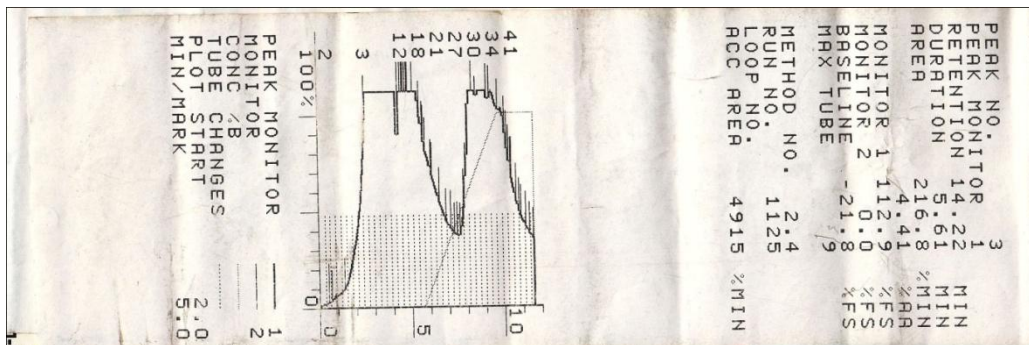
4.3.2. İkinci adım: DEAE selüloz iyon değişim kromatografisi

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

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



Şekil 4.3. *B. subtilis* M33'den DEAE selüloz iyon değişim kromatografisiyle saflaştırılan proteaz enziminin aktivite-absorbans grafiği



Şekil 4.4. Kromatografi cihazından elüsyon sonucu alınan kromatogram

Çizelge 4.1. *B.subtilis* M33 kaynaklı proteazın saflaştırılma basamakları sonuçları

Saflaştırma Adımı	Hacim (ml)	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim %	Saflaştırma K.sayısı
Ham Ekstrat	585	67567	149,55	451,80	100,0	1,0
%35-80 (NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi	32	36139	31,84	1135,01	53,49	2,51
DEAE İyon değişim kromatografisi	27	26125	3,73	7040	38,66	15,50

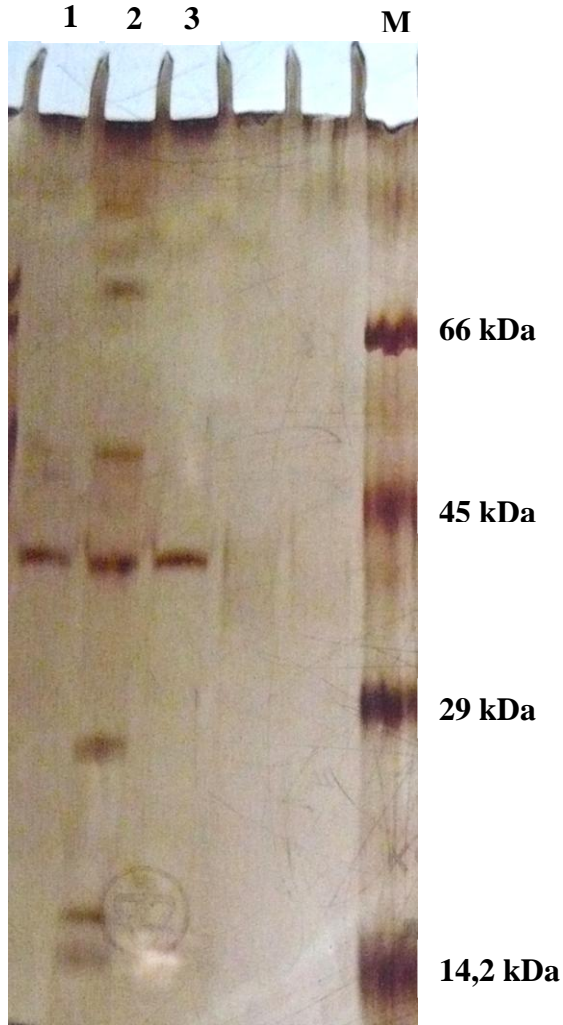
DEAE selüloz iyon değişim kromatografisi sonucunda proteaz enzimi %38,66 verimle ham örneğe göre 15,50 kat saflaştırıldı. Kromatografi işlemi sonucundaki toplam aktivite 26125 U, enzimin spesifik aktivitesi ise 7040 U/mg olarak tayin edildi (Çizelge 4.1).

4.4. *Bacillus subtilis* M33'den Saflaştırılan Proteaz Enziminin Karakterizasyonu

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

B.subtilis M33'den saflaştırılan proteaz enziminin molekül kütlesinin ve saflık kontrolünün tespiti için ham ekstrakt örneği, amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından diyalizlenmiş örnek ve DEAE selüloz kolonundan alınan örnekler ve bazı protein markerları %10'luk sodyum dodesilsülfat poliakrilamit jel elektroforezinde koşturuldu. Sonuçta jel, gümüş boyama ile boyandı ve protein markerlarının çıkış noktalarına göre saflaştırılan enzimin molekül kütlesi tespit edildi. Ham ekstrakt örneğinde(1) ve amonyum sülfatlanıp diyalizlenmiş örnekte(2) birden fazla bant

gözlenirken, DEAE selüloz kolonundan alınan örnekte tek bant görülmektedir. Bununla birlikte enzimin molekül ağırlığının 29-45 kDa arasında ve yapılan hesaplamalar sonucunda yaklaşık 39 kDa olduğu tespit edildi. Bahsedilen SDS-PAGE ait jel görüntüsü Resim 4.1’de gösterilmiştir.

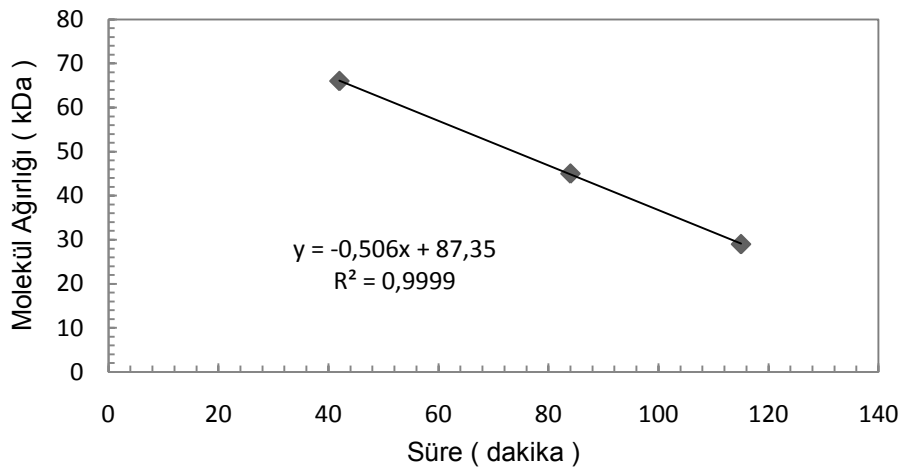


Resim 4.1. Enzimin %10’luk SDS-PAGE görüntüsü

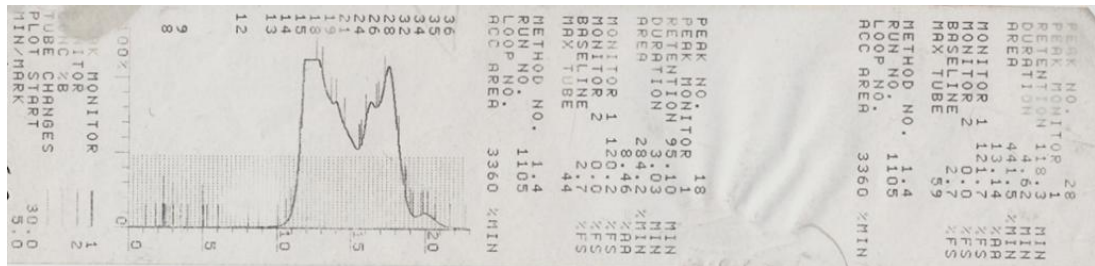
(1 numara ham ekstrakt, 2 numara amonyum sülfatla çöktürülüp Diyalizlenmiş örnek, 3 numara anyon değişim kromatografisiyle saflaştırılmış örnek ve M standart proteinler)

4.4.2. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlesi tayini

Superdex 75 jel filtrasyon kolonundan öncelikle protein standartlarını (Karbonik anhidraz; 29 kDa, ovalbumin; 45 kDa, Bovin serum albumin; 66 kDa) içeren marker 3 ml/dakika akış hızında elüe edildi ve standart grafik oluşturuldu. Standart grafik, şekil 4.5'te verilmiştir. Daha sonra, molekül kütlesi tespit edilecek olan kısmen saflaştırılmış enzim örneği aynı şartlarda kolondan elüe edildi. Fraksiyonlarda enzim aktivitesine bakıldı ve sonuç standart proteinlerle karşılaştırıldı. Enzim örneğinin aynı şartlarda kolondan elüsyonuna ait kromatogram Şekil 4.6'da verilmiştir. Grafiğe göre enzimin molekül kütlesi SDS PAGE yönteminde olduğu gibi yaklaşık 39 kDa olarak tespit edildi.



