

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BACILLUS HALODURANS C-125 ALKALİN SERİN PROTEAZININ
ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE DETERJAN KATKI MADDESİ
OLARAK KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Aşkm TEKİN

OCAK 2020

TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /

Tezin Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :

Trabzon

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Biyoloji Anabilim Dalında

Aşkın TEKİN Tarafından Hazırlanan

**BACILLUS HALODURANS C-125 ALKALİN SERİN PROTEAZININ ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE
DETERJAN KATKI MADDESİ OLARAK KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 24 /12/2019 gün ve 1833 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Üye : Prof. Dr. Kazım SEZEN

Üye : Prof. Dr. Hatice KATI

Üye : Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Uğur UZUNER



Prof. Dr. Asim KADIOĞLU

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“*Bacillus halodurans* C-125 Alkalın Serin Proteazının Üretimi, Karakterizasyonu ve Deterjan Katkı Maddesi Olarak Kullanımının Araştırılması” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı’nda “doktora” tezi olarak hazırlanmıştır.

Doktora eğitimim süresince gerek bilimsel gerekse manevi desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Kazım SEZEN’e, sağladıkları olanaklar ve verdikleri destekler için mikrobiyoloji grubu hocalarımdan Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na, Prof. Dr. İsmail DEMİR’e, Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU’na ve Dr. Öğr. Üyesi Cihan İNAN’a, ayrıca bu çalışmanın gerçekleşmesinde çok büyük emeği olan Dr. Öğr. Üyesi Uğur UZUNER’e, desteklerinden dolayı Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya, çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen başta Dr. Aydın YEŞİLYURT ve Soner KARABULUT olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma, tezimin başarıyla tamamlanması için gerekli alt yapı imkanlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığına teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora eğitimim süresince BİDEB Yurt Dışı Doktora Sırası Burs Programı (2214-A) ile beni destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK) teşekkür ediyorum.

Bunun yanında her şart ve koşulda sağladıkları sonsuz destek için başta eşim ve aileme ebedi minnettarlığımı bildirmek isterim.

Aşkın TEKİN

Ocak, 2020

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “*Bacillus halodurans* C-125 Alkalın Serin Proteazının Üretimi, Karakterizasyonu ve Deterjan Katkı Maddesi Olarak Kullanımının Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Kazım SEZEN’in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 17/01/2020

Aşkın TEKİN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

| | |
|--|------|
| ÖNSÖZ | III |
| TEZ ETİK BEYANNAMESİ | IV |
| İÇİNDEKİLER | V |
| ÖZET | VIII |
| SUMMARY | IX |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | X |
| TABLolar DİZİNİ | XII |
| SEMBOLLER DİZİNİ..... | XII |
| 1. GENEL BİLGİLER | 1 |
| 1.1. Giriş | 1 |
| 1.2. Proteazlar | 3 |
| 1.3. Proteaz Kaynakları..... | 4 |
| 1.3.1. Bitki Proteazları | 4 |
| 1.3.2. Hayvan Proteazları..... | 5 |
| 1.3.3. Mikrobiyal Proteazlar | 5 |
| 1.4. Proteazların Sınıflandırılması | 8 |
| 1.4.1. Endopeptidazlar | 10 |
| 1.4.1.1. Serin Proteazlar..... | 10 |
| 1.4.1.2. Serin Proteaz Çalışma Mekanizması | 14 |
| 1.4.1.3. Serin Alkalın Proteazların Genel Özellikleri..... | 15 |
| 1.4.2. Oligopeptidazlar | 17 |
| 1.4.3. Ekzopeptidazlar | 17 |
| 1.4.4. Omegapeptidazlar | 18 |
| 1.5. Proteazların Endüstriyel Kullanım Alanları | 19 |
| 1.5.1. Besin Endüstrisi | 22 |
| 1.5.2. Deterjan Endüstrisi | 22 |
| 1.5.3. Tekstil ve Deri Endüstrisi | 23 |
| 1.5.4. Peptit Sentezi | 24 |
| 1.5.5. Terapötik Uygulamalar | 24 |
| 1.5.6. Gümüş Geri Kazanımı | 25 |
| 1.5.7. Atık Yönetimi | 25 |

| | | |
|---------|--|----|
| 1.6. | Biyoteknolojik Enzim Üretimi | 26 |
| 1.7. | Bakteriyel Ekspresyon Sistemlerinde Proteaz Ekspresyonu | 26 |
| 1.7.1. | <i>Bacillus subtilis</i> Protein Ekspresyon Sistemi | 27 |
| 1.8. | Çalışmanın Amacı | 30 |
| 2. | YAPILAN ÇALIŞMALAR..... | 31 |
| 2.1. | Suş ve Plazmitler | 31 |
| 2.2. | BHASP Proteininin Biyoinformatik Analizi | 31 |
| 2.3. | Genin Moleküler Karakterizasyonu..... | 31 |
| 2.3.1. | Primer Dizaynı..... | 31 |
| 2.3.2. | Genomik DNA İzolasyonu | 32 |
| 2.3.3. | BH0855 Geninin PZR ile Çoğaltılması ve pJET1.2/blunt Ara Vektöre Klonlanması..... | 33 |
| 2.3.4. | <i>E. coli</i> DH10 β Kimyasal Kompotent Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyon | 33 |
| 2.3.5. | Rekombinant Plazmidlerin Koloni PZR ve Restriksiyon Endonükleaz Analizi .. | 34 |
| 2.3.6. | BH0855 Geninin pMA0911 Protein Ekspresyon Vektörüne Klonlanması | 35 |
| 2.3.7. | <i>Bacillus subtilis</i> WB800 Transformasyonu İçin SP1 ve SP2 Besiyerlerinin Hazırlanması | 37 |
| 2.3.8. | pMA0911-BH0855 Plazmitinin <i>Bacillus subtilis</i> WB800 Suşuna Transformasyonu | 37 |
| 2.3.9. | Protein Ekspresyonu | 38 |
| 2.3.10. | Skim Milk Agar Kuyu Difüzyon Deneyi | 38 |
| 2.4. | Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu | 38 |
| 2.4.1. | Amonyum Sülfat Çöktürmesi | 38 |
| 2.4.2. | Protein Saflaştırılması..... | 38 |
| 2.4.3. | Protein Konsantrasyonu Tayini | 39 |
| 2.4.4. | SDS Poliakrilamid Jel Elektforezi ve Western Blot..... | 39 |
| 2.4.5. | Tirozin Standart Eğrisinin Hazırlanması | 40 |
| 2.4.6. | Proteaz Aktivite Tayini..... | 41 |
| 2.4.7. | Proteaz Aktivitesinin Hesaplanması | 42 |
| 2.4.8. | Enzimin optimum pH'ın Belirlenmesi..... | 43 |
| 2.4.9. | Enzimin Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi..... | 43 |
| 2.4.10. | Enzimin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi..... | 43 |
| 2.4.11. | Enzimin Sıcaklık Kararlılığının Belirlenmesi | 44 |

| | | |
|----------|--|----|
| 2.4.12. | Enzimin pH Kararlılığının Belirlenmesi..... | 44 |
| 2.5. | Kan Lekesi Gideriminde Safılaştırılmış Enzim Uygulaması..... | 44 |
| 3. | BULGULAR | 45 |
| 3.1. | BHASP Proteininin Biyoinformatik Analizi | 45 |
| 3.2. | Genin Moleküler Karakterizasyonu..... | 50 |
| 3.2.1. | Genomik DNA İzolasyonu | 50 |
| 3.2.2. | BH0855 Geninin PZR ile çoğaltılması ve pJET 1.2/blunt Ara Vektöre Klonlanması | 51 |
| 3.2.3. | Rekombinant Plazmitlerin Koloni PZR ve Restriksiyon Endonükleaz Analizi ... | 51 |
| 3.2.4. | BH0855 Geninin pMA0911 Ekspresyon Vektörüne Klonlanması | 53 |
| 3.2.5. | pMA0911 – BH0855 Plazmidinin <i>B. subtilis</i> WB800 Suşuna Transformasyonu | 54 |
| 3.2.6. | Skim Milk Agar Kuyu Difüzyon Deneyi..... | 55 |
| 3.3. | Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu | 56 |
| 3.3.1. | Protein Konsantrasyon Tayini | 56 |
| 3.3.2. | SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ve Western Blot Analizi..... | 56 |
| 3.3.3. | Tirozin Standart Eğrisinin Hazırlanması | 58 |
| 3.3.4. | Enzimin Optimum pH'ının Belirlenmesi..... | 58 |
| 3.3.5. | Enzimin Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi..... | 59 |
| 3.3.6. | Enzimin <i>K_m</i> ve <i>V_{max}</i> Değerlerinin Belirlenmesi..... | 60 |
| 3.3.7. | Enzimin Sıcaklık Kararlılığının Belirlenmesi | 60 |
| 3.3.8. | Enzimin pH Kararlılığının Belirlenmesi..... | 61 |
| 3.4. | Kan Lekesi Gideriminde Safılaştırılmış Enzim Uygulaması..... | 62 |
| 4. | TARTIşMA | 63 |
| 5. | SONUÇLAR..... | 70 |
| 6. | ÖNERİLER..... | 71 |
| 7. | KAYNAKLAR..... | 72 |
| 8. | EKLER..... | 80 |
| ÖZGEÇMİş | | |

Doktora Tezi

ÖZET

BACILLUS HALODURANS G125 ALKALİN SERİN PROTEAZININ ÜREİMİ,
KARAKTERİZASYONU VE DETERJAN KATKI MADDESİ OLARAK
KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

Aşkın TEKİN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Kazım SEZEN
2020, 79 Sayfa, 2 Ek Sayfa

Mikrobiyal proteazlar en önemli hidrolitik enzimler arasındadır, ticari değere sahiptirler ve çeşitli endüstrilerde uygulama alanları vardır. Dünya genelinde ticari proteazların üçte ikilik kısmı mikroorganizma kaynaklıdır. Alkalın proteazların önemli üreticileri bakteriler, özellikle de *Bacillus* türleridir. Bu çalışmanın amacı *B. halodurans* C-125 suşunda bulunan bir alkalın serin proteaz kodlayan BH0855 genini klonlamak, hücre dışı sekiz proteaz geni silinmiş *B. subtilis* WB800 konak hücresinde üretimini artırmak ve fiziko-kimyasal özelliklerini karakterize etmektir. BH0855 geni 1083 nükleotit olup, 361 amino asit uzunluğundadır pre-pro-protein enzimi (24-aa sinyal peptit, 69-aa propeptit ve 268-aa olgun peptit) kodlamaktadır. Tahmini moleküler ağırlığı 27,67 kDa ve izoelektrik noktası 9.47'dir. Rekombinant gen bölgesi cat promotörü ve lipA sinyal peptidi ieren pMA0911 mekik vektörüne başarılı şekilde klonlandı ve *Bacillus subtilis* WB800 suşunda hücre dışı olarak ekspres edildi. Çalışılan gene ait amino asit sekansının en fazla %65,4 oranı ile *B. lentus* proteazına (PDB ID: 1GCI) benzediği belirlendi. Enzim pH 12 ve 60 °C'de optimum aktivite gösterdi ve geniş bir pH ve sıcaklık aralığında aktifti. Enzim, 60 °C'de 1 saat ön inkübasyondan sonra başlangıç aktivitesinin yaklaşık %60'ını korudu. Enzim, pH 12'de, 37 °C'de 24 saat'lik ön inkübasyondan sonra başlangıç aktivitesinin %93'ünden fazlasını koruyarak yüksek pH'ta iyi bir stabilite gösterdi. Enzimin K_m ve V_m değerleri sırasıyla 0,2899 mg/mL ve 76,12 U/ml olarak hesaplandı. Üretilen proteazın sahip olduğu ekstrem özellikler sebebiyle çeşitli alanlarda özellikle de deterjan endüstrisinde kullanılabilirliği gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Heterolog Protein Ekspresyonu, Alkalın Serin Proteaz, *Bacillus subtilis* WB800, *Bacillus halodurans* C-125

PhD Thesis

SUMMARY

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF BACILLUS HALODURANS C-125
ALKALINE SERINE PROTEASE AND INVESTIGATION OF USING AS
DETERGENT ADDITIVE

Aşkın TEKİN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Kazım SEZEN
2020, 79 Pages, 2 Pages Appendix

Microbial proteases are among the most important hydrolytic enzymes and have commercial value and multiple applications in various industries. Two-thirds of commercial proteases worldwide originate from microorganisms. The major producers of commercial alkaline proteases are bacteria, especially *Bacillus* species. The purpose of this study was to clone BH0855 gene encoding alkaline serine protease (BHASP) from *B. halodurans* C-125 strain, to enhance its production in *B. subtilis* WB800, which is deficient in eight extracellular proteases, and characterize its physicochemical properties. BH0855 gene is 1083 nucleotides, encoding a 361 amino acid pre-pro-protein enzyme (24-aa pre-signal peptide, 69-aa pro-peptide and 268-aa mature protein). It has a predicted molecular mass of 27.67 kDa and pI 9.47). The recombinant gene was successfully cloned into a shuttle vector PMA091 under the control of cat promoter and signal peptide LipA and extracellularly expressed in *Bacillus subtilis* WB800 strain. The deduced amino acid sequence has the highest homology of 65.4% with *B. lentus* protease (PDB ID:1GCI). The enzyme showed activity in a broad range of pH values and temperatures, with an optimum pH of 12 and a temperature of 60 °C. This enzyme retained nearly 60% of its initial activity after preincubation for 1h at 60 °C. The enzyme showed good stability at high pH, maintaining more than 93% of the initial activity after 24 hours pre-incubation at 37 °C and pH 12. The *K_m* and *V_m* values of the enzyme were calculated as 0,2899 mg/mL and 76.12 U/ml, respectively. Due to the extreme properties of the protease, its usability has been demonstrated in various fields, especially in the detergent industry.