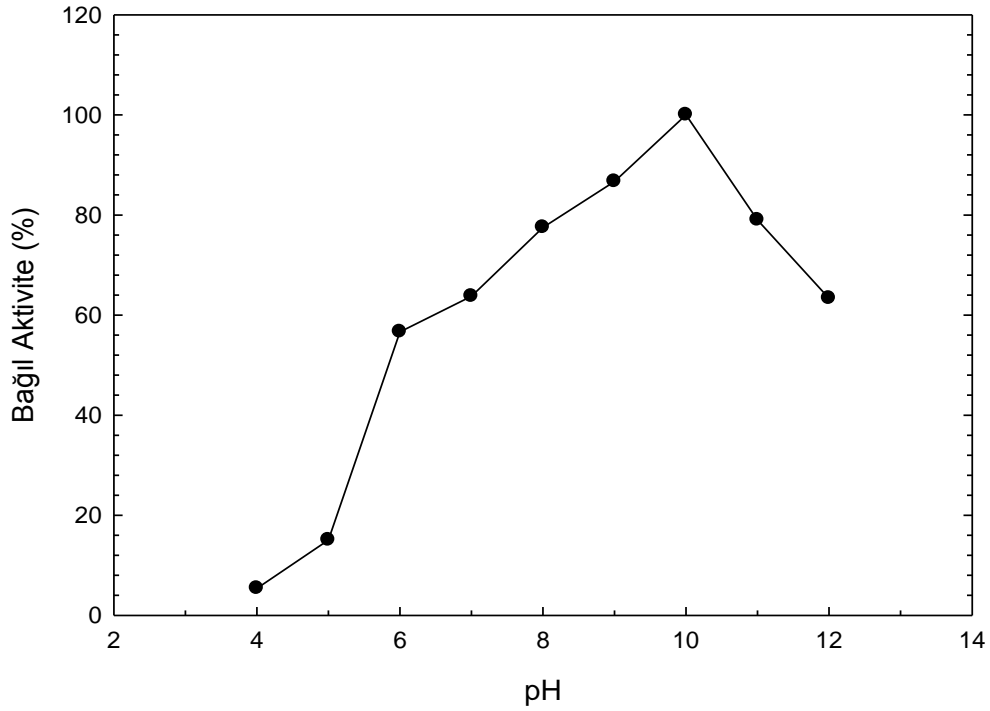
Şekil 4.5. *B.subtilis* M33'den saflaştırılan enzimin jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği



Şekil 4.6. Kısmen saflaştırılmış proteazın jel filtrasyon kolonundan alınan kromatogram

4.4.3. *Bacillus subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enziminin optimum reaksiyon pH'sı sonuçları

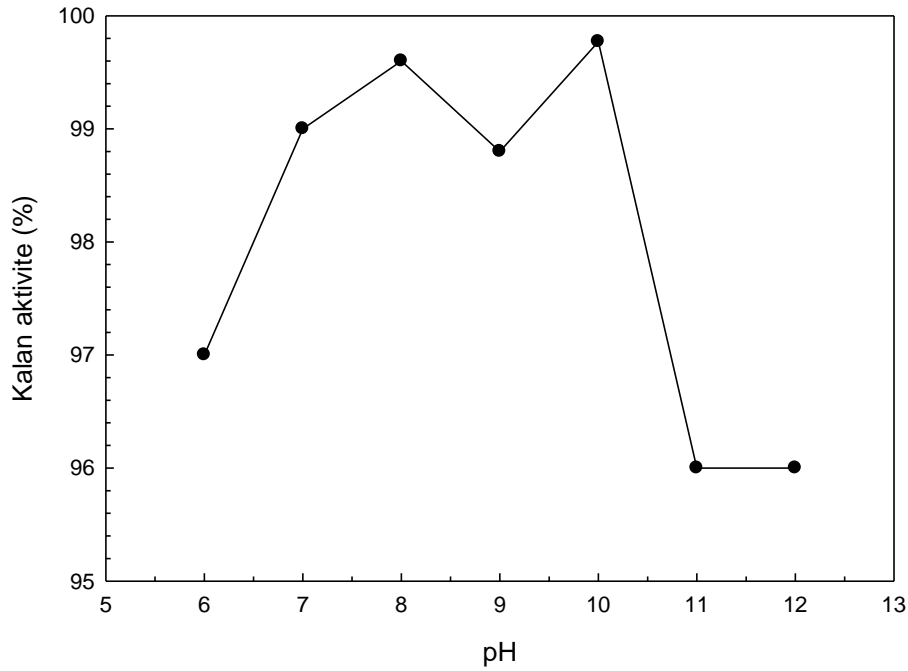
Proteaz enzimlerinin deterjan sanayinde kullanılabilmeleri için alkali pH'larda yüksek ve kararlı aktiviteler göstermeleri gerekir. *Bacillus subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enzimi için çeşitli tamponlarda pH 4,0'den 12,0'ye kadar geniş bir aralıkta aktivite tayini yapıldı ve enzimin en yüksek aktiviteyi pH 10,0'da gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.7).



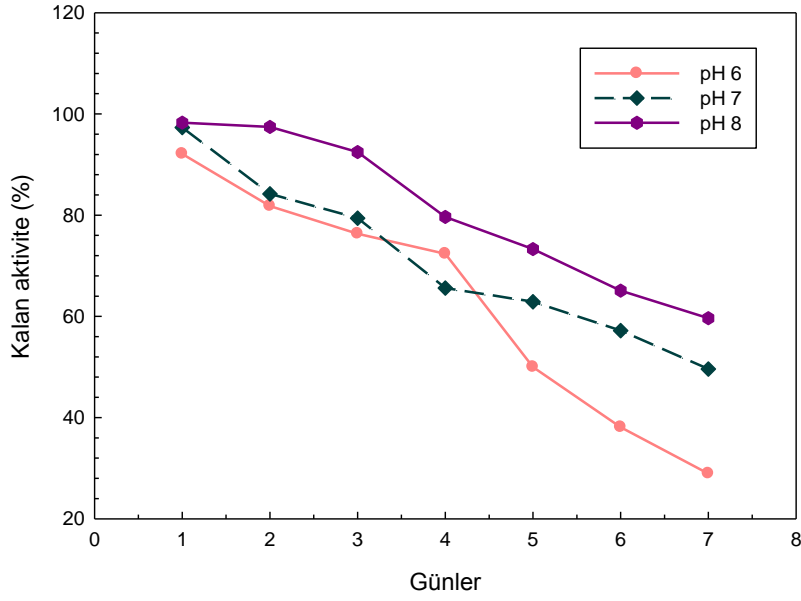
Şekil 4.7. *B.subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesine çeşitli pH'ların etkisi (% 100 kabul edilen pH 10,0'daki enzim aktivitesi 1130 U ml⁻¹'dir)

4.4.4. *Bacillus subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enziminin pH kararlılığı sonuçları

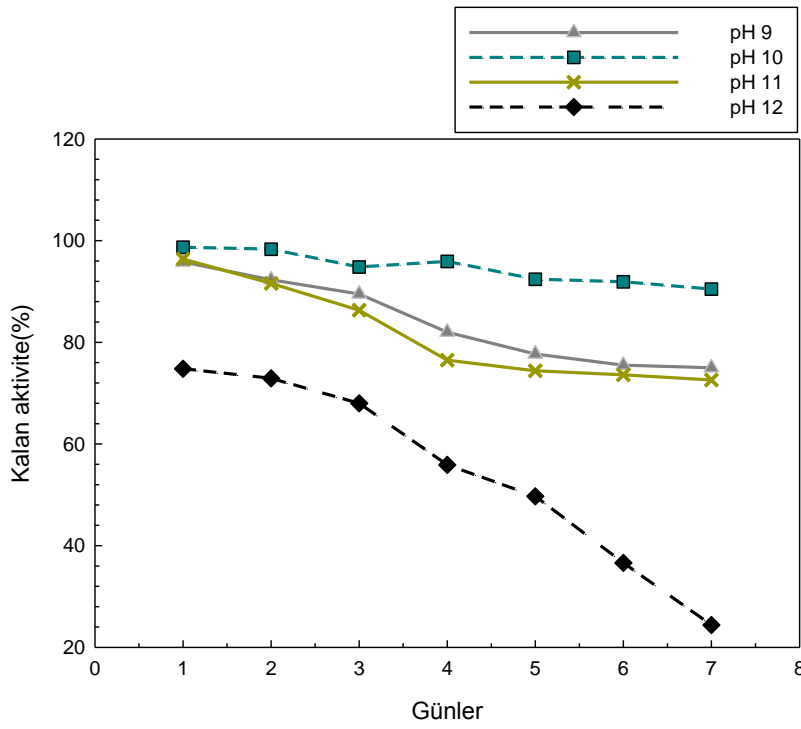
Saflaştırılan enzimin pH kararlılığını incelemek adına, enzim çözeltisi pH 6,0 ile 12,0 arasındaki farklı tamponlarda oda sıcaklığında 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon öncesi ve sonrasında aktivite testi yapıldı. İnkübasyondan önceki aktivite değerleri 100 kabul edildi ve inkübasyondan sonraki aktiviteler kalan aktivite yüzdesi olarak grafiğe yansıtıldı (Şekil 4.8). Ayrıca enzim çözeltisi farklı pH'lardaki tamponlarda 1 hafta inkübe edildi ve her 24 saatte bir aktivite testi uygulandı (Şekil 4.9 ve 4.10).



Şekil 4.8. Saflaştırılan proteaz enziminin farklı pH'larda 3 saat inkübasyon sonundaki kararlılığı



Şekil 4.9. Saflaştırılan proteaz enziminin pH 6,0, 7,0 ve 8,0 tamponlarında 1 haftalık inkübasyonunda 24 saatlik periyotlar sonundaki kararlılığı

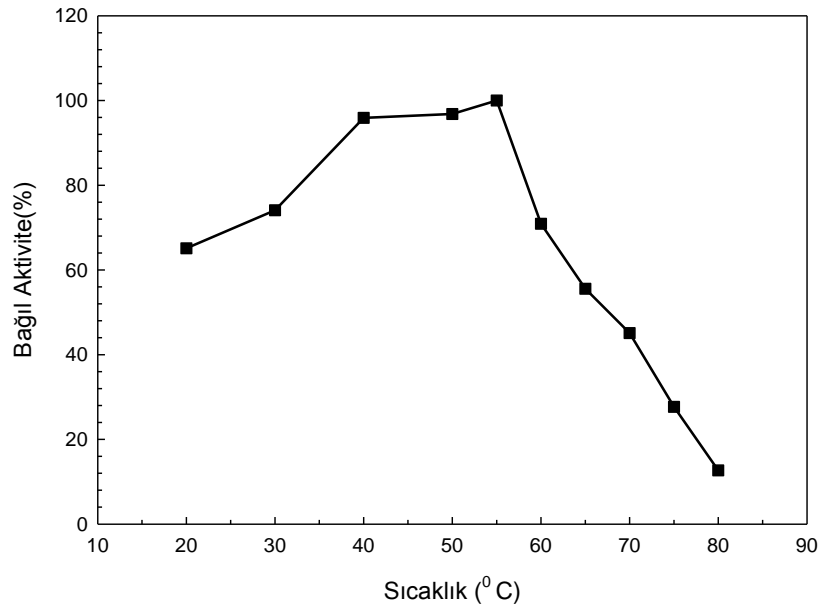


Şekil 4.10. Saflaştırılan proteaz enziminin pH 9,0, 10,0 ve 11,0 ve 12,0 tamponlarında 1 haftalık inkübasyonunda 24 saatlik periyotlar sonundaki kararlılığı

Safılaştırılan enzimın kararlılık çalışmalarında, pH 6,0-12,0 arasındaki tamponlarla enzim 3 saat inkübe edildiğinde neredeyse hiç aktivite kaybı olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.8). Enzimın pH 6,0 ile 12,0 arasındaki tamponlarda 1 haftalık inkübasyon periyodunda her 24 saatlik süre sonunda yapılan aktivite testlerinde, pH 6,0 dışındaki diğer tamponlarda ilk gün sonunda kayıp olmadığı tespit edildi. Enzimın proteolitik aktivitesi bütün tamponlarda gün geçtikçe azalma eğilimi göstermekle birlikte, 7.günün sonunda bu azalma yaklaşık %80'e yakın bir kayıpla en çok pH 6,0'ya, en az kayıp ise yaklaşık %3'lük bir oranla pH 10,0 tamponuyla inkübe edilen enzim örneğine aittir (Şekil 4.9 ve 4.10).

4.4.5. *Bacillus subtilis* M33'den safılaştırılan proteaz enzimının optimum reaksiyon sıcaklığı sonuçları

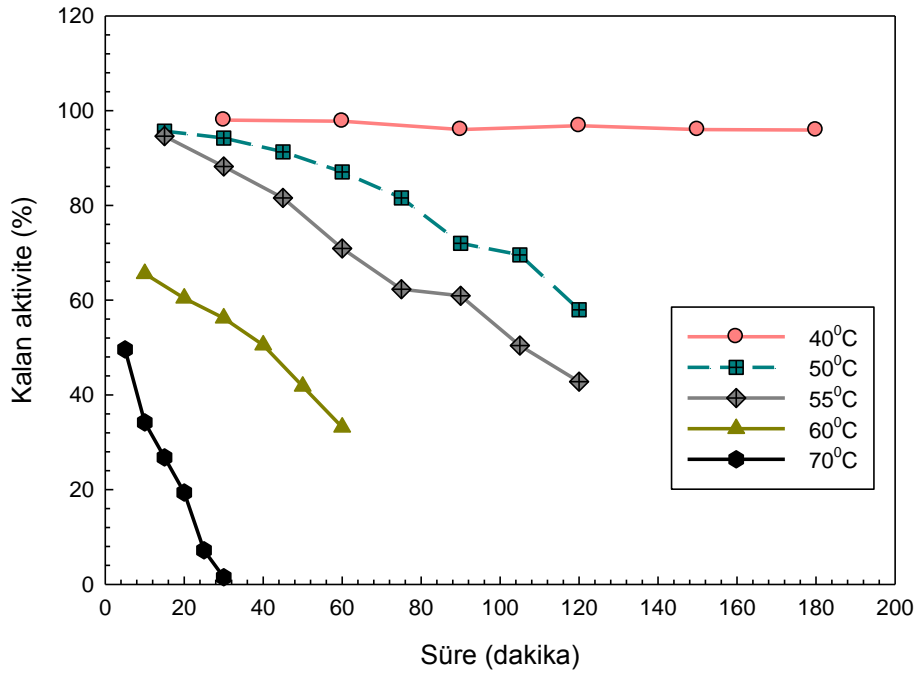
Proteaz enzimının optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın tayini için 20-80 °C arasındaki sıcaklıklar denendi ve maksimum aktivite 55°C'de kaydedildi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Safılaştırılan proteaz enzime çeşitli sıcaklıkların etkisi
(% 100 kabul edilen 55°C'deki enzim aktivitesi 1190 U ml⁻¹ dir)

4.4.6. *Bacillus subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık kararlılığı sonuçları

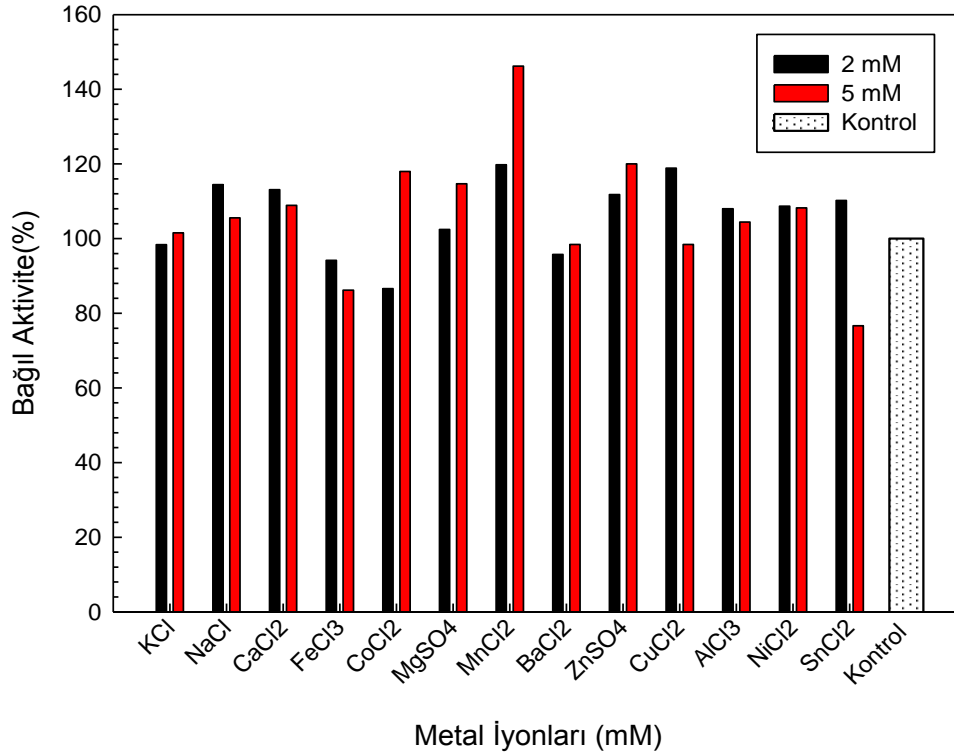
Saf proteazın sıcaklık kararlılığını belirlemek amacıyla enzim, 40-70°C arasındaki sıcaklıklarda kısım 3.8.4.'de bahsedildiği gibi inkübasyona bırakıldı. Enzimin 40°C'de 3 saat inkübasyonu neticesinde aktivitesini neredeyse hiç kaybetmediği tespit edildi. Bununla birlikte, enzimin 50°C'de 45 dakika sonunda aktivitesini neredeyse tamamen koruduğu 120 dakika sonunda ise yaklaşık %43'ünü kaybettiği görüldü. 55°C'de ise 105. dakikanın sonunda aktivitesinin yarısını kaybettiği tespit edildi. 60°C de ise 10. dakikada aktivitesinin yaklaşık %35'ini koruduğu belirlendi. 70°C'de 5. dakikanın sonunda enzim aktivitesinin yarısının, 30 dakika sonunda ise tamamının kaybolduğu tespit edildi (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Saflaştırılan proteazın 40-70 °C arasındaki sıcaklıklarla inkübasyonu neticesindeki kararlılığı

4.4.7. *Bacillus subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enzimine bazı metal iyonlarının Etkisi