Key Words: Heterolog Protein Expression, Alkaline Serine Protease, *Bacillus subtilis* WB800, *Bacillus halodurans* C-125

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

| | | |
|-----------|--|----|
| Şekil 1. | Peptit hidroliz mekanizması..... | 4 |
| Şekil 2. | Peptidazlar için enzim isimlendirme önerileri | 9 |
| Şekil 3. | Subtilisin BPN’de katalitik üçlü | 12 |
| Şekil 4. | Pre-pro Subtilisin E’nin primer yapısının şematik gösterimi | 12 |
| Şekil 5. | Subtilisinin oksidasyon çukuru ve katalitik triadı..... | 13 |
| Şekil 6. | Subtilisin ve sığır tripsininin üst üste bindirilmesi | 14 |
| Şekil 7. | Serin proteaz çalışma mekanizması | 15 |
| Şekil 8. | Bazı peptidazların katalitik aktiviteleri..... | 18 |
| Şekil 9. | Omega peptidaz katalitik aktivitesine ait bazı örnekler..... | 19 |
| Şekil 10. | Enzim satışlarının dağılımı. | 19 |
| Şekil 11. | Heterolog protein üretiminde verimi etkileyen faktörlerin şematik gösterimi .. | 29 |
| Şekil 12. | Koloni PZR protokolü | 35 |
| Şekil 13. | pMA0911 ekspresyon vektörü haritası | 36 |
| Şekil 14. | Proteaz aktivite tayini. | 42 |
| Şekil 15. | BHASP’ının primer yapısının şematik gösterimi | 45 |
| Şekil 16. | Çeşitli bakteri türlerinden elde edilen proteazların benzerlik ağacı | 45 |
| Şekil 17. | BHASP’ının ikincil yapı elemanlarını ve konumlarını gösteren topolojik haritası | 46 |
| Şekil 18. | BHASP’ının 3 boyutlu yapı modellemesi..... | 47 |
| Şekil 19. | BHASP’ının yapısındaki Ca ⁺² bağlanma bölgeleri..... | 47 |
| Şekil 20. | Ramachandran plot analizi | 48 |
| Şekil 21. | BHASP’ının rezidü bazlı moleküler dinamiği..... | 48 |
| Şekil 22. | BHASP’ının 3 boyutlu yapısındaki RMSF dalgalanmaları..... | 49 |
| Şekil 23. | BHASP ve 1GCI proteinlerinin 3 boyutlu yapılarının üst üste karşılaştırılması... | 49 |
| Şekil 24. | PDB veritabanında BHASP’ına en çok benzeyen proteinlerin listesi | 50 |
| Şekil 25. | <i>Bacillus halodurans</i> C –125 genomik DNA’sının jel görüntüsü..... | 50 |
| Şekil 26. | BH0855 geninin bakteri genomundan PZR ile çoğaltılması | 51 |
| Şekil 27. | Gen spesifik primerler ile gerçekleştirilen PZR sonucu pozitif sinyal veren koloniler..... | 52 |
| Şekil 28. | BH0855 geninin pJET 1.2/blunt transfer vektöründe plazmit kesimi ile doğrulanması | 52 |

| | |
|--|----|
| Şekil 29. Rekombinat plazmit pMA0911-BH0855'nin konstrüksiyonu..... | 53 |
| Şekil 30. BH0855 geninin pMA0911 ekspresyon klonunun restriksiyon enzimleri ile doğrulanması | 54 |
| Şekil 31. Rekombinant WB800 hücrelerinde protein hidrolizi..... | 55 |
| Şekil 32. Hücre dışı proteaz ekspresyonun skim milk agarda görüntülenmesi..... | 55 |
| Şekil 33. BSA standart eğrisi | 56 |
| Şekil 34. Üretilen proteinlerin gümüş nitrat boyama yöntemi ile gösterilmesi | 57 |
| Şekil 35. BH0855 geninin kodladığı serin proteazın western blot analizi ile gösterilmesi | 57 |
| Şekil 36. Tirozin standart eğrisi | 58 |
| Şekil 37. BHASP'ının optimum pH grafiği | 59 |
| Şekil 38. BHASP'ının optimum sıcaklık grafiği..... | 59 |
| Şekil 39. BHASP'ına ait Michaelis-Menten grafiği | 60 |
| Şekil 40. BHASP'ının ısıl kararlılık grafiği..... | 61 |
| Şekil 41. BHASP'ının pH kararlılık grafiği..... | 61 |
| Şekil 42. BHASP için yıkama testi örnekleri..... | 62 |

TABLULAR DİZİNİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| Tablo 1. Endüstriyel enzim sınıfları..... | 2 |
| Tablo 2. Proteaz üreten başlıca bakteri türleri | 6 |
| Tablo 3. Alkalın proteaz üreten <i>Bacillus</i> türleri..... | 7 |
| Tablo 4. MEROPS veritabanındaki proteolitik enzimler ve protein inhibitörleri için protein-tür, aile ve klan sayıları | 8 |
| Tablo 5. Serin proteaz klanları..... | 10 |
| Tablo 6. <i>Bacillus</i> cinsine ait alkalın proteazların bazı özellikleri | 17 |
| Tablo 7. Ticari bakteriyal alkalın proteazlar | 20 |
| Tablo 8. BH0855 genine ait primer dizileri. | 32 |
| Tablo 9. BH0855 geni için PZR şartları. | 33 |
| Tablo 10. Koloni PZR şartları..... | 34 |
| Tablo 11. pMA0911 ekspresyon vektörüne ligasyon için gerekli şartlar | 36 |
| Tablo 12. Tirozin standart eğrisi için reaksiyon şeması. | 41 |

SEMBOLLER DİZİNİ

| | |
|-----------------|-----------------------------------|
| μg | : Mikrogram |
| μl | : Mikrolitre |
| μM | : Mikromolar |
| μmol | : Mikromol |
| aa | : Aminoasit |
| bp | : Baz çifti |
| DH10B | : <i>E. coli</i> suşu |
| DNA | : Deoksiribo nükleik asit |
| dNTP | : Deoksiribo Nükleotit Tri Fosfat |
| GST | : Glutation S Transferaz |
| IgG | : Immünoglobulin G |
| kbp | : Kilobaz çifti |
| kDa | : Kilodalton |
| K_m | : Michaelis sabiti |
| M | : Molar |
| MCS | : Çoklu klonlama bölgesi |
| mg | : Miligram |
| ml | : Mililitre |
| mM | : Milimolar |
| MEROPS | : Peptidaz veri tabanı |
| ng | : Nanogram |
| OD | : Optik yoğunluk |
| ORF | : Açık okuma dizisi |
| pET-28 a (+) | : Ekspresyon vektörü |
| PCR | : Polimeraz zincir reaksiyonu |
| pJET1.2/blunt | : Klonlama vektörü |
| pGEX-2T | : GST füzyon vektörü |
| PMSF | : Phenylmethylsulfonly fluoride |
| pMA0911 | : Mekik vektörü |
| PMSF | : Phenylmethylsulfonly fluoride |

rpm : Dakikadaki devir sayısı
SDS : Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE : Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
U : Ünite
Vmax : Maksimum hız



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Alman fizyolog Wilhelm Kühne tarafından 1878'de, mayanın şekerlerden alkol üretme kabiliyetini tanımlarken kullanılan “Enzim” kelimesi, Yunanca en (içinde) ve zume (maya) kelimelerinden türetilmiştir (Robinson, 2015). Enzimler, neredeyse tüm fizyolojik kimyasal reaksiyonlara aracılık eden çoğu protein yapısında olan (ribozimler gibi RNA molekülleri hariç) biyolojik katalizörlerdir. Bu katalizörler substratlar üzerinde çalışır ve onları ürünlere dönüştürürler. Her katalizör gibi enzimler de bir tepkimenin aktivasyon enerjisini azaltarak çalışır ve böylece tepkime hızını çarpıcı şekilde artırır. Bazı enzimler aktiviteleri için bir vitamin, metal veya başka bir kofaktöre ihtiyaç duyarlar. Birçok farklı kimyada performans gösterebilen enzimler büyük ölçekte üretilebilir ve tipik olarak çevre sıcaklıklarında ve nötr pH'a yakın olarak çalışabilirler. Bu özellikleri nedeniyle enzimler, son yüzyılda bilim insanlarının ve mühendislerin dikkatini çekmiş ve endüstriyel katalizörler olarak pratikte kullanılmalarını sağlamıştır (Roskoski, 2015).

Endüstriyel enzimler aşağıdaki özelliklere sahiptir;

1. Tipik olarak spesifiktirler ve bu nedenle istenmeyen yan reaksiyonların oluşumunu en aza indirirler,
2. Nispeten ucuzdurlar ve ılımlı koşullar altında performans gösterebilirler,
3. Kimyasal dönüşümler için etkilidirler,
4. Yaygın şekerlerden ve diğer yenilenebilir substratlardan fermantasyon yoluyla büyük ölçekte üretilebilirler,
5. Belirli bir uygulamaya uyacak şekilde tasarlanabilir ve geliştirilebilirler,
6. Temizlik, gıda işlemleri, biyoyakıt üretimi ve tıbbi tedaviler gibi uygulamalar için güvenli kabul edilebilirler,
7. Çok çeşitli konsantrasyonlarda etkilidirler (Garske vd., 2017).

3000'den fazla farklı enzim izole edilmiş ve tanımlanmış olmasına rağmen, endüstriyel uygulamalarda 100'den azı kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan endüstriyel enzimlerin, substrat ve ürünleri Tablo 1'de listelenmiştir.

Tablo 1. Endüstriyel enzim sınıfları (Garske vd., 2017).

| Enzim Sınıfı | Substrat | Ürün |
|------------------------|--|----------------------------------|
| Amilaz | α - 1,4 glikozidik bağ (nişasta) | Maltodekstrinler, maltoz, glikoz |
| Katalaz | Hidrojen peroksit | Su ve oksijen |
| Selülaz | β - 1,4 glikozidik bağ (selüloz) | Sellooligosakkaritler, sellobioz |
| Glukoamilaz | α - 1,4/6 glikozidik bağ (nişasta) | D- glukoz |
| Glukoz izomeraz | D- glikoz | D- fruktoz |
| Glukoz oksidaz | D- glukoz | D- glukonolakton |
| Hemiselülaz | β - 1,4 glikozidik bağ (hemiselüloz) | Oligo- ve disakkaritler, ksiloz |
| Lipaz | Yağ asidi esterleri | Yağ asitleri, gliserol |
| Pektinaz | Pektin | Pektin oligosakkaritler |
| Fosfolipaz | Fosfolipitler | Yağ asitleri, gliserol fosfat |
| Fitaz | İnositol fosfat esterleri | İnositol, fosfat |
| Proteaz | Peptid bağları | Peptidler, aminoasitler |
| Pullulanaz | α - 1,6 glikozidik bağları (amilopektin) | Amiloz |

E.C 3.4 Hidrolazlar sınıfına ait olan proteazlar, dünya pazarının %65'inden fazlasını oluşturan en büyük endüstriyel enzim grubunu oluşturmaktadır (Mehtani vd., 2013). Gıda, ilaç, deri ve tekstil gibi bazı büyük endüstriler, bu enzimlerin ana kullanıcılarıdır. Son yıllarda endüstriyel uygulamalarda alkalın proteaz kullanımı hızlı bir şekilde artmıştır. Uygulamaların zor koşullarına dayanabilecek istikrarlı biyokatalizörlere olan talep arttıkça, yeni uygulamaların bugün ve gelecekte de büyümeye devam etmesi beklenmektedir. Mikrobiyal kaynaklı saflaştırılmış proteazlar, dünya genelindeki toplam enzim satışının yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır (Rao vd., 1998). Birçok bakteri cinsi yaygın şekilde proteaz üretme yeteneğine sahip olsa da, *Bacillus* cinsi üyeleri, izolasyon kolaylığı ve kolay kültüre edilebilme özellikleri sebebi ile sahip oldukları proteazlar için ticari açıdan yaygın şekilde kullanılan gruptur (Razzaq vd., 2019).

Mikroorganizmalar kolay, kısa süreli ve ucuz şekilde kültüre edilebilmeleri sebebi ile proteazlar için en önemli kaynağı oluşturmaktadır. Ayrıca, mikrobiyal peptidazlar nispeten yüksek kararlılıkları sayesinde, uygun koşullarda uzun sürelerce aktivitelerini kaybetmeden saklanabilmektedir. Bununla birlikte, mikroorganizmalar tarafından üretilen ve çeşitli katalitik aktivitelere sahip enzimler, doğal katalizin ihtiyaçlarını karşılamak için evrimleşmiş bu nedenle her zaman endüstriyel uygulamalar için uygun değildirler. Çünkü

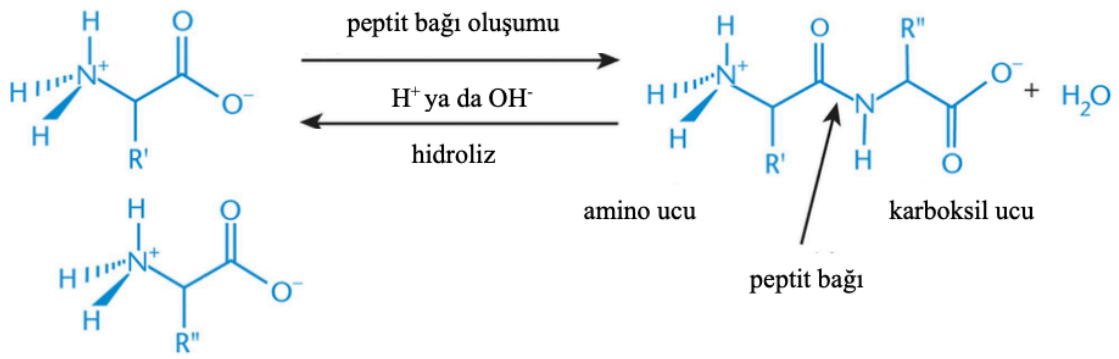
doğal olarak oluşan enzimler operasyonel endüstriyel koşullar altında genellikle düşük tekrarlanabilirlik, düşük verim ve her zaman optimum olmayan performans gösterirler. Ayrıca doğal enzimler, doğal kaynaklardan, endüstriyel kullanım için yeterli miktarlarda elde edilememektedir. Sonuç olarak, ekonomik ve yüksek verimde enzim üretimi için yeni ve daha verimli metodolojilerin kurulmasına, endüstriyel kullanım için daha uygun olabilecek yeni enzimatik varyantların tanımlanmasına veya üretilmesine artan bir ilgi vardır. Yenilikçi rekombinant DNA teknolojileri ve protein mühendisliğindeki gelişmelerin, bu zorlukların üstesinden gelmek için yeterli ilerlemeleri ortaya koymada etkili oldukları görülmüştür. Heterolog ekspresyon sistemleri, rekombinant enzimlerin fazla üretilmesi için giderek daha fazla kullanılmakta, böylece doğal enzimlerin üretimi ile ilgili kısıtlamaların üstesinden gelmede büyük kolaylık sağlamaktadır. Bir proteazı kodlayan genin izolasyonu ve klonlanması mikroorganizmaların mühendisliğinde ilk adımı oluşturmaktadır. Çeşitli konaklarda bazı proteaz kodlayan bakteri genleri klonlanmış ve ekspres edilmiştir. Klonlama ve yüksek ekspresyon için tercih edilen iki ana organizma *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis*'tir (Trono, 2019). Yakın geçmişte yapılan çalışmalara bakıldığında, proteazlarla ilgili yapılan karakterizasyon çalışmalarının büyük çoğunluğunun enzimin bakteri kültür ortamından geleneksel yöntemlerle saflaştırılması ile yürütüldüğü görülmektedir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında bu araştırmada endüstriyel açıdan en önemli ve en büyük enzim grubu olan proteaz ailesine ait *B. halodurans* C-125 alkalın serin proteaz geninin *B. subtilis* ekspresyon sisteminde aşırı üretilmesi, karakterize edilmesi ve endüstriyel açıdan kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.2. Proteazlar

Proteazlar, hem fizyolojik hem de endüstriyel uygulamaları sebebi ile önemli bir pozisyonda bulunan enzim sınıfıdır. Proteazlar, peptit bağlarının proteinlerdeki bölünmesini katalize ederler. Proteazlar, proteinlerin toplam hidrolizini katalize eden parçalayıcı enzimlerdir (Şekil 1).