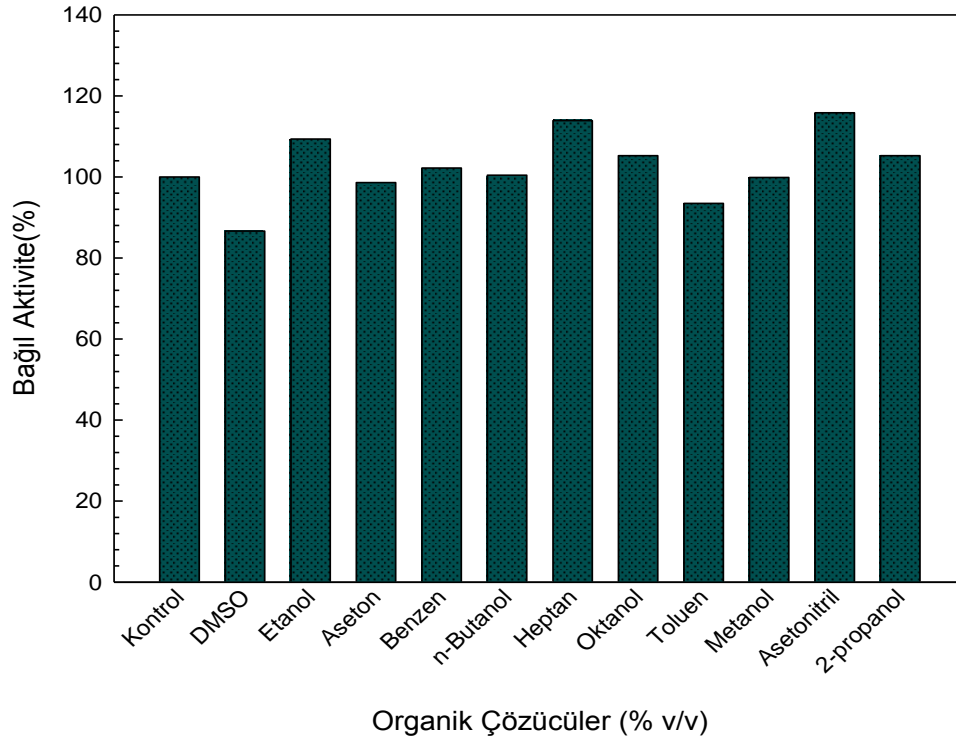
Saf proteazın aktivitesine metal iyonlarının etkisi incelendi. Bunun için, K^+ ve Na^+ , Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Sn^{2+} , Fe^{3+} ve Al^{3+} iyonlarının klorürlü ve sülfatlı tuzlarının 2 ve 5 mM çözeltileri hazırlanıp enzimle 1 saat inkübe edildi. Aynı şekilde inkübe edilen ama içinde metal iyonu bulundurmayan kontrol numunesinin inkübasyon sonundaki aktivitesi 100 kabul edilip grafik şekillendirildi (Şekil 4.13). Enzimin 5 mM $FeCl_3$ varlığında aktivitesinin yaklaşık %15'ni kaybettiği tespit edildi. $SnCl_2$ 'nin 5 mM'lık konsantrasyonu varlığında ise enzim aktivitesinde yaklaşık %25'lik bir inhibisyon olduğu görüldü. $NaCl$, $CaCl_2$, $AlCl_3$ ve $NiCl_2$ çözeltilerinin her iki konsantrasyonlarının da enzim aktivitesinde kısmi bir artış sağladığı tespit edildi. $MnCl_2$ 'nin enzim aktivitesini şiddetli bir şekilde -yaklaşık %50- arttırdığı belirlendi. $ZnSO_4$, $MgSO_4$ ve $CuCl_2$ (2 mM) çözeltilerinin enzim bağlı aktivitesini yaklaşık %120'ye çıkardığı görüldü. Bununla birlikte, $CoCl_2$ 'nin 2 mM'lık konsantrasyonu enzim aktivitesini yaklaşık %20 azaltırken, 5 mM'lık konsantrasyonu proteaz aktivitesini 1,2 kat arttırdığı belirlendi. $BaCl_2$ ve KCl 'nin ise *B.subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesinde herhangi bir azalma veya artmaya sebep olmadığı tespit edildi.



Şekil 4.13. *B.subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enzimine bazı metal iyonlarının etkisi (%100 kabul edilen kontrol numunesinin aktivitesi 1625 U ml⁻¹'dir)

4.4.8. Bazı organik çözücülerin *Bacillus subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enzimi kararlılığına etkileri

Saflaştırılan proteaz enziminin kararlılığına, DMSO (dimetil sulfoksit) , etanol, aseton, benzen, n-Butanol, heptan, oktanol, toluen, metanol, asetonitril, 2-propanol gibi organik çözücülerin varlığında bakıldı. DMSO enzim aktivitesinde yaklaşık %14'lük bir kayba sebep olurken, heptan ve asetonitril çözeltilerin enzim aktivitesini yaklaşık %15 arttırdığı tespit edildi. Enzimin genel olarak bu organik çözücüler varlığında kararlılığını koruduğu görüldü (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesine bazı organik çözücülerin etkisi (% 100 kabul edilen kontrol numunesinin aktivitesi 1045 U ml⁻¹'dir)

4.4.9 *Bacillus subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifitesi sonuçları

Saf proteaz enziminin, kazein, sığır serum albumini (BSA), ovalbumin (yumurta albumini), jelatin ve soya fasulyesi unu gibi substratlar varlığında aktivitesi test edildi. Enzimin maksimum aktiviteyi kazein substratı varlığında verdiği görüldü. %100 kabul edilen kazein substratı varlığındaki enzim aktivitesi 1005 U ml⁻¹ 'ye tekabül etmiştir. Enzimin en az ilgi duyduğu substrat ise soya fasulyesi unu (%16,94) olarak belirlendi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. *B.subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enziminin bazı substratlar varlığında aktivitesindeki durum

Substrat	Bağlı Aktivite (%)
Kazein	100
Sığır Serum Albumini	61,22
Ovalbumin (Yumurta Albumini)	32,85
Jelatin	39,59
Soya Fasulyesi Unu	16,94

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

B.subtilis M33'den saflaştırılan proteaz enziminin katalitik bölgesindeki aktif grubu tayin etmek amacıyla, enzim çeşitli inhibitörlerle test edildi. Enzimin 2 ve 5 mM PMSF varlığında kuvvetlice inhibe olduğu görüldü. Bu sonuç, saflaştırılan proteazın serin proteaz ailesine mensup olduğunu göstermektedir. Enzimin 5 mM EDTA varlığında da aktivitesinin yaklaşık %20'sini kaybettiği gözlemlendi. Enzimin DTT varlığında aktivitesinin arttığı, 2-merkaptolanol varlığında ise bağlı aktivitesinin %204,98 olduğu tespit edildi. Enzimin, bir anyonik yüzey aktif maddesi olan SDS (sodyum dodesil sülfat) varlığında bağlı aktivitesi %90,68 olarak belirlendi. Ağartıcı ajan olarak da kullanılan H₂O₂'nin %5,0 (v/v) konsantrasyonunda enzim aktivitesinin kısmi bir artış (%103,03) gösterdiği tespit edildi. Noniyonik deterjan yüzey aktif maddeleri olan Triton X-100 ve Tween-80 (%1,0 v/v) de proteaz aktivitesinde kısmi bir artış sağlamıştır. Bahsedilen çözeltiler varlığında enzimin bağlı aktivitesini gösteren değerler çizelge 4.3.'de verildi. İçinde reaktif bulundurmeyen kontrol numunesinin aktivitesi %100 kabul edildi ve bu değer 1015 U ml⁻¹ olarak belirlendi.

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

Reaktifler	Konsantrasyonlar	Bağlı Aktivite (%)
PMSF	2 mM	5,65
PMSF	5 mM	2,61
EDTA	2mM	90,02
EDTA	5 mM	79,48
DTT	2 mM	119,68
DTT	5 mM	124,88
2-merkaptolanol	%0,1 (v/v)	204,98
SDS	%0,2 (w/v)	90,68
Triton X-100	% 1,0 (v/v)	105,35
Tween 80	% 1,0 (v/v)	108,67
H ₂ O ₂	%5,0 (v/v)	103,03
Kontrol		100

4.4.11. Bazı Endüstriyel Deterjanların *Bacillus Subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesine etkileri

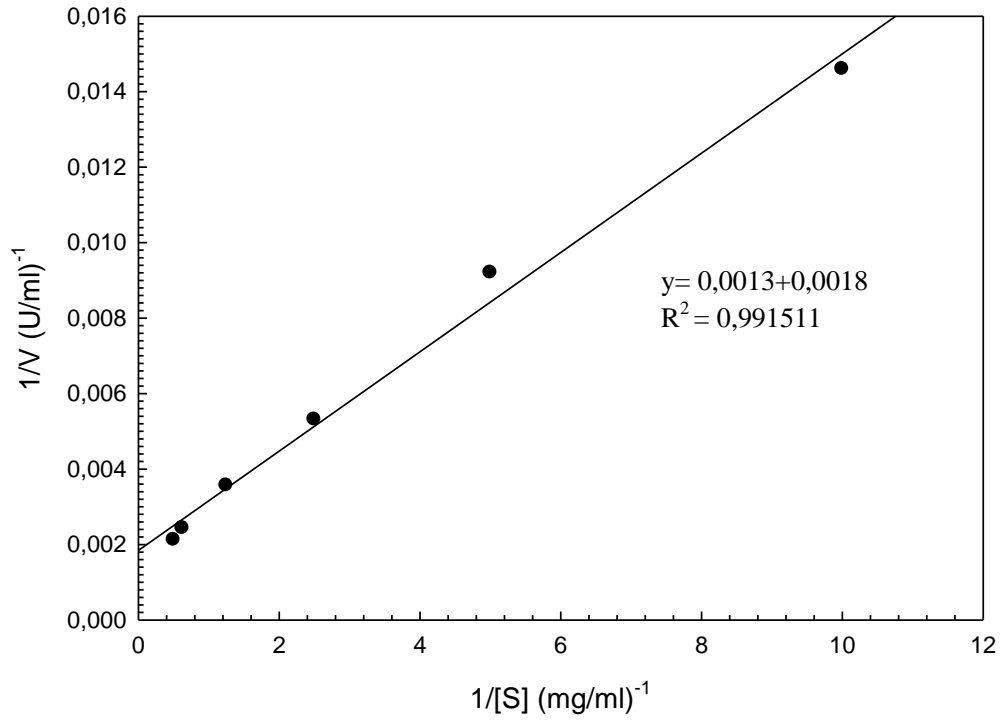
Bingo (Hayat Kimya, İstanbul), Ariel (Procter&Gamble), Tode Matik (ABC, İstanbul), Art (Beyaz Kağıt, Adana), OMO (Unilever, Kocaeli), Tursil (Henkel) gibi yerel ve uluslar arası düzeyde üretim yapan deterjanların saflaştırılan proteaz enzimine etkileri çeşme suyu ortamında incelendi. Deterjan içermeyen örneğin aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğer deterjanların enzim aktivitesine etkileri çizelge 4.4'de gösterildi. Tode marka deterjan %103,85 ile en yüksek bağlı aktiviteyi göstermekle birlikte, OMO ve Ariel markalı deterjanlar enzim aktivitesini sırasıyla %61 ve %43 oranında düşürmüştür.