Analitik tekniklerdeki gelişmeler, proteazların, enzimlerin zimojenik formlarının sınırlı proteoliz ile aktivasyonu, kanın pıhtılaşması ve fibrin pıhtılarının parçalanması, salgı proteinlerinin membranlar boyunca işlenmesi ve taşınması gibi proteinlerin oldukça spesifik ve seçici modifikasyonlarını gerçekleştirdiğini göstermiştir (Rao vd., 1998).



Şekil 1. Peptit hidroliz mekanizması.

Proteazlar, hayvan, bitki ve mikroorganizmaların oluşturduğu dünyadaki mevcut yaşamın ayrılmaz bir bileşenidir. Bir fermentasyon işlemi ile yüksek substrat özgüllüğü ve katalitik aktivite sergileyen proteazlar nispeten daha kısa bir sürede izole edilmekte ve saflaştırılabilmektedir. Proteazların patojen organizma genomunun %1–5'ini ve insan genomunun %2'sini oluşturduğu tahmin edilmektedir. Araştırmacılara göre, proteazlar fizyolojik süreçleri düzenlemek için diğer proteinlerin aktivasyonunu, sentezini ve dönüşümünü kontrol ederler. Oluşum, doğum, yaşlanma ve hatta ölüm gibi farklı fizyolojik süreçler proteazlarla düzenlenir. Proteazlar yaşam döngüsündeki önemli rollerinden dolayı bulaşıcı hastalıkların taklit ve yayılmasında hayati öneme sahiptirler (Razzaq vd., 2019).

1.3. Proteaz Kaynakları

Proteazlar canlı organizmalar için fizyolojik olarak gerekli olduklarından bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi çok çeşitli yaşam formları tarafından üretilirler.

1.3.1. Bitki Proteazları

Bitki proteazları yaygın şekilde besin ve ilaç sanayinde kullanılmaktadır. En yaygın araştırılan bitki proteazları *Ananas comosus*, *Ficus carica* ve *Carica papaya*'dan elde edilen bromelain, fisin ve papain'dir. Bu proteazlar, mayalama, et yumuşatma, süt koagülasyonu, sindirim, viral ve kanser tedavisi gibi farklı uygulamalarda kullanılırlar. Diğer önemli bitkisel proteazlar olan keratinazlar, kıl ve yünden temel amino asitleri elde etmek için

parçalamada ve atık su sistemlerinin tıkanmasının engellenmesinde kullanılırlar (Singh vd., 2016).

1.3.2. Hayvan Proteazları

En çok kullanılan hayvansal proteazlar pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve renindir. Sindirim enzimi olan tripsin zararlı böceklerin biyolojik kontrolünde, mikroorganizma çoğaltma besini ve birkaç tıbbi uygulamada kullanılır. Kimotripsin ve renin lor hazırlanmasında ve süt proteini hidrolizatlarının alerjenliğinin giderilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Singh vd., 2016).

1.3.3. Mikrobiyal Proteazlar

Proteazlar, prokaryotik ve ökaryotik organizmaları da içeren dünyadaki tüm yaşam biçimlerinin temel bileşenidir. Bitkisel ve hayvansal proteazların dünyadaki mevcut talepleri karşılamadaki yetersizliği, mikrobiyal proteazlara ilginin artmasını sağlamıştır. Mikroorganizmalar kısa zamanda büyük miktarda üreyebilmeleri, geniş biyokimyasal çeşitlilikleri, genetik manipülasyonlara uygunlukları ve biyoteknolojik uygulamalar için arzu edilen özelliklere sahip olmaları ile mükemmel bir enzim kaynağını temsil ederler. Proteazlar yaygındırlar ve protozoa, bakteri, maya ve mantar gibi birçok mikroorganizmada bulunurlar (Yimer, 2014).

Mikroorganizmalar hücre içi ve/veya hücre dışı çok çeşitli proteazlar üretirler. Hücre içi proteazlar, sporlanma, farklılaşma, protein dönüşümü, enzimlerin ve hormonların olgunlaşması ve hücrel protein havuzunun sürdürülmesi gibi çeşitli hücrel ve metabolik işlemler için önemlidir. Hücre dışı proteazlar ise, hücrel ortamlarda proteinlerin hidrolizi için önemlidir ve hücrenin hidrolitik ürünleri içine almasına ve kullanmasına olanak sağlarlar. Aynı zamanda hücre dışı proteazlardan, çeşitli endüstriyel işlemlerde protein parçalanmasına destek olmak için ticari olarak faydalanılmıştır (Gupta vd., 2002b). Ticari proteazların çoğu bakteri kökenlidir. Proteazlar *Bacillus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium*, *Clostridium*, *Staphylococcus aureus*, *Achromobacter*, *Thermoactinomyces* ve *Streptomyces* gibi çeşitli bakteriler tarafından üretilmektedir (Tablo 2) (Yimer, 2014).

Tablo 2. Proteaz üreten başlıca bakteri türleri (Jisha vd., 2013).

| Bakteri türleri | |
|--|--|
| <i>Alteromonas</i> sp. | <i>Streptomyces rectus</i> |
| <i>Arthrobacter protophormiae</i> | <i>S. rectus</i> var. <i>proteolyticus</i> |
| <i>Brevibacterium linens</i> , | <i>S. rimosus</i> |
| <i>Hyphomonas jannaschiana</i> VP 3 | <i>Streptomyces</i> sp. YSA-130 |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> | <i>Thermoactinomyces</i> sp. |
| <i>Malbrancheapulchella</i> var. <i>sulfurea</i> | <i>T. thalpophilus</i> THM1 |
| <i>Microbacterium</i> sp. | <i>Thermobacteroides proteolyticus</i> |
| <i>Nocardiopsis dassonvillei</i> | <i>Thermococcus celer</i> |
| <i>Oerskoviaxanthineolytica</i> TK-1 | <i>T. stetteri</i> |
| <i>Pimelobacter</i> sp. 2483 | <i>T. litoralis</i> |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Thermomonospora fusca</i> |
| <i>P. maltophilia</i> | <i>Thermus aquaticus</i> YT-1 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. SJ320 | <i>Thermus</i> sp. Rt41A |
| <i>Salinivibrio</i> sp. AF-2004 | <i>Torula thermophila</i> |
| <i>Staphylothermus marinus</i> | <i>Vibrio alginolyticus</i> |
| <i>Streptomyces</i> sp. EGS-5 | <i>V. metschnikovii</i> RH 530 |
| <i>S. microflavus</i> | <i>Xanthomonas maltophila</i> |
| <i>S. moderatus</i> | |

Bakteriler, en dikkat çeken kaynak olan *Bacillus* cinsi ile birlikte, en baskın alkalın proteaz üreten organizma sınıfıdır. Birçok farklı egzotik ortamdan sayısız *Bacillus* türü araştırılmış ve alkalın proteaz üretimi için kullanılmıştır. *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquifaciens* ve *B. mojavensis* potansiyel alkalın proteaz üreten basil türleridir (Tablo 3) (Gupta vd., 2002a).

Tablo 3. Alkalın proteaz üreten *Bacillus* türleri (Jisha vd., 2013).

| <i>Bacillus</i> sp. ve suşları | |
|--|---|
| <i>Bacillus alcalophilus</i> ATCC 21522 | <i>B. pumilus</i> CBS |
| <i>B. alcalophilus</i> subsp. <i>halodurans</i> KP1239 | <i>B. sphaericus</i> |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> | <i>B. subtilis</i> |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> S94 | <i>B. subtilis</i> var. <i>amylosacchariticus</i> |
| <i>B. cereus</i> CA15 | <i>B. subtilis</i> DKMNR |
| <i>B. circulans</i> | <i>Bacillus</i> sp. Ya-B |
| <i>B. coagulans</i> PB-77 | <i>Bacillus</i> sp. NKS-21 |
| <i>B. firmus</i> | <i>Bacillus</i> sp. B21-2 |
| <i>B. intermedius</i> | <i>Bacillus</i> sp. Y |
| <i>B. lentus</i> | <i>Bacillus</i> sp. CW-1121 |
| <i>B. licheniformis</i> | <i>Bacillus</i> sp. KSM-K16 |
| <i>B. licheniformis</i> UV-9 Mutant | <i>B. thermoruber</i> BT2T |
| <i>B. megaterium</i> | <i>B. stearothermophilus</i> |
| <i>B. proteolyticus</i> | <i>Bacillus</i> sp. B001 |
| <i>B. pumilus</i> | |

Bacillus proteazları çoğunlukla alkalidirler ve pH 7'nin üzerinde aktivite gösterirler. Uygulama alanları, biyokimyasal, katalitik ve kinetik parametreleri dikkate alındığında karakterizasyonlarının yapılması önemlidir. Bu sebeple farklı pH değerlerine karşı toleransın yanında sıcaklık toleransı ve sıcaklık değerlerindeki enzim aktivitesinin kararlılığını içeren aktivite parametreleri, potansiyel enzim için kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. Bazı istisnalar dışında *Bacillus* proteazları, 27–71 kDa ağırlığında geniş bir alana yayılan moleküler ağırlığa, 6–10 aralığında optimal pH'a ve 37–60 °C aralığında optimal sıcaklığa sahiptirler. Ayrıca bu proteazlar geniş bir pH ve sıcaklık aralığında kararlılık göstermektedirler (Contesini vd., 2018).

1.4. Proteazların Sınıflandırılması

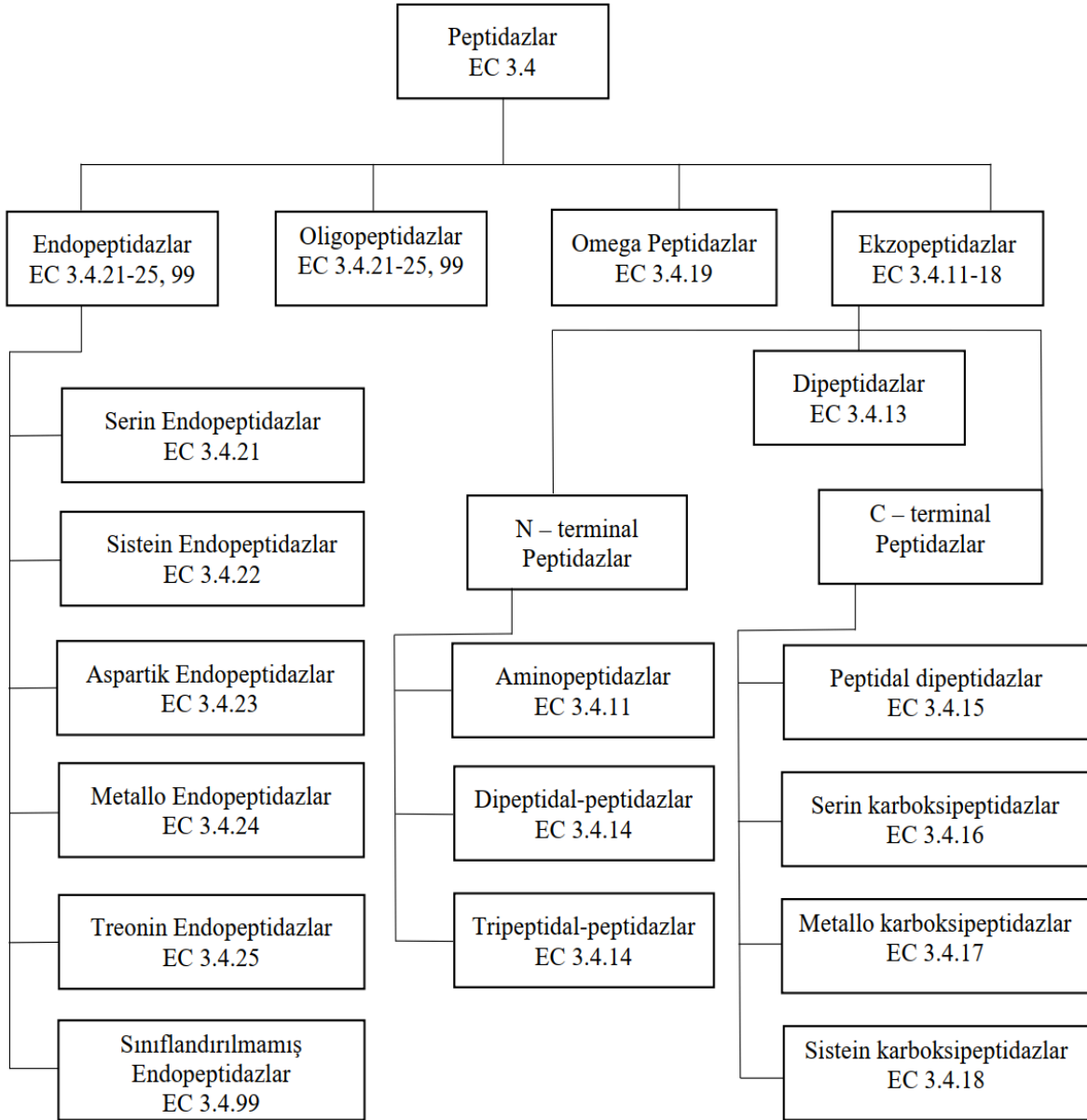
Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Terminoloji Komitesine göre, Proteazlar Grup 3' ün 4. alt grubunda (hidrolazlar) sınıflandırılmaktadır. Bununla birlikte proteazlar, geniş skaladaki etki ve yapı farklılıkları nedeniyle genel enzim isimlendirme sistemine kolayca uymamaktadır. Şu anda proteazlar üç ana kritere göre sınıflandırılmaktadır (i) katalize edilen reaksiyon tipi, (ii) katalitik bölgenin kimyasal yapısı ve (iii) yapıya atıfta bulunulan evrimsel ilişki (Rao vd., 1998).

MEROPS (the peptidase database, <https://www.ebi.ac.uk/merops/>) veritabanı proteazlar ve onları inhibe eden proteinler için önemli bir bilgi kaynağıdır. MEROPS veritabanı, proteazların hiyerarşik yapı temelli bir sınıflandırmasını kullanır. Her proteaz amino asit dizisindeki istatistiksel olarak anlamlı benzerliklere dayanarak bir aileye atanır ve homolog olduğu düşünülen aileler bir klanda gruplanır. MEROPS veritabanına göre bugüne kadar 3000'den fazla proteaz deneysel olarak çalışılmış ve sekanslanmıştır (Tablo 4) (Rawlings vd., 2018).

Tablo 4. MEROPS veritabanındaki proteolitik enzimler ve protein inhibitörleri için protein-tür, aile ve klan sayıları (Rawlings vd., 2018).

| | Proteaz | İnhibitör |
|--|----------------|------------------|
| Sekans | 908.326 | 134.011 |
| Belirleyici | 5.267 | 868 |
| Deneysel olarak karakterize edilmiş ve sekanslanmış | 3.181 | |
| Hipotetik (model organizmalardan) | 1407 | 0 |
| Proteaz ya da inhibitör olarak aktif değil | 357 | 115 |
| Deneysel olarak karakterize edilmiş ve sekanslanmamış | 215 | 0 |
| Yalancı gen | 72 | 0 |
| Birleşik ya da kompleks protein | 17 | 53 |
| Aile | 268 | 82 |
| Klan | 62 | 39 |

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Terminoloji Komitesi tarafından önerilen isimlendirme Şekil 2’de özetlenmiştir. Proteazlar etki yerlerine bağlı olarak Endopeptidazlar ve Ekzopeptidazlar olmak üzere iki büyük, Oligopeptidazlar ve Omega peptidazlar olmak üzere de iki küçük alt sınıfa ayrılmaktadır.



Şekil 2. Peptidazlar için enzim isimlendirme önerileri (NC-IUBMB).

1.4.1. Endopeptidazlar

Endopeptidazlar bir polipeptid zincirinin içindeki alfa peptit bağımlı hidroliz ederler ve bunu N- ya da C- ucundan uzakta yapma eğilimindedirler. Serbest amino veya karboksil grubunun varlığı, enzim aktivitesi üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir. Pepsin, papain ve kimotripsin endopeptidazlar için en bilinen örneklerdir. Endopeptidazlar salgılanmış proteinlerden sinyal peptidlerinin uzaklaştırılması (sinyal peptidaz I), öncü proteinlerin olgunlaşması (enteropeptidaz) gibi proteolizde sınırlı ve özel rollere sahiptirler. Endopeptidazlar katalitik mekanizmaları esas alınarak 6 aileye ayrılırlar: serin endopeptidazlar (EC 3.4.21), sistein endopeptidazlar (EC 3.4.22), aspartik endopeptidazlar (EC 3.4.23), metallo endopeptidazlar (EC 3.4.24), treonin endopeptidazlar (EC 3.4.25) ve sınıflandırılmamış endopeptidazlar (EC 3.4.99) (Ather, 2009; Rawlings vd., 2007; Rawlings, 2013).

İleri olarak endopeptidazlar belirli bir pH aralığındaki maksimum aktivitelere göre asidik proteazlar (pH 2–6), nötr proteazlar ve alkali proteazlar (pH 8–12) olmak üzere 3 grupta sınıflandırılırlar (Hamza, 2017).

1.4.1.1. Serin Proteazlar

Serin proteazlar, aktif bölgelerinde bir serin grubunun varlığı ile karakterize edilmektedir. Virüsler, bakteriler ve ökaryotlar arasında sayısız ve yaygın olup, organizmalar için hayati öneme sahip oldukları düşünülmektedir. Serin proteazlar, ekzopeptidaz, endopeptidaz, oligopeptidaz ve omega peptidaz gruplarında bulunmaktadır. Yapısal benzerliklerine dayanarak, serin proteazlar, klanlar ve aileler altında gruplandırılmışlardır (Tablo 5).

Tablo 5. Serin proteaz klanları (Xiang Qia vd., 2017).

| Klan | Aile | Aktif Bölge | Bakteri Dağılımı |
|--------|--|-------------|-------------------|
| PA (S) | S1, S3, S6, S7, S29, S31, S32, S39, S46, S55, S64, S65S,75 | His-Asp-Ser | S1, S6, S46, S55 |
| PB (S) | S45 | Ser | S45 |
| PC (S) | S51 | Ser-His-Glu | S51 |
| SB | S8, S53 | Asp-His-Ser | S8, S53 |
| SC | S9, S10, S15, S28, S33, S37 | Ser-Asp-His | S9, S10, S15, S33 |
| SE | S11, S12, S13 | Ser-Lys | S11, S12, S13 |
| SF | S24, S26 | Ser-Lys/His | S24, S26 |
| SH | S21, S73, S77, S78, S80 | His-Ser-His | S78 |
| SJ | S16, S50, S69 | Ser-Lys | S16 |
| SK | S14, S41, S49 | Ser-His-Asp | S14, S41, S49 |
| SO | S74 | Ser-Lys | - |
| SP | S59 | His-Ser | S59 |
| SR | S60 | Lys-Ser | S60 |
| SS | S66 | Ser-Glu-His | S66 |
| ST | S54 | Ser-His | S54 |

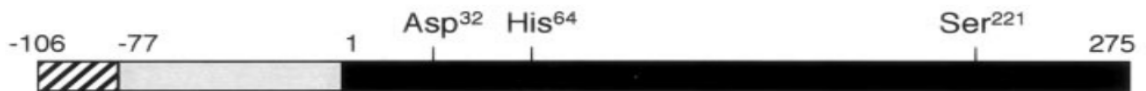
*MEROPS tabanına göre protein türleri aileler, aileler de klanlar içerisinde gruplandırılmıştır.

Kimotripsin (SA), Subtilisin (SB), Karboksipeptidaz C (SC) ve *Escherichia* D-Ala–D-Ala peptidaz A klanlarının temel yapıları tamamen ilişkisizdir ve bu durum serin proteazların en az dört evrimsel kökeni olduğunu göstermektedir. SA, SB ve SC klanları, ortak serin (nükleofil), aspartat (elektrofil) ve histidin (baz) katalitik üçlüsünü içeren ortak reaksiyon mekanizmasına sahiptirler (Mahajan ve Badgujar, 2010). Bu kalıntıların geometrik yönelimleri benzer olsa da protein kıvrımları oldukça farklı olup yakınsak evrimin tipik bir örneğini oluşturur. SE ve SF'nin (baskılayıcı LexA) klanlarının katalitik mekanizmaları, klasik Ser-His-Asp üçlüsüne sahip olmadıkları için SA, SB ve SE klanlarından farklıdır. Serin proteazların bir başka ilginç özelliği, Gly-Xaa-Ser-Yaa-Gly motifini oluşturmak için katalitik serin kalıntısı çevresindeki glisin kalıntılarının korunmasıdır (Rao vd., 1998). Şekil 3'te Subtilisin BPN'nin korunmuş bölgeleri gösterilmektedir.



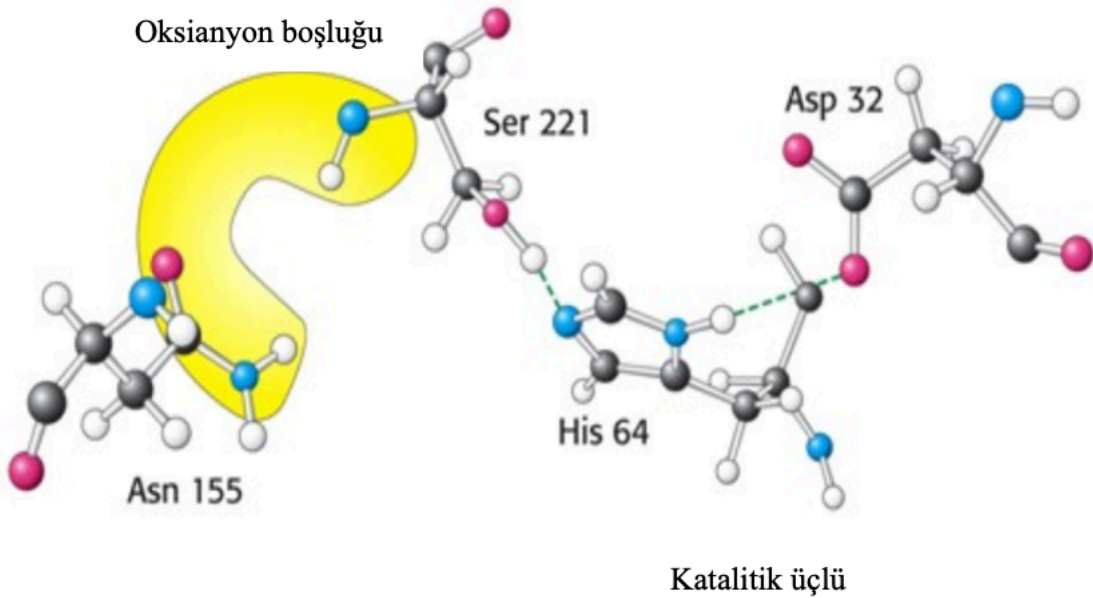
Şekil 3. Subtilisin BPN'de katalitik üçlü (Ser²²¹, His⁶⁴, Asp³²).

Prokaryotların ve ökaryotların salgılanan proteaz proteinleri, genellikle inaktif öncül formlarda sentezlenir. Bunlar daha sonra bir veya daha fazla peptid hidrolazın etkisiyle olgun enzim haline dönüştürülür. Örneğin, *Streptomyces griseus*'un kimotripsin benzeri proteazları pre-pro-öncü oluşumlar şeklinde sentezlenirken, polipeptitlerin sadece olgun (matüre) kısımları kültür süpernatantında görülür. Öncü polipeptitler, proteinin amino veya karboksil uçlarına eklenmiş sinyal dizilerine sahiptir. Sinyal dizileri, ortaya çıkan proteinlerin hücre yüzeyine yönlendirilmesinden sorumludur. Propeptidin öncü oluşum içindeki rolü daha az belirgindir. Son çalışmalar, protein katlanmasında, protein salgısında ve enzim aktivitesinin inhibisyonunda propeptidlerin rolünü göstermektedir. Bazı serin proteazların propeptidlerinin protein katlanmasında hız belirleyici bir basamağı katalize ettiği düşünülmektedir (Baardsnes vd., 1998). Şekil 4'te Subtilisin E'nin inaktif öncül hali şematize edilmiştir.

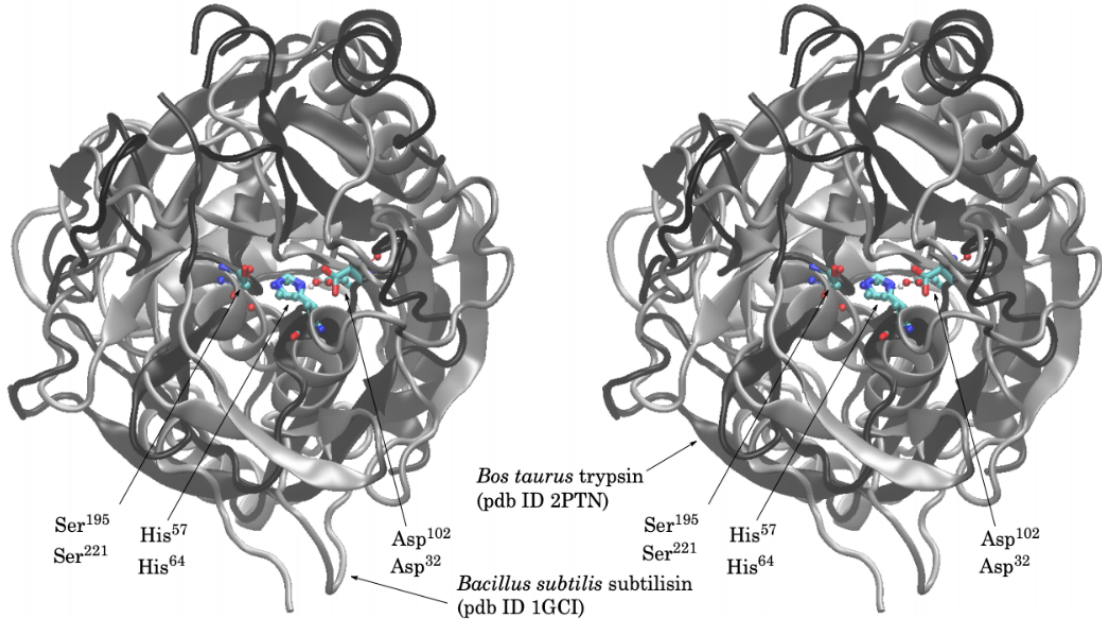


Şekil 4. Pre-pro Subtilisin E'nin primer yapısının şematik gösterimi. Taranmış kutu sinyal peptid, gri kutu propeptid ve siyah kutu olgun peptidi temsil etmektedir (Pulido vd., 2006).