Çizelge 4.4. Bazı endüstriyel deterjanların *B.subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz aktivitesine etkileri

Deterjan	Bağıl Aktivite (%)
Bingo	65,26
Ariel	57,54
Tode	103,85
Art	93,51
OMO	39,1
Tursil	86,32
Kontrol	100

4.4.12. *B. subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enziminin Michael Menten kinetik parametreleri

B. subtilis M33'den saflaştırılan proteaz enziminin 0,1 – 2 mg/ml kazein varlığında 30°C'de Michaelis Menten kinetik parametreleri; K_m ve V_{maks} , Lineweaver-Burk grafiği çizilerek hesaplandı. K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla 0,706 mg/ml, 3000 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ olarak belirlendi. Lineweaver-Burk grafiği şekil 4.15'de verilmiştir.



Şekil 4.15. *B.subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratıyla elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Nötrofilik ve alkalofilik *Bacillus* türleri yüksek oranlarda alkali proteaz üreticisidirler ve bu enzimler, yüksek katalitik aktiviteleri, yüksek substrat spesifiteleri ve artan ürün kapasiteleri gibi özelliklerinden ötürü endüstrinin, deterjan, deri, gıda, atık muamelesi, peptit sentezi gibi bir çok alanında geniş uygulamalara sahiptirler [6, 78]. Literatür incelendiğinde, çok farklı kaynaklardan izole edilen mikroorganizmalardan –özellikle *Bacillus* türlerinden- proteazların saflaştırıldığı ve bu saflaştırılan proteazların endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılabilirliğine dair karakterizasyon çalışmalarının yapıldığı ve halen yapılmakta olduğu görülmektedir. Proteazların oldukça yüksek ekonomik değerlere sahip olması, yeni kaynaklardan, farklı proteazların araştırılmasına itici güç oluşturmaktadır [91].

Bu çalışmada, Ankara'nın Ahlatlıbel toprağından izole edilen *Bacillus subtilis* M33'den hücre dışı yeni bir alkali proteaz saflaştırılıp karakterize edildi. *B.subtilis* M33'in fermentasyonu ve enzim üretimi standart bir besiyeri içerisinde optimize şartlar altında gerçekleştirildi. Literatürde enzim üretimi için besi yeri optimize edilmesine dair çalışmalara rastlanmakla birlikte [7, 92], standart besi yeri kullanılan çalışmalar da bulunmaktadır [14, 27, 32]. *Bacillus* genusları çoğunlukla hücre dışı proteaz üreticisidirler ama nadiren hücre içi proteaz üreten ve saflaştırılan çalışmalar da yapılmıştır [93].

Enzim saflaştırmanın temel kriterlerinden biri mümkün olduğunca az adımda enzimi elde etmektir [48]. Saflaştırma işlemi (% 35-80) amonyum sülfat çöktürmesi ve pH 9,0 tamponuyla dengelenmiş DEAE selüloz anyon değişim kromatografisiyle iki adımda gerçekleştirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi iyonik gücün artırılmasıyla proteinlerin agrege edilmesidir. Amonyum sülfat haricinde, etanol ve aseton gibi organik çözücülerle de proteinler presipite edilebilmektedir [37, 90]. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda enzim ham ekstrakta göre %53 verimle 2,51 kat saflaştırıldı. Bu adımdaki sonuç, Sung ve ark.'larının *Bacillus subtilis* JB1'den saflaştırılan Subtilisin JB1 sonucuyla örtüşmektedir [94]. Bu adımdaki verim kaybı, proteinlerin tam presipite olmamasına, ortam sıcaklığının her ne kadar 4°C'de

tutulmaya çalışılsa da bozucu etki yapabilmesine, pH'nın ve karıştırmanın etkisine bağlanabilir.

Alkali proteazlar genellikle pozitif yüklüdürler [64] ve dolayısıyla DEAE selüloz gibi anyon değişim kromatografilerine bağlanmazlar. Katyon değişim kromatografisi kullanılıp, bağlanan moleküllerin tuz veya pH gradiyenti uygulayarak elüe edilmesine dair çalışmalar da vardır [15, 20, 37]. Bununla birlikte, literatür bilgileri göstermektedir ki, jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE anyon değişim kromatografisi [9-11, 15, 18-19, 22-24, 33] proteazların saflaştırılması için en çok tercih edilen yöntemlerin başında gelmektedir. Bu çalışmada enzim, bağlanmayan fraksiyonlarda gelmiş ve pH 9,0 glisin-NaOH tamponuyla elüe edilmiştir. Son saflaştırma basamağından sonra, proteaz enzimi, 7040 U/mg spesifik aktivite, %38,66 verimle 15,50 kat saflaştırılmış oldu (Çizelge 4.1). Benzer saflaştırma yollarını takip ederek proteazı *Bacillus subtilis* EAG-2'den %29 verimle 11 kat [10]; *Bacillus clausii* GMBAE 42'den %58 verimle 16 kat [18]; *Bacillus subtilis* PE-11'den %7,5 verimle 21 kat [33]; *Bacillus* sp. RKY3'den %24,2 verimle 38,7 kat [36]; *B.subtilis*'den %7,1 verimle 8 kat [95]; saflaştırma çalışmalarla kıyaslandığında, enzimin orta derece bir verimle (% 38,66), yüksek bir spesifik aktiviteyle (7040 U/mg) saflaştırıldığı görüldü. İhtimal aktivite kaybı sebepleri arasında, standart bir besi yeri kullanılması, amonyum sülfat çöktürmesi sırasında protein yapısında bozulmalar olabilmesi, çalışma ortamlarının pH ve sıcaklık etkisi, kolon dolgu maddesinin yapısal özelliği ve enzime ortamdaki diğer maddelerin bozucu etkide bulunması sayılabilir. Proteaz enzimini tek adımda saflaştırma çalışmaları olduğu gibi [24, 96], fazla adım sayısı ile saflaştırma çalışmaları olduğu da görülmüş ama bu çalışmaların sonucu incelendiğinde adım sayısı arttıkça, saflaştırma kat sayısı artsa da verimin çok düştüğü tespit edilmiştir [12-13, 15-16, 28, 37, 61, 97].

Proteaz enziminin saflaştırılması, SDS PAGE analizindeki tek bant ile de tasdik edildi (Resim 4.1). Saflaştırılan proteaz enziminin molekül kütlesi hem SDS PAGE (sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi) ile (resim 4.1) hem de jel filtrasyon kromatografisi ile (Şekil 4.5) yaklaşık 39 kDa olarak tayin edildi. Serin

proteazların molekül kütleleri 18-35 kDa; subtilisinlerin molekül kütleleri ise 20 ile 45 kDa arasında değişmektedir [6]. Ama literatürde bu aralıkların altında ve üstünde proteazlara da rastlamak mümkündür. Bu çalışmada *Bacillus subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enziminin molekül kütlesi (39 kDa); literatürdeki bir dizi çalışmayla [11, 19, 31, 35, 36] benzemektedir. Bununla birlikte, *Bacillus subtilis* PE-11'den saflaştırılan, molekül kütlesi 15 kDa olan nispeten küçük molekül kütledeki bir serin proteaz [33], *Bacillus licheniformis* RSP-09-37'den saflaştırılan ve molekül ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi ile 55 kDa olarak tespit edilen proteaz [99], *Bacillus laterosporus*-AK1'den saflaştırılan ve SDS PAGE ile molekül kütlesi 86,29 kDa olarak belirlenen [91] büyük molekül kütlelere sahip proteazların olduğu da rapor edilmiştir. Deterjan endüstrisinin en popüler iki proteazı Subtilisin Carlsberg ve Subtilisin BPN'nin molekül kütlesi ise sırasıyla 27,3 ve 27,5 kDa'dır.

Enzimlerin en önemli karakteristik özelliklerinden biri maksimum aktivite gösterdikleri pH ve sıcaklıklardır. Tamponlarla enzimin inkübasyonu sonucu, saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH'sı 10,0 olarak bulundu. Enzimin optimum pH'sının 10,0 olarak bulunması, alkali şartlarda aktif olduğuna yani alkali proteaz olduğuna işarettir. Saflaştırılan enzimin pH 6,0-12,0 arasındaki tamponlarda 3 saat, ve özellikle, pH 9,0, 10,0, 11,0 tamponları varlığında enzim aktivitesinin 1 hafta boyunca stabil kalması, çalışmanın vurucu noktalarından olmuştur. Çünkü, bilhassa deterjan endüstrisinde kullanılan proteazların alkali pH'larda kararlılığını uzun sürelerde koruması istenir. Bu bakımdan, *Bacillus subtilis* M33'den saflaştırılan bu alkali proteaz, endüstrinin alkali pH'larda yüksek kararlılık gösterilmesi gereken alanları için oldukça uygun görülmektedir. *Bacillus* türlerinden saflaştırılan pek çok proteaz enziminin aktivitesi pH 9,0, 10,0, 11,0 gibi alkali pH'larda etkindir [9, 13, 16, 19, 21, 28, 31, 33-35, 38, 84, 90, 96, 99]. Bu bakımdan *B.subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH'sının literatürle uyumlu olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, incelenen literatürler arasında, pH kararlılığını 1 haftalık periyot halinde gösteren çalışmaya rastlanmamıştır.

Genelde enzimler, özelde proteazlar için bir diğer önemli parametre, optimum reaksiyon sıcaklığıdır. Yapılan bu çalışmada, *B.subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığı 55°C olarak bulundu. *B.cereus* MCM B-326'dan saflaştırılan [84], *Bacillus subtilis* KHS-1'den saflaştırılan [9], *Bacillus pumilis* MK6-5'den saflaştırılan [20], *B.subtilis* CN2'den saflaştırılan [32] ve *B.licheniformis* RSP-09-37'den saflaştırılan [99], proteaz enzimlerinin optimal sıcaklıkları 50-55°C civarındadır ve dolayısıyla yapılan çalışmayla benzerlik göstermektedir.

Proteaz enziminin sıcaklık kararlılığı çalışmalarında ise, enzimin 40°C'de aktivitesini 3 saat, 50 ve 55°C'de ise yaklaşık 50 dakika koruduğu, daha yüksek sıcaklıklara çıkıldıkça aktivitede kısmi kayıplar olduğu görüldü. Bu sonuç, saflaştırılan proteaz enziminin ılıman sıcaklık koşullarında kullanımının daha uygun olduğuna işaretler. Benzer bir sonuca, *B.mojavensis* A21'den saflaştırılan alkali serin proteazın sıcaklık kararlılığında rastlamak mümkündür [37].

Saflaştırılan proteazın katalitik doğasının tanımlanması için yapılan çalışmada, enzimin serin proteaz inhibitörü olan PMSF ile kuvvetlice inhibe olduğu, metalo proteaz inhibitörü olan EDTA'dan etkilenmediği görüldü. Dolayısıyla enzimin PMSF'den etkilenmesi serin alkali proteaz ailesine mensup olduğunun EDTA'dan etkilenmemesi ise metal kofaktöre ihtiyaç duymadığının yani metalo proteaz ailesinden olmadığını tespitidir. EDTA bir çok deterjan ürününde, suyun yumuşatılması ve kirlerin arındırılmasındaki fonksiyonundan ötürü şelat yapıcı ajan olarak bulunmaktadır ve deterjan formülasyonlarında kullanılan enzimlerin EDTA'dan etkilenmemesi istenir. Saflaştırılan bu proteaz enziminin EDTA varlığında yüksek kararlılık göstermesi deterjan katkı maddesi olarak kullanılabilirliği için bir avantajdır. Ayrıca saflaştırılan proteaz enziminin 2-merkaptan etanol ve DTT (ditiotritol) gibi indirgeyici ajanlar varlığında aktivitesinin şiddetli şekilde artması, saflaştırılan proteaz enziminin tiyol bağımlı olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, proteaz enziminin çeşitli metal iyonları varlığındaki aktivitesi incelendiğinde, Fe⁺³ ve Sn²⁺ metallerinin inhibisyona sebep olduğu belirlendi. Bu metaller haricindeki, özellikle Mn²⁺, Mg²⁺, Co²⁺ 'nın proteaz enziminin aktivitesini arttırdığı tespit edildi. Sonuçlar şunu göstermektedir

ki, metal iyonları muhtemelen enzimin substratının (kazeinin) aktif bölgeye bağlanma afinitesini arttırmaktadır Alkali proteazların Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} gibi divalent katyonlarına veya bunların kombinasyonuna maksimum aktivite için gereksindiği bilinmektedir [78]. Ca^{2+} iyonları bir çok enzim için uyarıcı ve stabilizör görevi görür ve enzimleri konformasyonel değişikliklere karşı korur [19]. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde; Cu^{2+} ve Mn^{2+} iyonları varlığında enzim aktivitesinin arttığı [34]; Fe^{2+} iyonları varlığında proteaz enziminin aktivitesinin 4 kat arttığını ve enzimin bu metale gereksindiğini [35]; enzimin Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} ile kuvvetlice aktive olduğunu [33] ve proteaz enziminin regülasyonunda Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarının pozitif rol oynadığını [19] görülmektedir.

Ticari öneme sahip bazı organik ürünler, suda kararsız olmakta ve/veya suda çözünmemektedir. Enzimlerin suyun yerine organik çözücülerin kullanıldığı çözeltilerde katalizör olarak kullanılmasının bu bakımdan bir çok avantajı vardır. Ama, bir çok doğal enzim, organik çözücüler varlığında kolaylıkla denatüre olabilmektedir [100]. Dolayısıyla, organik çözücüler varlığında kararlılığını koruyan enzimler, endüstride, sentetik reaksiyonlarda potansiyel uygulamalara sahiptir. *B.subtilis* M33'den saflaştırılan alkali serin proteaz enziminin bazı organik çözücüler varlığındaki kararlılığı incelendi ve enzimin yalnızca DMSO varlığında aktivitede %14 lük azalma olduğu, diğer organik çözücüler varlığında kararlılığını koruduğu görüldü. Organik çözücülerle kararlı proteazlara bilhassa sentetik reaksiyonlarda azami derecede ihtiyaç duyulması ama bununla birlikte literatürde bu özelliği gösterebilen proteazlara nadir rastlanılması bakımından yapılan bu çalışma pozitif bir üstünlük göstermektedir.

Alkali proteazların endüstriyel deterjan formülasyonlarında kullanılabilmesi için yüksek pH'larda ve sıcaklıklarda kararlı aktiviteler göstermeleri istenir. Ama bir çok alkali proteazın endüstriyel amaçlı kullanımlarında çeşitli kısıtlamalar vardır. Bu kısıtlamalar enzimin anyonik, noniyonik yüzey aktif maddeler ve ağartıcı -okside edici ajanlarla- varlığında düşük aktivite ve kararlılık göstermesinden kaynaklanmaktadır. Bu bağlamda yapılan çalışmada, *B.subtilis* M33'den saflaştırılan serin alkali proteazın SDS gibi anyonik, Triton X-100, Tween-80 gibi noniyonik ve

H₂O₂ gibi oksidantlar varlığında aktivitesini 1 saat koruduğu belirlendi. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, bahsedilen yüzey aktif maddelere ve oksitleyicilerle aktif proteazlar rapor edilmiştir [8, 11, 21, 29]. Bu şekildeki çalışmaların yorumları saflaştırılan proteazların deterjan formülasyonları, membran kirlerinin giderilmesi ve kılların arındırılması gibi potansiyel uygulamalara sahip olabileceği şeklinde nihayetlendirilmiştir.

B.subtilis M33'den saflaştırılan serin alkali proteazın yukarıda bahsedildiği gibi, yüzey aktif maddeler ve ağartıcılarla kararlılığını koruması, enzimin endüstriyel deterjanlar varlığındaki aktivitesini araştırmaya sevk etmiştir. Her ne kadar enzim, yüksek alkali pH'larda ve deterjan yüzey aktif maddeleri ve oksidantlarla geniş kararlılıklar gösterse de, bu aşamada yapılan deneylerle enzimin OMO ve Ariel gibi deterjanlarla 1 saat inkübasyonu neticesinde aktivitesinde kayıplar olduğu belirlendi. Bingo markalı deterjanla aktivitede kısmi bir azalış görülürken, Tode, Art gibi yerel düzeyde üretim yapan deterjanlar varlığında enzim aktivitesinin korunduğu görüldü. Bahsedilen aktivite kayıpları, adı geçen deterjanların formülasyonları tam olarak bilinemediğinden belli bir sebebe bağlanamamıştır.

B.subtilis M33'den saflaştırılan enzimin doğal substratlara olan spesifitesi sonuçlarında, enzimin en çok ilgiyi kazein substratına, daha sonra sırasıyla sığır serum albumini (% 61,22), jelatin (% 39,59) ovalbumin (%32,85) ve soya fasülyesi ununa (%16,94) gösterdiği tespit edildi. *B.subtilis* PE-11'den saflaştırılan proteazın en çok spesifiteyi sırayla, kazein (%100), sığır serum albumini (% 41), yumurta albumini (% 23) ve jelatin (% 9) gösterdiği [33]; *B.subtilis* DM-04'den saflaştırılan subtilisin benzeri serin alkali proteazın substrat spesifitesinin ise sırayla, kazein, hemoglobin, jelatin, tavuk tüyü keratini ve sığır serum albumin olduğu ve enzimin insan saç keratini ile kolajeni hidrolizlemediği [90]; *Bacillus* sp. RKY3'den saflaştırılan nötr serin proteazın ise substrat spesifitesinin sırasıyla, kazein (% 100), sığır serum albumini (% 47), soya unu (% 38) ve jelatin (% 35) [36] şeklinde olduğu rapor edilmiştir. *B.subtilis* M33'den saflaştırılan serin alkali proteazın incelenen çalışmalara göre substrat spesifitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Enzimin geniş bir substrat spesifitesine sahip olması, protein bazlı lekelerin giderilmesi için

kullanılan deterjanların formülasyonlarına ve gıda endüstrisine önerilebileceğine işaretler. Saflaştırılan proteaz enziminin bazı ticari deterjan proteazlarıyla kıyaslanmasına dair bilgiler çizelge 5.1’de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Bazı ticari deterjan proteazlarının özelliklerinin *B.subtilis* M33’den saflaştırılan proteaz ile kıyaslanması [34]

Proteaz	Mikrobiyal kaynak	Optimal pH aralığı	Optimum sıcaklık(° C)	Ağartıcı/oksidant Kararlılık	Tedarikçi
Yapılan çalışma	<i>B.subtilis</i> M33	8-11	40-55	+	-
Alcalase	<i>B.licheniformis</i>	7-10	60	-	Novozymes, Danimarka
Savinase	<i>B.lentus</i>	8-11	50-60	-	Novozymes, Danimarka
Esperase	<i>B.lentus</i>	7-12	50-65	-	Novozymes, Danimarka
Maxatase	<i>B.subtilis</i>	9-10	50-60	-	Gist-brocades, Hollanda
Opticlean	<i>B.alcalophilus</i>	8-11,5	15-60	-	Solvay enzymes, Almanya
Optimase	<i>B.licheniformis</i>	7,5-10,5	15-65	-	Solvay enzymes Almanya
Everlase	Savinase’in türevi	8-11	50	+	Novozymes, Danimarka

K_m (Michaelis-Menten sabiti), enzimin substratına karşı olan ilgisini gösteren bir değerdir. K_m değeri küçük olan enzim, substratı için yüksek bir affinite gösterir; enzim düşük bir substrat konsantrasyonunda doyararak maksimal hız sağlar. K_m değeri 10^{-6} M ve daha düşük olan enzimler yüksek affiniteli enzimlerdir ki bunların metabolizmada büyük önemi vardır. K_m değeri büyük olan enzim, substratı için düşük bir affinite gösterir; enzimin yarı doygunluğa ulaşması için daha fazla substrat konsantrasyonu gerekmektedir [43-44]. Bu çalışmada *B.subtilis* M33’den saflaştırılan serin alkali proteazın 30°C 0,1-2 mg/ml kazein substratına karşı K_m değeri 0,706 mg/ml olarak bulundu. Enzimin V_{maks} değeri ise 3000 $\mu M \cdot \text{min}^{-1}$ olarak belirlendi. Literatürdeki, *Bacillus clausii* GMBAE 42 (K_m 1,8 mg.ml⁻¹ ve V_{maks}

11,50 μM) [18]; haloalkalifilik *Bacillus* sp (K_m 2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, V_{maks} 289 $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$) [96] ve haloalkalifilik AH-6 (K_m 2,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, V_{maks} 625 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$) [24] den saflaştırılan proteazların K_m değerlerine göre *B.subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enziminin daha yüksek afinite ve etkili bir katalitik role sahip olduğu görülmektedir. Bununla birlikte *B.circulans*'dan saflaştırılan serin alkali proteazın (K_m 0,597 mg/ml ve V_{maks} 'ı 13825 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$) [19] kısmen daha küçük bir K_m değerine ve haliyle daha yüksek bir afiniteye sahiptir.