Enzimlerin aktif bölgesinde bulunan birbirleriyle ilişkili üçlü amino asit grupları katalitik üçlü (triad) olarak isimlendirilmektedir. Katalitik üçlü, hidrolaz ve transferaz enzim gruplarında yaygın olarak bulunmaktadır. Bir klandan diğerine peptidazların katalitik mekanizmaları arasında benzerlikler olabilmektedir. Çoğu serin proteaz bir nükleofilik serin, baz olarak hareket eden bir histidin ve asit olarak hareket eden bir aspartattan oluşan bir katalitik üçlü içerir. Bu katalitik üçlüde Serin²²¹'in yan zinciri His⁶⁴'ün imidazol halkasına, His⁶⁴'ün imidazol halkası da Asp³²'nin karboksilat grubuna hidrojen bağı ile bağlıdır. Katalitik üçlü, enzimin yük röle ağı (charge relay network) olarak da bilinir. Subtilisinin oksidasyon çukuru ve katalitik üçlüsü Şekil 5'te gösterilmiştir. Katalitik üçlünün nükleofilik serini tarafından peptid bağının saldırıya uğraması, enzimin NH grupları (omurga ve Asn¹⁵⁵ yan zincirinin ikisinde de) tarafından dengede tutulan negatif bir yük ortaya çıkaracaktır. Bu mekanizma tripsin, subtilisin ve karboksipeptidaz Y gibi peptidazlarda görülür. Bir familyadan diğerine rezidülerin sırası farklılık gösterse de aktif bölge geometrileri üst üste örtüşecek kadar çok benzerdir. Subtilisin ve sığır tripsininin yapıları çok farklı olmasına rağmen, üç boyutlu uzayda çok benzer bir dizilişe sahiptirler (Şekil 6) (Rawlings, 2013).



Şekil 5. Subtilisinin oksidasyon çukuru ve katalitik üçlüsü (Berg vd., 2002).



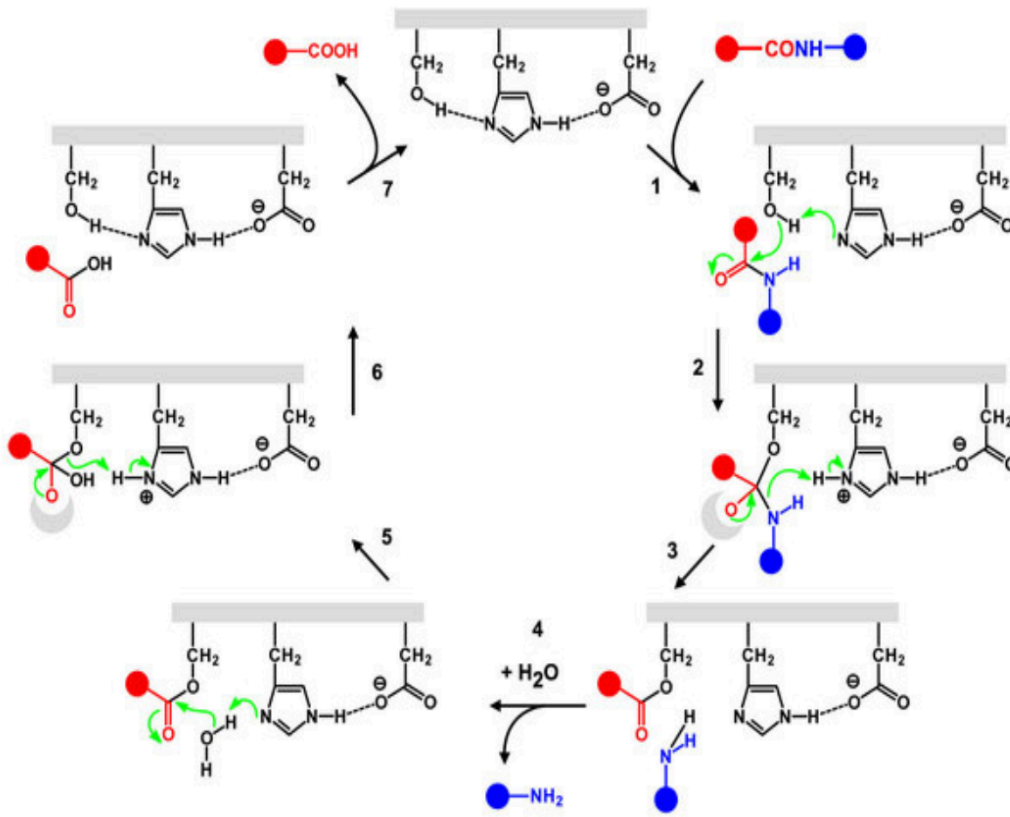
Şekil 6. Subtilisin ve sığır tripsininin üst üste bindirilmesi (Brandt, 2016).

1.4.1.2. Serin Proteaz Çalışma Mekanizması

Tüm proteazlar, bir peptid bağımlı hidrolize etmek için üç engelin üstesinden gelmelidir: (a) Amid bağları. Amid azotundan karbonil'e elektron bağı nedeniyle çok karardır. Karşılaştırma için; basit bir alkil ester, bir amid bağından 3 bin kat daha fazla reaktif iken, bir p-nitrofenil ester 300 bin kat daha fazla reaktiftir. Ayrıca rezonans stabilizasyonunu bozmak için peptid bağımlı bozabilir. (b) Su. Zayıf bir nükleofildir. Proteazlar, her zaman suyu genel bir baz ile aktive eder. (c) Aminler. Zayıf ayrılma gruplarıdır. Proteazlar atılmadan önce amini protonatlar. Serin proteazlar bu görevleri çok verimli bir şekilde yerine getirir. Serin proteazlarla peptid hidroliz oranları, katalizlenmemiş reaksiyonlardan 1,010 kat daha yüksektir. Açıkçası, bu kataliz mekanizmaları, peptid hidroliziyle sınırlı değildir. Serin proteazlar, amitler, anitler, esterler ve tioesterleri içeren diğer asil bileşiklerini de kolayca hidrolize edebilir (Hedstrom, 2002).

Serin proteazlar için ortak reaksiyon mekanizması Şekil 7'de gösterilmiştir. Enzimin aktif merkezi, Asp ve His arasındaki iyonik etkileşimler ve His ve Ser arasındaki H bağı ile dengede tutulur. Önce substrat bağlanır, serin oksijeninin peptid karbonil grubuna nükleofilik saldırısı açılasyon reaksiyonunu başlatır. Oluşan kararsız tetrahedral ara ürün, anyonik oksijeni koordine eden amid hidrojenleri tarafından dengede tutulur. Bu protein

alanı oksianyon boşluğu olarak bilinir. Peptid bağının kırılması ile tetrahedral ara ürün bir açıl-enzime dönüşür ve amino grubu substrat-enzim kompleksinden ayrılır. Katalitik olarak aktif histidinde bulunan su molekülünün nükleofilik saldırısı ile enzimin deaçilasyonu başlar. Ortaya çıkan hidroksil grubu karbonil karbonu ile kovalent bağ oluştururken, histidin protonlanır. Oluşan tetrahedral ara ürün oksianyon boşluğu tarafından tekrar kararlı hale getirilir. Son adımda, tetrahedral ara ürün serin hidroksil bağını kırarak ayrılır ve karboksilik asit ürünü aktif bölgeden ayrılır. Böylece enzim bir sonraki reaksiyon için hazır hale gelir.



Şekil 7. Serin proteaz çalışma mekanizması (Wieczorek vd., 2017).

1.4.1.3. Serin Alkalin Proteazların Genel Özellikleri

Bakteri, maya, küf ve mantar gibi çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen alkalin proteazlar, sahip oldukları özelliklere göre belirli uygulamalar için kullanılabilirler. Kapsamlı olarak çalışılmışlardır. Endüstriyel uygulamalarda kullanılacak proteazlar, nispeten sıcaklık, pH, inhibitör ve oksitleyici maddelerin olduğu uç koşullarda iyi

aktiviteye ve kararlılığa sahip olmalıdır. Bu nedenle, aday enzimler, endüstriyel uygulamalar için tasarlandığında hem işlem uygunluğuna hem de uzun süreli kararlılığa sahip olmalıdır. Herhangi bir araştırma faaliyetinin nihai amacı çeşitli uygulamalarda kullanılabilir bir güçlü bir enzim bulmaktır (Sharma vd., 2017). Alkalın proteazların bazı özellikleri Tablo 6’da özetlenmiştir.

Alkalın proteazlar çoğunlukla pH 8–12 ve 50°–70 °C aralığında aktiftirler. Optimal pH’ları, pH 12–13’e kadar optimal pH gösteren birkaç istisna dışında (*Bacillus* sp. YaB) 9–11 aralığında, isoelektrik noktaları 9 civarındadır. Alkalofilik *Bacillus* sp. B189’den elde edilen bir enzim ilginç şekilde 85 °C optimal sıcaklığa sahiptir. Moleküler ağırlıkları 15–45 kDa aralığındadır (Jisha vd., 2013; Shimogaki vd., 1991). 8 kDa’luk *Kurthia spiroforme* kaynaklı ve 90 kDa’luk *B. subtilis* natto serin proteazı gibi istisnalarda mevcuttur (Kato vd., 1992; Steele vd., 1992). DFP veya patates proteaz inhibitörü tarafından inhibe edilirlerken, tosil-L-fenilalanin klorometil keton (TPCK) veya TLCK tarafından inhibe edilemezler (Rao vd., 1998).

Bazı metal iyonları enzimin aktivitesi ve yapısal özellikleri için önemlidir. Farklı çalışmalar proteolitik aktivitenin Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Zn^{+2} iyonları ile artırılabilirliğini göstermektedir. Ca^{+2} ve Mg^{+2} ’nin bu etkisi, çeşitli proteazların termal dayanıklılığındaki artışla ilişkilendirilmiştir (Bogo vd., 2017). Ba^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+3} ve Mn^{+2} proteazların kararlılığının korunmasında kullanılan diğer metal iyonlarıdır. Hg^{+2} , Cu^{+2} , Ag^{+2} , Fe^{+2} ve Zn^{+2} gibi metal iyonlarının proteazların çoğuna karşı inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur (Jisha vd., 2013).

Substrat spesifiklikleri, kimotripsininkine benzer fakat onun kadar katı değildir. Bölünme bağının karboksil tarafında tirozin, fenilalanin veya löisine sahip bir peptid bağını hidrolize ederler. Proteazlar, kazein, jelatin, sığır serum albümin, elastin-orsein, kollajen ve azure gibi doğal substratların yanında N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE), N-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE), N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (SAAAPNA), N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide (SAAPPPNA), N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA), N-benzoyl-Pro-Phe-Arg-pnitroanilide (BPPAPNA) ve N-[3-(2-furyl) acryloyl]-Leu-GlyPro-Ala (FALGPA) gibi sentetik substratları da parçalayabilirler (Sharma vd., 2017).

Tablo 6. *Bacillus* cinsine ait alkalın proteazların bazı özellikleri.

| Mikroorganizma | Opt. pH | Opt. Sıcaklık | MW (kDa) | Referans |
|------------------------------------|---------|---------------|----------|---------------------------|
| <i>Bacillus</i> sp. JB99 | 11 | 70 | 29 | (Johnvesly ve Naik, 2001) |
| <i>Bacillus</i> sp. KSM-KP43 | 11 | 70 | - | (Saeki vd., 2002) |
| <i>Bacillus</i> sp. NCDC-180 | 11;12 | 50;55 | 28;29 | (Kumar vd., 1999) |
| <i>Bacillus</i> sp. PS179 | 9 | 75 | 42 | (Hutadilok vd., 1999) |
| <i>Bacillus</i> sp. SSR1 | 10 | 40 | 29 | (Singh vd., 2001) |
| <i>B. brevis</i> MTCC B0016 | 10.5 | 37 | - | (Banerjee vd., 1999) |
| <i>B. movajensis</i> | 10 | 60-70 | 30 | (Gupta vd., 1999) |
| <i>B. pumilis</i> MK6-5 | 11.5 | 50-55 | 28 | (Kumar, 2002) |
| <i>B. alkalitelluris</i> | 10 | 60 | 42.6 | (Anandharaj vd., 2016) |
| <i>Bacillus</i> sp. SB12 | 9 | 37 | 41 | (Briki vd., 2016) |
| <i>B. subtilis</i> GA CAS8 | 9 | 50 | 41 | (Sathishkumar vd., 2015) |
| <i>B. subtilis</i> DR8806 | 8 | 45 | 37 | (Farhadian, 2015) |
| <i>B. amloliquefaciens</i> SYB-001 | 7 | 50 | 36.8 | (Wang vd., 2013) |
| <i>B. koreensis</i> BK-P21A | 9 | 60 | 48 | (Anbu, 2013) |
| <i>Bacillus</i> sp. SM2014 | 10 | 60 | 71 | (Jain vd., 2012) |
| <i>B. megaterium</i> RRM2 | 10 | 60 | 27 | (Rajkumar vd., 2011) |

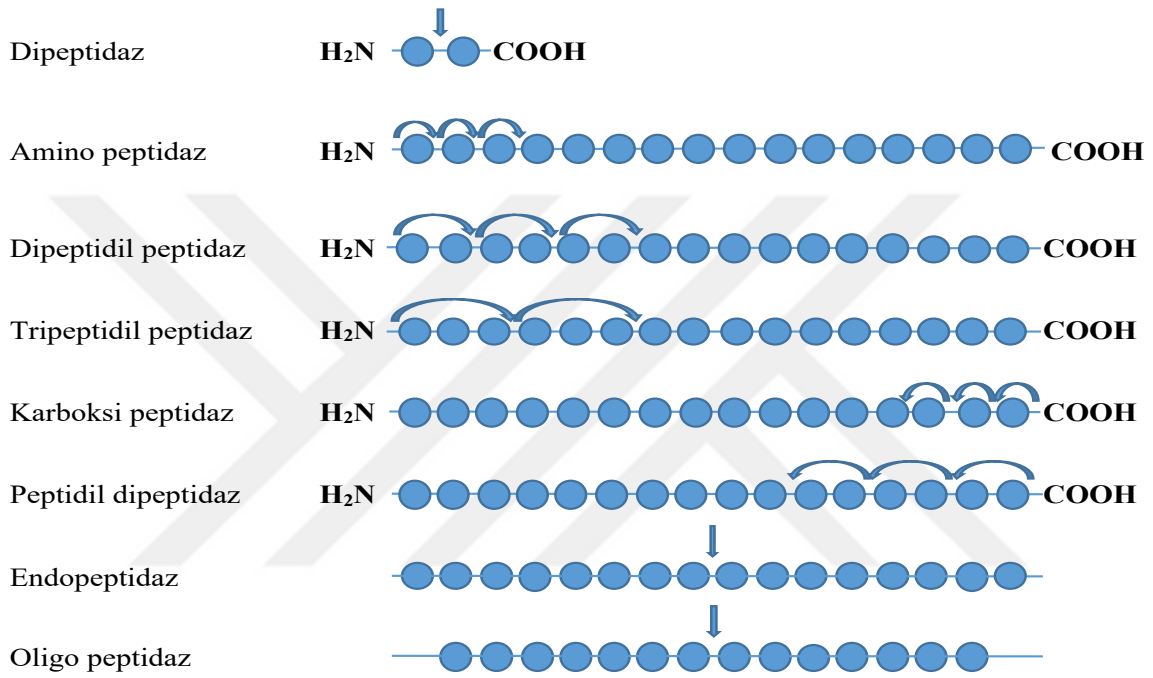
1.4.2. Oligopeptidazlar

Bazı endopeptidazlar proteinlerden küçük substratları hidroliz eder ve oligopeptidazlar olarak isimlendirilir. Thimet, oligopeptidaz örneklerinden biridir (Rawlings vd., 2007).