Özetle; *B.subtilis* M33'den amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE selüloz anyon değişim kromatografisiyle alkali serin proteaz saflaştırılmış ve saflaştırılan bu enzimin, alkali pH'larda uzun süreli kararlılık gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca enzimin, organik çözücüler, anyonik, noniyonik yüzey aktif maddeleri ve oksidantlarla aktivitesini koruması çalışmanın öne çıkan noktalarındandır. Yapılan substrat spesifitesi analiziyle saflaştırılan proteaz enziminin geniş bir substrat spesifitesine sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca enzim bazı ticari deterjanlar varlığında da aktivitesini korumaktadır. Tüm bu özellikler bir araya getirildiğinde *Bacillus subtilis* M33'den saflaştırılan serin alkali proteaz enziminin deterjan formülasyonlarında kullanılabilirliğe aday olduğu söylenebilir. Bununla birlikte, mikroorganizmanın fermentasyon ortamı enzim üretimiyle doğrudan ilgili olduğu için, enzim üretimi için farklı fermentasyon ortamları optimize edilmesinin gelecek çalışmalar için pozitif sonuçlar doğuracağı düşünülmektedir. Enzimin metal iyonları varlığında aktive olduğu fakat yüksek sıcaklıklarda inhibe olduğu görülmüştür. Proteaz enzimlerinin Ca^{2+} iyonları varlığında termostabilitesini koruduğuna dair raporlar vardır [78]. İleriki çalışmalarda, *B.subtilis* M33'den saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık kararlılığı Ca^{2+} varlığında test edilebilir ve pozitif sonuçlar alınabilir, çünkü enzimin Ca^{2+} varlığında sıcaklık kararlılığını koruyabileceği ihtimali yapılan deneylerle görülmektedir. Ayrıca saflaştırılan proteaz enziminin amino asit diziliminin yapılması tam olarak hangi enzim ailesine mensup olduğuna ışık tutacağından daha detaylı karakterizasyon çalışmalarının şekillenmesine olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Burtis, C. A., Ashwood, E. R., “Klinik Kimyada Temel İlkeler, 5.baskı”, D., Aslan, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 159-160 (2007)
2. Tekman, Ş., Önder, N., “Genel Biyokimya, 4 baskı”, *İstanbul üniversitesi yayımları*, İstanbul, 356 (1987).
3. Copeland, R. A., “Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis, 2nd ed.”, *Wiley-VCH*, New York, 1-7 (2000).
4. Sarıkaya Öztürk, S. B., “Yabani Çuha bitkisinin çiçeklerinden proteaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve peynir üretiminde kullanılabilirliğinin araştırılması”, *Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, 1-7 (2006).
5. Turk, B., “Targeting proteases: successes, failures and future prospects”, *Nature Reviews*, 5: 785-799 (2006).
6. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., and Deshpande, V. V., “Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases”, *Microbiology and Molecular Biology reviews*, 62(3): 597-635 (1998).
7. Genckal, H., Tari, C., “Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats”, *Enzyme and Microbial Technology* 39: 703–710 (2006).
8. 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).
9. 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).
10. Ghafoor, A., Hasnain, S., “Purification and characterization of an extracellular protease from *Bacillus subtilis* EAG-2 strain isolated from ornamental plant nursery”, *Polish Journal of Microbiology*, 59 (2): 107-112 (2010).
11. 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).

12. 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).
13. Toyokawa, Y., & Takahara, H., Reungsang, A., Fukuta, M., Hachimine, Y., Tachibana, S., Yasuda, M., “Purification and characterization of a halotolerant serine proteinase from thermotolerant *Bacillus licheniformis* RKK-04 isolated from Thai fish sauce”, *Appl Microbiol Biotechnol*, 86:1867–1875 (2010).
14. Olajuyigbe, F. M., Ajel, J. O., “Some Properties of Extracellular Protease from *Bacillus licheniformis* Lbbl-11 Isolated from “iru”, A Traditionally Fermented African Locust Bean Condiment”, *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 3 (1): 42-46 (2008).
15. Uchida, H., Kondo, D., Yamashita, S., Tanaka, T., Tran, L.H., Nagano, H., Uwajima, T., “Purification and properties of a protease produced by *Bacillus subtilis* CN2 isolated from a Vietnamese fish sauce”, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 79-582 (2004).
16. Gessesse, A., Hatti-Kaul, R., Gashe, B. A., Mattiasson, B., “Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather”, *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 519–524 (2003).
17. Öztürk, S., “Ülkemizden izole edilen *Bacillus licheniformis* BA17’den elde edilen alkalen proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, 19-23, (2007).
18. Kazan, D., Denizci, A. A., Kerimak Oner, M. N., Erarslan, A., “Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42”, *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 32: 335–344 (2005).
19. Subba Rao, Ch., Sathish, T., Ravichandra, P., Prakasham, R.S., “Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications”, *Process Biochemistry*, 44: 262–268 (2009).
20. Kumar, C.G., “Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*”, *Letters in Applied Microbiology*, 34: 13-17 (2002).
21. Joo, H.-S., Kumar, C.G., Park, G.-C., Paik, S.R., and Chang, C.-S., “Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties”, *Journal of Applied Microbiology*, 95: 267–272 (2003).

22. Rahman, RNZR, Geok, L. P., Basri, M., Salleh, AB., “An organic solvent-stable alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: Enzyme purification and characterization”, *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 1484–1491 (2006).
23. Moreira-Gasparin, F. B., Marques de Souza, C. G., Costa, A. M., Alexandrino, M., Bracht, C.K., Boer, C. G., Peralta, R. M., “Purification and characterization of an efficient poultry feather degrading-protease from *Myrothecium verrucaria*”, *Biodegradation*, 20:727–736 (2009)
24. Dodia, M. S., Rawal, C. M., Bhimani, H. G., “Purification and stability characteristics of an alkaline serine protease from a newly isolated Haloalkaliphilic bacterium sp. AH-6”, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35:121–131 (2008).
25. Yadav, J. S., Chowdhury, S., Chaudhuri, S., R., “Purification and characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from East Calcutta Wetland”, *Journal of Biological Sciences*, 10(5): 424-431 (2010).
26. Shankar, S., Rao, M., Laxman, R. S., “Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria sp*”, *Process Biochemistry* 46: 579–585 (2011).
27. Divakar, K., Priya, J., Gautam, P., “Purification and characterization of thermostable organic solvent-stable protease from *Aeromonas veronii* PG01”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66: 311–318 (2010).
28. Cheng, K., Lu, F.L., Li, M., Liu, L., and Liang, X-M., “Purification and biochemical characterization of a serine alkaline protease TC4 from a new isolated *Bacillus alcalophilus* TCCC11004 in detergent formulations”, *African Journal of Biotechnology*, 9(31): 4942-4953 (2010).
29. Manni, L., Jellouli, K., Ghorbel-Bellaaj, O., Agrebi, R., Haddar A., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M., “An Oxidant- and Solvent-Stable Protease Produced by *Bacillus cereus* SV1: Application in the Deproteinization of Shrimp Wastes and as a Laundry Detergent Additive”, *Appl Biochem Biotechnol*, 160:2308–2321(2010).
30. Zambare, V., Nilegaonkar, S., and Kanekar, P., “A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization”, *New Biotechnology* 28(2): 173-181(2011).
31. Tanskul, S., Hiraga, K., Takada, K., Rungratchote, S., Suntinanalert, P., Oda, K., “An alkaline serine-proteinase from a bacterium isolated from Bat Feces:

- purification and characterization”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73(11): 2393-2398 (2009).
32. Bhaskar N., Sudeepa E.S., Rashmi H.N., Selvi, T., “Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities”, *Bioresource Technology*, 98: 2758–2764 (2007).
 33. 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 PharmSciTech*, 4(4): 1-9 (2003).
 34. Beg, Q. K., Gupta, R., “Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*”, *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 294-304 (2003).
 35. Rai, S. K., Mukherjee, A. K., “Ecological significance and some biotechnological application of an organic solvent stable alkaline serine protease from *Bacillus subtilis* strain DM-04”, *Bioresource Technology*, 100: 2642–2645 (2009).
 36. Reddy, LVA., Wee Y-J., and Ryu H-W., “Purification and characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus* sp. RKY3”, *J Chem Technol Biotechnol* 83: 1526–1533 (2008).
 37. Haddar, A., Bougatef, A., Agrebi, R., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M., “A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization”, *Process Biochemistry*, 44: 29–35(2009).
 38. Singh, J., Vohra, R.M., Sahoo, D.K., “Alkaline protease from a new obligate alkalophilic isolate of *Bacillus sphaericus*” *Biotechnology Letters* 21: 921–924, (1999).
 39. Nelson, D. L., Cox, M. M., “Biyokimyannın İlkeleri, 3.baskı”, N. Kılıç, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 115, 244-246, 266 (2005).
 40. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., “Harper’ın Biyokimyası, 24. Baskı” , *Barış Kitabevi*, İstanbul, 68-69 (1998).
 41. Montgomery, R., Conway, T. W., Spector, A. A., “Biyokimya Olgu Sunumlu Yaklaşım 6. baskı”, N., Altan, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 74 (2000),