1.4.3. Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar, serbest N- amino grup ve C- karboksil grubun bir ya da her ikisine ihtiyaç duyar ve bir bağı uçtan uçten fazla rezidü oluşturmayacak şekilde hidroliz ederler. Ekzopeptidazlar N- veya C- ucunda çalışmalarına ve ayrılma sırasında açığa çıkan

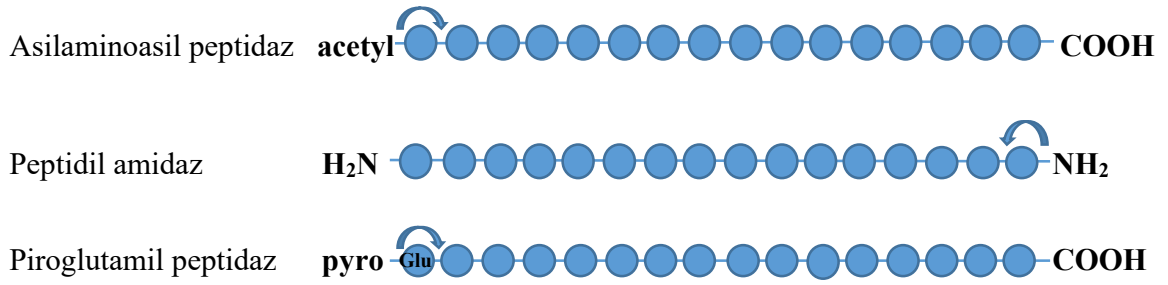
aminoasit sayısına göre sınıflandırılır. Bir ekzopeptidaz, N- ucundan bir aminoasit salıyorsa aminopeptidaz, dipeptid salıyorsa dipeptidil-peptidaz, tripeptit salıyorsa tripeptidil-peptidaz olarak isimlendirilir. Bir ekzopeptidaz, C-ucundan bir aminoasit salıyorsa karboksipeptidaz, dipeptit salıyorsa peptidil-dipeptidaz olarak isimlendirilir. Eğer bir ekzopeptidaz sadece bir dipeptidi ayırıyorsa dipeptidaz olarak isimlendirilir (Şekil 8) (Rawlings, 2013).



Şekil 8. Bazı peptidazların katalitik aktiviteleri. Substratlar, bir amino asidi temsil eden boncuk dizileri şeklinde gösterilmektedir. Oklar, ayrılma pozisyonlarını göstermektedir (Rawlings, 2013).

1.4.4. Omegapeptidazlar

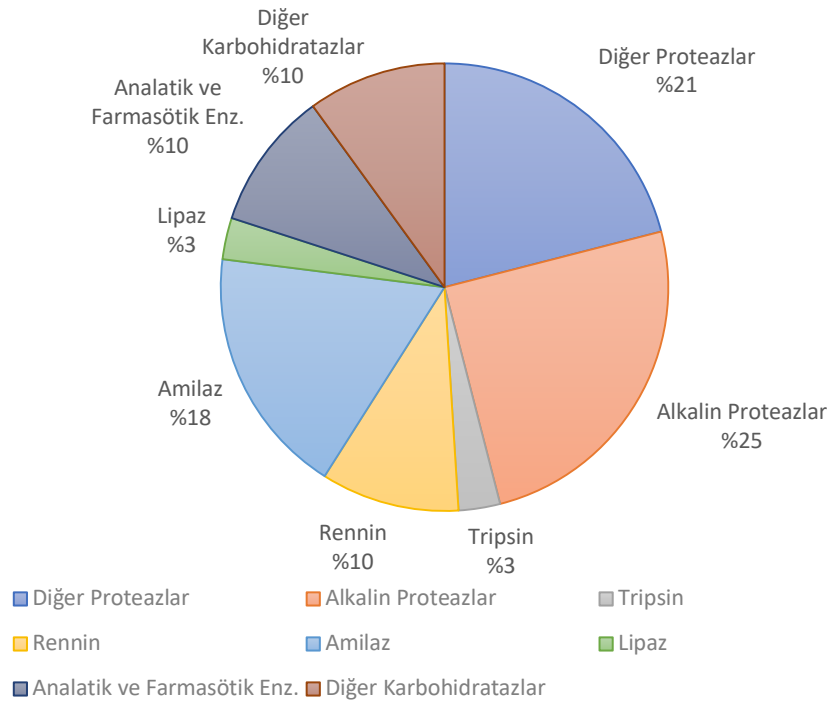
Omega peptidazlar, substratta serbest N- ya da C- ucuna ihtiyaç duymayan peptidazlardır. Yüklü bir terminal gruba gereksinim duymamalarına rağmen, sıklıkla terminal uca yakın hareket ederler. Bu yüzden bütünüyle endopeptidazlardan farklıdır (Şekil 9) (Rawlings vd., 2007).



Şekil 9. Omega peptidaz katalitik aktivitesine ait bazı örnekler. Substratlar, bir amino asidi temsil eden boncuk dizileri şeklinde gösterilmiştir. Oklar, ise ayrılma pozisyonları belirtmektedir (Rawlings, 2013).

1.5. Proteazların Endüstriyel Kullanım Alanları

Proteazlar çok çeşitli endüstri dallarında kullanılan önemli enzim gruplarından biridir. Endüstriyel enzimlerin %75'i hidrolitiktir. Proteazlar üç büyük enzim grubundan birini temsil eder ve dünyadaki toplam enzim satışının yaklaşık %60'ını oluşturur (Şekil 10).



Şekil 10. Enzim satışlarının dağılımı (Homaei vd., 2016)

Proteazlar, çoğunlukla deterjan ve gıda endüstrilerinde çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Çevre dostu teknolojiler geliştirme konusundaki son trend göz önüne alındığında deri işleme ve biyolojik arıtma gibi işlemlerde de proteazların kapsamlı bir şekilde kullanılabileceği öngörülmektedir. Münferit uygulamalar için dünya çapında enzim gereksinimi büyük ölçüde değişiklik göstermektedir. Proteazlar, ilaç endüstrisinde yaraların debridmanı için kullanılan merhem gibi ilaçların hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda ve deterjan endüstrisinde kullanılan proteazlar, büyük miktarlarda hazırlanır ve ham preparatlar olarak kullanılırken, tıpta kullanılanlar küçük miktarlarda üretilir ve kullanılmadan önce kapsamlı şekilde saflaştırma gerektirir (Rao vd., 1998).

Proteaz üretimi, tüm mikroorganizmaların doğal bir yeteneğidir. Az sayıda ticari üretici olmasına rağmen, çok sayıda bakteri türünün serin tipi alkalın proteazlar ürettiği bilinmektedir. Son yıllarda bakteriyel alkalın proteaz tabanlı çok sayıda ticari ürün pazarda yerini almıştır (Tablo 7).

Tablo 7. Ticari bakteriyel alkalın proteazlar (Gupta vd., 2002b).

| Üretici | Ticari isim | Organizma | Uygulama |
|--------------------------------------|----------------|-------------------------|----------------------------|
| Novo Nordisk, Danimarka | Alcalase | <i>B. licheniformis</i> | Deterjan, ipek zamklama |
| | Savinase | <i>Bacillus</i> sp. | Deterjan, tekstil |
| | Esperase | <i>B. lentus</i> | Deterjan, besin, ipek z. |
| | Biofeed pro | <i>B. licheniformis</i> | Yem |
| | Durazym | <i>Bacillus</i> sp. | Deterjan |
| | Novozyme 471MP | - | Fotoğraf jelatin hidrolizi |
| | Novozyme 243 | <i>B. licheniformis</i> | Diş protezi temizleyicisi |
| Genocer International USA | Nue | <i>Bacillus</i> sp. | Deri |
| | Purafact | <i>B. lentus</i> | Deterjan |
| Gist-Brocades Hollanda | Primatan | Bakteriyel | Deri |
| | Subtilisin | <i>B. alcalophilus</i> | Deterjan |
| | Maxacal | <i>Bacillus</i> sp. | Deterjan |
| | Maxatase | <i>Bacillus</i> sp. | Deterjan |

Tablo 7'nin devamı

| | | | |
|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------|---|
| | Opticlean | <i>B. alcalophilus</i> | Deterjan |
| | Optimase | <i>B. licheniformis</i> | Deterjan |
| Solvay Enzymes | Maxapem | <i>Bacillus</i> sp. | Deterjan |
| Almanya | HT-proteolytic | <i>B. subtilis</i> | Alkol, pişirme, mayalama, yem, besin, deri, fotografik atık |
| | Protease | <i>B. subtilis</i> | Besin, atık |
| Amano Pharmeciticals | Proleather | <i>Bacillus</i> sp. | Besin |
| Japonya | Collogenase | <i>Clostridium</i> sp. | Teknik |
| | Amano protease S | <i>Bacillus</i> sp. | Besin |
| Enzyme Development | Enzeco alkaline | <i>B. licheniformis</i> | Endüstriyel |
| USA | protease | <i>B. licheniformis</i> | Besin |
| | Enzeco alkaline protease-L FG | <i>Bacillus</i> sp. | Endüstriyel |
| | Enzeco high alkaline protease | | |
| Nagase Biochemicals | Biopraxe | <i>B. subtilis</i> | Kozmetik, ilaç |
| Japonya | concentrate | <i>P. aeruginosa</i> | Araştırma |
| | Ps. Protease | <i>P. aeruginosa</i> | Araştırma |
| | Ps. Elastase | <i>B. subtilis</i> (K2) | Araştırma |
| | Cryst. Protease | <i>B. subtilis</i> | Araştırma |
| | Cryst. Protease | (<i>bioteus</i>) | Deterjan, temizleme |
| | Biopraxe | <i>B. subtilis</i> | Besin |
| | Biopraxe SP-10 | <i>B. subtilis</i> | |
| Godo Shusei | Godo-Bap | | Deterjan, besin |
| Japonya | | <i>B. licheniformis</i> | |
| Rohm | Corolase 7089 | <i>B. subtilis</i> | Besin |
| Almanya | | | |
| Wuxi Synder Bioproducts | Wuxi | <i>Bacillus</i> sp. | Deterjan |
| Çin | | | |
| Advance Biochemicals | Protosol | <i>Bacillus</i> sp. | Deterjan |
| Hindistan | | | |

1.5.1. Besin Endüstrisi

Son yıllarda proteazlar etin yumuşatılması ve peynir hazırlanması gibi farklı amaçlar için gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Peynir hazırlanmasında ilk adım, proteaz yardımı ile gerçekleşen süt proteininin pıhtılaşmasıdır. Mikrobiyal proteaz kaynaklarının sık kullanıldığı peynir endüstrisi iki dezavantaja sahiptir: uzun depolamada düşük verim ve uzun depolamada acılık. Birkaç proteaz sınıfı arasında, aspartik proteazlar peynir endüstrisi için en iyi olanıdır. Mikroorganizmalar depolanan yiyeceklerde acılığa neden olabilen, spesifik olmayan çeşitli proteazlar üretir. Adler-Nissen (1986) Alcalase (alkalin proteaz)'ın acıyı gıdalardan uzaklaştırdığını ve daha tatlı hale getirdiğini bildirmiştir. *B. amiloliquefaciens* tarafından üretilen proteaz, nohut proteininden, metionin bakımından zengin protein hidrolizatının hazırlanması için kullanılmaktadır. Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen proteazlar, meyve sularının veya yumuşak içeceklerin güçlendirilmesinde ve protein yönünden zengin terapötik diyetlerin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Ekmeğin ana bileşeni, hamurun özelliklerini belirleyen çözünmeyen bir protein olan gluten içeren buğday unudur. *Aspergillus oryzae* tarafından üretilen proteaz, gluteni hidrolize ederek, renk, yumuşaklık ve doku bakımından ürünün kalitesini arttırmaktadır (Banerjee ve Ray, 2017).

Proteazlar besin endüstrisinde protein modifikasyonu ve mevcut kaynakların lezzet ve depolama özelliklerinin geliştirilmesi için kullanılmaktadır. Alkalin proteazlar iyi tanımlanmış peptid profilleri ile yüksek besleyici değere sahip protein hidrolizatlarının hazırlanmasında kullanılmaktadır. Ayrıca özellikle sığır etinin yumuşatılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Hamza, 2017).

1.5.2. Deterjan Endüstrisi

1913 yılında, enzim-deterjan kazırlanmasında ilk kez pankreas ekstraktının kullanıldığı rapor edilmiştir. Kırk yıl sonra, BIO-40 ticari ismi altında bakteriyel enzim içeren deterjan tanıtılmıştır (Singh vd., 2016). Deterjandaki enzimin performansı, yıkama sıcaklığı, leke tipi, su sertliği ve yıkama prosedürü gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. İdeal deterjan proteazı, gıda, kan ve diğer vücut salgıları kaynaklı çok çeşitli lekelerin çıkarılmasını kolaylaştıracak geniş substrat spesifikliğine sahip olmalıdır. Yüksek pH ve sıcaklıkta aktivite, stabilite ve deterjanlara eklenen diğer şelatlayıcı ve oksitleyici ajanlarla

uyumluluk, deterjanlarda proteazların kullanımı için ön şartlardandır. Bir proteazın bir deterjandaki en iyi performansı için anahtar parametresi pI (izoelektrik nokta) değeridir. Eğer pI, deterjan çözeltisinin pH'ına denk gelirse, bir proteazın bu uygulama için en uygun olduğu bilinmektedir (Rao vd., 1998). Son zamanlarda *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus* (CBS), *Streptomyces* sp. (AB1), *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Bacillus brevis*, *Bacillus subtilis* (AG-1) gibi kaynaklardan elde edilen alkalın proteazlar CaCl₂ ve glisin gibi stabilizatörlerin varlığında mükemmel bir deterjan uyumluluğu göstermişlerdir. Subtilisinler yüksek alkaliliğe ve şelatör konsantrasyonuna sahip uç noktalarda çalışabilmektedir. Alkalifilik *Bacillus* suşları, deterjanlarda kullanıldığında aktivite kaybına uğramayan oksidatif olarak stabil serin proteazların izolasyonunda kullanılmaktadır (Mukhtar, 2016).

1.5.3. Tekstil ve Deri Endüstrisi

Keratinaz aktivitesine sahip olan proteazlar, çözünmeyen lifli protein olan keratini hidrolize etme yeteneklerinden dolayı özel bir ilgi görmüştür. Keratin, saç, tüy, yün ve tırnakların önemli bir bileşenidir. Sistein köprülerle çapraz bağlanmış α -sarmal veya β -yaprak tabakaları bakımından zengin stabil bir yapıya sahiptir. Bu, mekanik stabilite sağlar, böylece yapının subtilisin, papain ve pepsin tarafından bozulmaya karşı dayanıklı olmasını sağlar. Bu nedenle keratinazlar tekstil endüstrisinde farklı tekstil işleme aşamalarında uygulanır. Keratinazlar konvansiyonel kirlilik yaratan fiziko-kimyasal metotların yerini alır, büzülmeye karşı direnç sağlar ve işleme özelliklerini iyileştirir. Yün, kumaşlarda yaygın olarak kullanılan doğal bir hayvan lifidir, ancak bu tür uygulamalar için fiziksel ve kimyasal işleme uygulamaları gerektirir. Yün elyafına uygulanan proteazlar, büzülme önleyici olarak kullanılan klorlama reçinesine alternatif olabilir (Contesini vd., 2018).

Deri endüstrisi birkaç adımdan oluşan (tavlama, kıl giderme, paklama vb.) ham deri işleme için önemli miktarda proteaz kullanmaktadır. Mikroorganizmaların ürettiği alkali proteazlar, kılların giderilmesinde çok faydalıdır ve çevre kirliliğine neden olan sodyum sülfür gibi tehlikeli kimyasalların kullanıldığı geleneksel yöntemden daha güvenlidir. Alkalın proteazlar, derinin kollajen olmayan yapısını hidrolize eder ve deri işleme için gerekli olan globulin ve albümin gibi fibril yapıda olmayan proteinleri de uzaklaştırır. Ellaiah vd. (2002) ham derinin tabaklama işleminin yüksek alkali koşullarda yapılması

gerektiğini ve bu amaçla mikroorganizmalar tarafından üretilen alkalın proteazların iyi bir seçim olacağını belirtmişlerdir. Bununla birlikte, genetiği değiştirilmiş suşlar, endüstrilerde daha yüksek önceliğe sahiptir ve daha iyi sonuçlar almak için rastgele kullanılmaktadır (Banerjee ve Ray, 2017).

1.5.4. Peptid Sentezi

Peptid sentezinde yaygın olarak kullanılan organik sentetik yöntemler, yüksek verim elde etmek için büyük ölçekli üretimde avantajlıdır. Bu kimyasal yöntemler sırasında, aşırı şekilde çözücü ve kuplaj maddesi kullanılması ve aminoasit yan zincirlerinin korunması gibi eksikler vardır. Ayrıca rasemik karışımların oluşumu nedeniyle çözülme süreçleri gerektirmektedir. Mikrobiyal proteazlar ve lipazlar gibi enzimler, yüksek özgüllükleri sebebi ile ılımlı reaksiyon koşulları ve düşük sayıda reaksiyon basamağı gibi çeşitli avantajlara sahiptirler. Proteaz kullanan reaksiyonlar sıklıkla dengenin hidroliz yerine sentez için elverişli olduğu organik sistemlerde gerçekleştirilmektedir. Ayrıca proteaz uygulaması, yüksek substrat çözünürlüğüne, basit arıtma prosedürlerine ve organik çözücü kaynaklı kirlenmenin azalmasına neden olabilir (Contesini vd., 2018).

1.5.5. Terapötik Uygulamalar

Bakteriyel ve fungal proteazlar, antikanser, pıhtı eritici, antimikrobiyal, antiinflamatuvar vb. etkili terapötik ajanların geliştirilmesine eşit derecede katkıda bulunmuşlardır. *Bacillus subtilis* kaynaklı Nattokinaz, kardiyovasküler hastalıklarda nutrasötik olarak kullanılır ve hastalık riskini azaltmaya yardımcı olur. Kan pıhtılaşmasını önler ve pıhtıyı eritir (Hsia vd., 2009). Antimikrobiyal özellikleri olan bakteri ve mantar kaynaklı çeşitli proteazlar da rapor edilmiştir. Ayrıca, keratinize cildin degradasyonu ve dermatofitoz tedavisi için aşı hazırlanmasında da proteazlardan yararlanılmaktadır. Bu hidrolitik enzimler yaraları gidermek, epiteli yenilemek ve daha hızlı iyileşme süreçleri için travma alanında kullanılmaktadır (Singh vd., 2016). *Aspergillus oryzae* kaynaklı proteazlar oral yoldan verilerek, litik enzim eksikliği sendromuna sahip hastalarda sindirim sistemi düzenleyicisi olarak kullanılmıştır. Klostridiyal kollajenaz veya subtilisin, yanık ve yaraların tedavisinde geniş spektrumlu antibiyotiklerle kombinasyon halinde

kullanılmaktadır. *E. coli*'den izole edilen bir asparginaz, çeşitli lenfositik lösemi formlarında kan dolaşımından asparajinin uzaklaştırılması için kullanılmıştır. *Conidiobolus coronatus* kaynaklı alkalın proteazın, hayvan hücre kültürlerinde tripsin yerine kullanılabilceği bulunmuştur (Rao vd., 1998).

1.5.6. Gümüş Geri Kazanımı

Gümüş değerli bir metal ve fotoğrafçılık, MRG, CT taraması ve röntgende kullanılan filmin yüksek maliyetli bileşenidir. X- ışını film içeriği jelatin katmanında yaklaşık %1,5–2 oranında gümüş içerir. Proteazlar, gümüş geri kazanımı için kullanılan X-ışını filmlerinin biyolojik işleminde çok önemli bir rol oynamaktadır. Jelatinin enzimatik hidrolizi, sadece gümüşün çıkarılmasına yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda polyester film bazını da geri dönüştürebilir. Gümüş iyileşmesi için jelatini birkaç dakika içinde bozan proteazların kullanıldığı bildirilmiştir. Bu tür enzim muamelesi kullanılarak, gümüş yaklaşık olarak %99 oranında saf olarak geri kazanılabilmektedir. Bu da oluşabilecek çevre kirliliğini minimize eder. Gümüş geri kazanımı ortamında stabil olan bakteriyel proteazların bu endüstride kullanım alanı vardır (Hamza, 2017).

1.5.7. Atık Yönetimi

Son zamanlarda, çeşitli gıda endüstrisi kaynaklı atıkların yönetiminde alkalın proteaz kullanımı, atık yönetiminde proteazların kullanımında yeni bir çağ açmıştır. Proteazlar proteinli atıkları çözüdürür ve bu sayede su sistemlerinin biyolojik oksijen ihtiyacını azaltmaya yardımcı olur. Atık tüyler, kümes hayvanlarının vücut ağırlığının yaklaşık %5'ini oluşturur ve katı kerat yapılarının tamamen tahrip olması şartıyla yiyecek ve yem için yüksek protein kaynağı olarak kullanılabilir. Keratinolitik proteazın, gıda ve yem endüstrisi atıkları, kümes hayvanlarının atıklarından keratin degradasyonu ve lahımlardan saç çıkarmak için tüy dökücü ajan olarak kullanımı rapor edilmiştir. *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* ve *Streptomyces* sp.'den elde edilen proteolitik enzimler ve disülfid indirgeyici ajan (tiyoglikolat, kıl degradasyonunu hızlandırır ve kıllarla tıkanmış boruların temizlenmesine yardımcı olur) içeren bir formülasyon şu anda pazarda mevcuttur (Rani vd., 2012).

1.6. Biyoteknolojik Enzim Üretimi

Enzim üretiminin ve ilave işlemlerin genel maliyeti, enzim endüstrisinde bir teknolojinin başarılı bir şekilde uygulanmasına karşı en büyük engeldir. Araştırmacılar ve proses mühendisleri, endüstriyel gereksinimlerine göre alkalın proteaz verimini artırmak için çeşitli yöntemler kullanmışlardır. Proteaz veriminin artırılmasına yönelik son yaklaşımlar arasında, mikrobiyal kaynaklardan yüksek kalite ve düşük maliyette enzim üretimi için farklı substratların kullanımının yanı sıra, aşırı verimli suşların taranması, klonlama ve over-ekspresyon, beslemeli kesikli işlem (fed-batch), kemostat fermantasyonları ve fermantasyon ortamının yanıt yüzeyi metodolojisi gibi istatistiksel bir yaklaşımla optimizasyonu bulunur (Gupta vd., 2002b).

Hem konvansiyonel (UV veya kimyasallar) hem de modern rekombinant DNA (rDNA) teknolojisi, proteazların aşırı üretimi için suş geliştirmede kullanılır. rDNA teknolojisi, arzu edilen gen ve mikroorganizma, bitki veya hayvan gibi organizma genomlarının kombinasyonu ile gerçekleştirilen DNA teknolojisidir. Yeni hücre genetiği değiştirilmiş organizmalar olarak adlandırılan transgenik organizmalar tarafından üretilir. Proteaz genlerinin *E. coli* gibi mikroorganizmalara transformasyonu aracılığıyla üretilen proteazlara rekombinant proteazlar denir. Deterjan endüstrisinde, özellikle rDNA teknolojisi kullanılarak, daha fazla stabiliteye sahip biyomühendislik enzimleri üretilmektedir. Proteazları kodlayan genin ekspresyonu pHY300PLK, pKL9610, pFX1'i içeren farklı vektör sistemleri kullanılarak zorlu koşullar altında gerçekleştirilir. Plazmit *B. stearothermophilus*, *E. coli* ve *B. subtilis*'te korunabilir ve ekspres edilebilir (Razzaq vd., 2019).

1.7. Bakteriyel Ekspresyon Sistemlerinde Proteaz Ekspresyonu

Bakteriler, heterolog protein ekspresyon sisteminde manipülasyon kolaylıkları ve pahalı olmayan besiyerlerinde hızlı şekilde çoğalabilmeleri sebebiyle ilk tercih edilen konaktır. *E. coli* (i) genomunun hızlı ve hassas bir şekilde değiştirilmesinin kolaylığı, (ii) yüksek hücre yoğunluklarına hızlı şekilde erişme, (iii) ucuz besiyerinde kültür kolaylığı ve (iv) proteaz aktivitesinin azaltılmasının kolaylığı gibi birçok nedenden ötürü rekombinant konak olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. *E. coli* kuru ağırlığının %50'sine kadar heterolog protein biriktirebilir. Bununla birlikte, post-translasyonel modifikasyon eksikliği,

toksik hücre duvarı pirojenlerinin varlığı veya bazen inaktif, toplanmış ve çözünmeyen heterolog protein içeren inklüzyon cisimlerinin oluşumu gibi dezavantajlara sahiptir (Adrio ve Demain, 2014). *E. coli*'de bu endişelere yönelik dizayn edilmiş çok sayıda sistem mevcuttur.

Yüksek transkripsiyon oranlarını sağlamak ve toksisite sorunlarını azaltmak için, güçlü uyarılabilir promotörlere sahip ekspresyon vektörleri, herhangi bir ana moleküler biyoloji satıcısından kolayca temin edilebilir veya kolayca oluşturulabilir. Bu ekspresyon vektörleri genellikle yüksek translasyon oranlarının korunması amacı ile güçlü ribozomal bağlanma bölgeleri ile dizayn edilir. Translasyon oranları gen füzyonları ya da translasyonel çiftleme kullanılarak da yükseltilebilir. Çözünürlük, toksisite ve saflaştırma problemleri birçok durumda, sitoplazmik lokalizasyondan ziyade periplazmik, füzyon veya etiketli (tagged) proteinlerin üretimi ile iyileştirilebilir. Aktif proteazın oluşturulan füzyondan proteolitik bölünme ile salınabilecek şekilde tasarlanması önemlidir. Inklüzyon cisimciği oluşumu bazen ekspresyon düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilerek azaltılabilir. Üretilmiş proteinin proteolitik degradasyonu önlemek için proteaz genleri silinmiş *E.coli* suşları kullanılabilir ya da dizayn edilebilir. Heterolog proteinin hücre içerisindeki lokalizasyonu değiştirilerek de proteolitik degradasyon azaltılabilir (Brömme ve Schmidt, 1999).