42. Onat T, Emerk, K., “Temel Biyokimya”, *Saray Medikal Yayıncılık*, İzmir 785-802 (1997)
43. Devlin, T. M., “Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, 6th ed.”, *Wiley-Liss pub.*, Hoboken, 367, 390 (2006)
44. İnternet: ”Enzimler” www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-09.pdf (2011)
45. Scopes, R. K., “Overview of protein purification and characterization”, *Current Protocols in Protein Science*, *John Wiley & Sons Inc.*, New York, 1-6 (1995).
46. İnternet: “History of Molecular Biology” http://en.wikipedia.org/wiki/History_of_molecular_biology (2011)
47. Bugg, T., “Introduction to enzyme and coenzyme chemistry, 2nd ed.”, *Blackwell publishing*, Oxford, 51-54, 82-91 (2004).
48. Eienthal, R., Danson, M. J., “Enzyme Assays a Practical Approach, 2nd ed.”, *Oxford University Press*, New York, 18-19 (2002).
49. Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C.W., “Fundamentals of Biochemistry, upgrade ed.”, *John Wiley & Sons Inc.*, New York, 97-99 (1998).
50. Erarslan A., Kazan, D., Denizci, A.A., Öztürk, D., Karahan, N., “Enzim saflaştırmada temel yöntemler, VIII. Uygulamalı eğitim kursu”, *Tübitak*, Kocaeli, 49-53, (2005).
51. Dennison, C., “ A Guide to Protein Isolation, 2nd ed.”, *Kluwer Academic Pub.*, New York, 71 (2000).
52. Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., “Enstrümental Analiz İlkeleri, 1.baskı”, E. Kılıç, F. Köseoğlu, H. Yılmaz, *Bilim Yayıncılık*, Ankara, 756-757, 800 (1997).
53. Keha, E., Küfrevioğlu, Ö. İ., “Biyokimya, 5. Baskı”, *Aktif yayınevi*, 76-77, 84 (2007).
54. Switzer, R., Garrity, L., “Experimental Biochemistry: theory and exercises in fundamental methods, 3rd ed.”, *W.H. Freeman and company*, New York, 29-33, 65-71 (1999).

55. Sookkheo, B., Sinchaikul, S., Phutrakul, S., and Chen, S.T., "Purification and Characterization of the Highly Thermostable Proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33", *Protein Expression and Purification* 20: 142–151 (2000).
56. Koolman, J., Roehm, K. H., "Color Atlas of Biochemistry, 2nd ed", *Thieme*, Stuttgart, 151 (2005)
57. Harem, M. K., "Mast Hücre Proteazları ve Biyolojik Önemi", *Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)*, 14(1): 61-67, (2005).
58. Otin, C. L., Bond, J. S., "Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease", *The Journal of Biological Chemistry*, 283(45): 30433-30437 (2008).
59. Anwar, A., Saleemuddin M., "Alkaline proteases: a review", *Bioresource Technology*, 64: 175-183 (1998).
60. İnternet: "Proteases"
https://facultystaff.richmond.edu/~jbell2/protease_biochem_march05.pp
(2011)
61. Rawlings N. D., Morton, F. R., and Barrett, A. J. "An Introduction to Peptidases and the *MEROPS* Database" *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*, *Springer*, Dordrecht, 161-171 (2007).
62. Pratt, C., Cornely, K., "Essential Biochemistry, 3rd ed.", *Wiley-Blackwell*, 180 (2003).
63. 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).
64. Gupta, R., Beg, Q. K., Lorenz, P., "Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications", *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 15–32 (2002).
65. Wang, Y., Luo, W., Reiser, G., "Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: Proteolysis and cellular functions", *Cell.Mol.Life.Sci.*, 65: 237-252 (2008).
66. Smith, C., Marks, A. D., Lieberman, M., "Marks' Basic Medical Biochemistry A clinical approach 2nd ed." *Lippincott & Wilkins*, 121 (2007).

67. İnternet: “Aspartate Protease”
http://en.wikipedia.org/wiki/Aspartate_protease (2011)
68. Powers, J. C., Asgian, J. L., Dogan Ekici, O., and James, K. E., “Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases”, *Chem. Rev.* 102: 4639-4750 (2002)
69. Grudkowska M., Zagdańska B., “Multifunctional role of plant cysteine proteinases”, *Acta Biochimica Polonica*, 51(3): 609-624 (2004).
70. Salleh, AB., Rahman, RNZR, Basri, M., “New Lipases and Proteases, 2nd ed.”, *Nova Science Publishers, Inc.*, New York, 29 (2006).
71. Pelmeshnikov, V., Blomberg, M.R.A., Siegbahn, P.E.M., “A theoretical study of the mechanism for peptide hydrolysis by thermolysin”, *J.Biol Inorg Chem.*, 7: 284-298 (2002).
72. İnternet: “Endoproteases”
http://www.nature.com/nature/journal/v459/n7245/box/nature08146_BX1.html (2011)
73. İnternet: “Trypsin” <http://en.wikipedia.org/wiki/Trypsin> (2011)
74. İnternet: “Pepsin” <http://en.wikipedia.org/wiki/Pepsin> (2011)
75. Tong, L., “Viral Proteases”, *Chem. Rev.*, 102: 4609–4626 (2002).
76. Demirjian, D. C., Moris-Varas, F., Cassidy, C., “Enzymes from extremophiles” *Current Opinion in Chemical Biology*, 5: 144–151 (2001).
77. Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G., “Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application”, *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 711-729 (1999).
78. Kumar, C.G., Takagi, H., “Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint”, *Biotechnology advances*, 17: 561-594 (1999).
79. Ito, S., Kobayashi, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S., Hatada, Y., “Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures” *Extremophiles*, 2: 185-190 (1998).
80. Yılmaz, M., “Topraktan izole edilen *Bacillus* cinsi bakterilerin bazı metabolik özelliklerinin belirlenmesi, plazmid DNA ve protein profillerinin incelenmesi”, Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 4-56(2003).

81. İnternet: “Enzymes in Industrial Applications: Global Markets”
<http://www.marketresearch.com/product/display.asp?ProductID=6060223>
(2011)
82. İnternet: “Enzymes Business”
<http://report2010.novozymes.com/Menu/Novozymes+Report+2010/Report/Sales+and+markets/Enzyme+Business> (2011)
83. Maurer, K. H., “Detergent Proteases”, *Current Opinion in Biotechnology*, 15: 330-334 (2004).
84. Nilegaonkar, S.S., Zambare, V.P., Kanekar, P.P., Dhakephalkar, P.K., Sarnaik, S.S., “Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326”, *Bioresource Technology*, 98: 1238–1245 (2007).
85. Pawar, R., Zambare, V., Barve, S., Paratkar, G., “Application of protease isolated from *Bacillus sp.* 158 in enzymatic cleansing of contact lenses”, *Biotechnology*, 26: 1-4 (2009).
86. 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).
87. 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).
88. Yapasan, E., “Partial purification and characterization of lipase enzyme from a *Pseudomonas* strain”, Yüksek Lisans Tezi, *İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 25-26, (2008).
89. Laemmli, U.K., “Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4”, *Nature*, 227: 680-685 (1970).
90. 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).
91. Arulmani, M., Aparanjini, K., Vasanthi, K., Arumugam, P., Arivuchelvi, M., Kalaichelvan, T., “Purification and partial characterization of serine protease from thermostable alkalophilic *Bacillus laterosporus*-AK1”, *World J Microbiol Biotechnol*, 23:475–481(2007).

92. Patel, R., Dodia, M., Singh, S.P. “Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. : production and optimization”, *Process Biochemistry* 40: 3569-3575 (2005).
93. 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).
94. Sung, J-H., Ahn, S.J., Kim, N.Y., Jeong, S.K., Kim, J.K., Chung, J.K., Lee, H.H., “Purification, Molecular Cloning, and Biochemical Characterization of Subtilisin JB1 from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* JB1”, *Appl Biochem Biotechnol*, 162:900–911 (2010).
95. Orhan, E., Omay, D., Guvenilir, Y., “Partial purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121: 183-194 (2005).
96. Gupta, A., Roy, I., Patel, Singh, S.P., Khare S.K., Gupta, M.N., “One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp.”, *Journal of Chromatography A*, 1075: 103–108 (2005).
97. Yang, J-K., Shih, I-L., Tzeng, Y-M., Wang, S-L., “Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes”, *Enzyme and Microbial Technology* 26: 406-413 (2000).
98. Xu, J., Jiang, M., Sun, H., He, B., “An organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant *Bacillus cereus* WQ9-2: Purification, biochemical properties, and potential application in peptide synthesis”, *Bioresource Technology*, 101: 7991–7994 (2010).
99. Sareen, R., Mishra, P., “Purification and characterization of organic solvent stable protease from *Bacillus licheniformis* RSP-09-37”, *Appl Microbiol Biotechnol* 79:399–405 (2008).
100. Ogino, H., Ishikawa, H., “Enzymes which are stable in the presence of organic solvents”, *Journal of bioscience and bioengineering*, 91(2): 109-116 (2001).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : SONUÇ, Münteha Nur
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 22.08.1987 Altındağ
Medeni hali : Bekar
e-mail : mnur87@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi /Kimya Bölümü	2011
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Kimya Bölümü	2008
Lise	Samanyolu Lisesi	2004