Gerçek şu ki *E. coli* için belirli bir proteaz ailesi ya da tüm proteazların ekspresyonunda iyi olan bir sistem şu ana kadar geliştirilememiştir. Farklı promotor ve gen füzyonlarının avantajları ve dezavantajları kullanılacak sistem seçilmeden önce çalışılmalıdır.

1.7.1. *Bacillus subtilis* Protein Ekspresyon Sistemi

Bilim adamları endüstriyel kullanım amaçlı uygulamalarda proteaz verimini arttırmak için klonlama ve yüksek ekspresyon, suş tarama, beslemeli kesikli (fed batch) ve kemostat fermantasyonu gibi farklı yollar kullanmışlardır (Razzaq vd., 2019).

Gen klonlaması, genetik sistemlerin yapı fonksiyon ilişkisine dair anlayışımızı geliştirmede etkili olan ve hızla gelişen bir teknolojidir. Genlerin manipülasyonu ve kontrolü için mükemmel bir yöntemdir. Endüstriyel olarak önemli enzimlerin %50'sinden fazlası genetik olarak işlenmiş mikroorganizmalardan üretilmektedir. Son yıllarda enzimlerin genetik manipülasyonlarla fazla miktarda üretilmeleri, proteinin primer

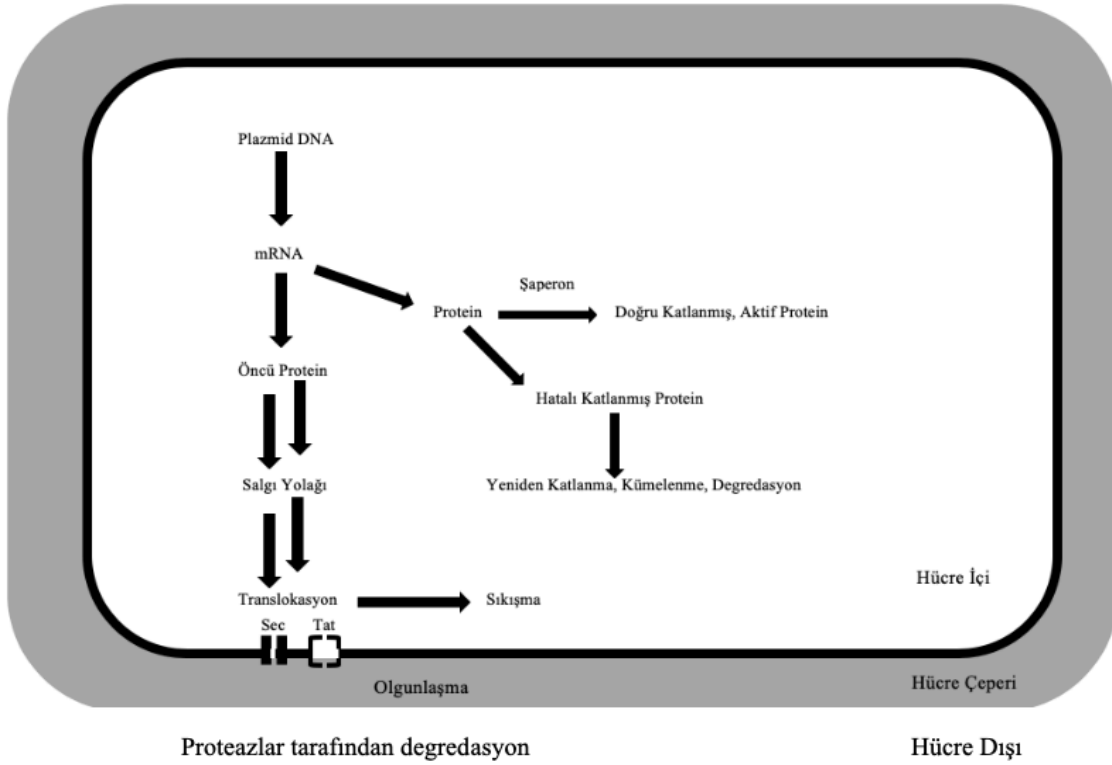
yapısının aydınlatılması, mikroorganizmanın hastalık oluşturma mekanizmasındaki rolünün belirlenmesi, aktif bölgelerin yerinin saptanması, enzimlerin endüstriyel uygulamalarda daha verimli şekilde kullanılacak şekilde özelliklerinin değiştirilmesi ve proteaz genlerinin izolasyonu hakkında çeşitli raporlar yayınlanmıştır (Razzaq vd., 2019).

Proteazlar, mevcut tüm ekspresyon sistemlerinde (bakteri, maya, virüs, böcek ve memeli hücresi) üretilmişlerdir. Hangi ekspresyon sisteminin kullanılacağı proteaza ve devamında yapılacak çalışmalara bağlıdır. Fakat bunu önceden tahmin edip üstesinden gelmek oldukça zordur.

Bacillus subtilis, kendisini yabancı genlerin ekspresyonunu çalışmak için uygun bir sistem yapan birçok özelliğe sahiptir. *B. subtilis* patojenik olmayan bir organizmadır (GRAS- generally recognized as safe). Gram (-) bakterilerin hücre duvarında bulunan ve insanlar ve hayvanlar için pirojenik olan endotoksinler (lipopolisakkarit-LPS) üretmez. Sağlık tehdidi oluşturmaması sebebi ile tarihte Uzak Doğu'da gıda ürünleri üretmek için kullanılmış olmakla birlikte günümüzde proteazlar, alfa-amilazlar gibi çeşitli yıkıcı enzimleri üretmek için sanayide de yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücreler nispeten basit ortamlarda kolayca yüksek yoğunluklara erişebilir. Hücrenin büyüme özellikleri ve fizyolojisi yoğun olarak çalışılmıştır. Prokaryotlar arasında, bir mikroorganizma hakkında mevcut olan genetik bilgi miktarında *E. coli*'den sonra ikinci sıradadır. Böylece, genetik manipülasyonlar kolayca gerçekleştirilebilir ve genetik mühendisliği için çok sayıda uygun mutant ve plazmit vektör mevcuttur. Son olarak, *B. subtilis* ile ilgili en ilginç özellik, doğrudan büyüme ortamına salgılanan çok sayıda protein üretmesidir. *B. subtilis* sisteminin kullanılması, verimli bir şekilde eksprese edilen ve ürünleri yüksek miktarlarda salgılanan rekombinant genlerin yapımını kolaylaştıracaktır. Dahası, eğer bir yabancı gen ürünü sentezlenir ve büyüme ortamına yüksek seviyelerde salgılanırsa konak hücre proteinleri ile kontaminasyon riskini minimize ederek saflaştırılma işlemini kolaylaştırılır. Ek olarak, sitoplazmada indirgeyici ortama kıyasla daha iyi katlanma koşulları sağlayarak inklüzyon cisimlerinin oluşumunu önler. Böylece, tarihsel, fizyolojik, genetik ve teknik açıdan *B. subtilis*, yabancı genlerin ekspresyonu için çeşitli avantajlara sahip iyi bir modeldir (Doi vd., 1991; Westers vd., 2004).

Bacillus salgı yolu üç işlevsel aşamaya ayrılabilir: (1) salgı ön-proteinlerinin sentezini, bunların (varsa) şaperonlarla etkileşimlerini ve translokaza bağlanmayı içeren erken aşamalar; (2) Sec (katlanmamış proteinlerin salgılanması) veya Tat translokazı (katlanmış proteinlerin ikiz arjinin translokasyonu) yoluyla hücre zarı boyunca

translokasyon; (3) sinyal peptidinin çıkarılması, translokazdan salınması, hücre zarının trans tarafında katlanması ve hücre çeperi içinden geçmesini içeren geç evreler. Bu nedenle, üretilen protein nihai hedefine ve konformasyonuna ulaşmadan önce birkaç farklı faktör söz konusudur ve bu nedenle bu faktörlerin her biri üst düzey üretim için bir darboğaz olabilir (Şekil 11). *B. subtilis*'in ortamındaki heterolog proteinlerin üretimi için, proteini translokoza çok verimli bir şekilde yönlendiren ve sinyal peptidazlar tarafından verimli bir şekilde uzaklaştırılabilen bir sinyal peptid kullanılması gereklidir. Bu nedenle, etkili bir sinyal peptidaz bölünme bölgesi elde etmek için bir sinyal peptidinin modülasyonu bazen bir gerekliliktir (Westers vd., 2004).



Şekil 11. Heterolog protein üretiminde verimi etkileyen faktörlerin şematik gösterimi (Westers vd., 2004).

Rekombinant protein ürünlerinin üretimini geliştirmek için promotor ve sinyal peptidlerin optimizasyonu ve sekresyon stresini azaltmak ve hücre dışı proteinlerin degradasyonunu önlemek için proteaz genleri silinmiş konak (protease deficient) kullanımı gibi birçok genetik strateji geliştirilmiştir. Heterolog proteinlerin yüksek ekspresyonu için *B. subtilis* WB800 ($\Delta nprE$, $\Delta aprE$, Δepr , Δbpr , $mpr::ble$, $nprB::bsr$, Δvpr , $wprA::hyg$), *B. subtilis* WB 700 ($\Delta nprE$, $\Delta aprE$, Δepr , Δbpr , $mpr::ble$, $nprB::bsr$, Δvpr) ve *B. subtilis* WB

600 ($\Delta nprE$, $\Delta aprE$, Δepr , Δbpr , $mpr::ble$, $nprB::bsr$) gibi hücre dışı proteazları silinmiş suşlar oluşturulmuştur. Bu proteazları silinmiş suşlar yaygın olarak kullanılan bir model ve laboratuvar suşu olan *B. subtilis* 168'den geliştirilmiştir (Zhao vd., 2019).

1.8. Çalışmanın Amacı

Enzimler, gıdadan ilaca, deterjandan tekstil ürününe, hayvan yeminden tarıma kadar birçok endüstride nihai ürün ve katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Sürdürülebilir ve çevre dostu ekonomiler, ürünlerinde kimyasallar kullanmak yerine enzimleri tercih etmekte ve dünya pazarında enzimlerin ticaret hacmi gün geçtikçe artmaktadır. Maalesef Türkiye hemen hemen tüm enzimleri yurt dışından ithal etmektedir.

Bacillus türleri, biyokimyasal ve fiziksel özelliklerinin anlaşılması ve endüstriyel amaçlı uygulamalar için enzim üretiminin geliştirilmesi amacıyla kapsamlı bir şekilde araştırılmaya devam edilmektedir. Mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin karakterizasyon çalışmaları çoğunlukla, enzimin kültür ortamından alınıp çeşitli kromatografik yöntemlerle saflaştırılması ile yürütülmektedir.

Bu çalışmanın amacı, *Bacillus halodurans* C-125 suşuna ait yüksek sıcaklık ve pH gibi ekstrem koşullarda aktif alkalın serin proteaz enzimine ait geni (BH0855), sekiz hücre dışı proteaz geni silinmiş *B. subtilis* WB800 suşunda yüksek oranda ekspres etmek ve kullanılabilecek muhtemel uygulamalar için yapısal ve fiziko-kimyasal olarak karakterize etmektir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Suş ve Plazmitler

Hedef enzimin gen kaynağını (BH0855) içeren *Bacillus halodurans* C-125 suşu, *E. coli* ve *B. subtilis* mekik vektörü pMA0911 ve *B. subtilis* WB800 suşu Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. Hedef genin klonlanmasında ve mekik vektörü pMA0911'in inşasında kullanılan *E. coli* DH10β suşu ise bölüm laboratuvar stoğundan temin edilmiştir.

2.2. BHASP Proteinin Biyoinformatik Analizi

İlgili proteinin *in siliko* olarak yapısal dinamik analizi çeşitli veri tabanları, online araçlar ve programlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

NCBI Protein Veri tabanı <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

UniProtKB <http://www.uniprot.org/>

BIOPEP <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>

ExPASy <https://www.expasy.org/>

Protein Structure Prediction Server <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>

2.3. Genin Moleküler Karakterizasyonu

2.3.1. Primer Dizaynı

B. halodurans C-125 BH0855 geni bir alkalın serin proteaz (BHASP) kodlar. Primer tasarımı için *B. halodurans* C-125 BH0855 genine ait nükleotit sırası Genbank'tan alınıp (BA000004.3) sinyal dizisi çıkarılan gene uygun primerler SnapGene yazılımı (GSL Biotech) kullanılarak tasarlandı (Tablo 8). Tasarlanan primerlerin diğer özellikleri (erime sıcaklığı, GC içeriği vb.) Oligoanalyzer (IDT) online analiz aracı ile kontrol edildi. Primerlerin uç bölgelerine klonlamada kullanılmak üzere restriksiyon endonükleaz kesim

bölgeleri, ayrıca reverse primerin sonuna saflaştırmada kullanılması amacı ile 6x His-Tag dizisi eklendi.

Tablo 8. BH0855 genine ait primer dizileri

| Primer | Sıra (5'-3') | Kesim bölgesi | Bağlanma Sıcaklığı | Ürün Büyüklüğü |
|----------|--|---------------|--------------------|----------------|
| Bh_spr_F | GCGGAATTCAGCGAGGAGAAAAAGGAA | <i>EcoRI</i> | 60 °C | |
| Bh_spr_R | TTGGATCCATGATGGTGATGGTGATGTTG TGTTGCACGTCCAGC | <i>BamI</i> | 70 °C | 1029 bp |

GAATTC: EcoRI; GGATCCA: BamHI

2.3.2. Genomik DNA İzolasyonu

Gece boyu çoğaltılmış 1,5 mL *B. halodurans* C-125 kültürü Ependorf tüpe aktarıldı ve pellet eldesi için 1 dakika maksimum hızda santrifüj edildi. Elde edilen pellet iki kez 2 mL TE tamponu (1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8) ile yıkandı. Ardından üzerine 200 µL TE tamponu (TE tamponu + 4 mg/mL lizozim) eklendi ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Sırası ile karışımın üzerine 400 µL lizis solüsyonu (0,2 M NaOH, %1 SDS, 6-8 kez alt üst et) ve 300 µL KAc solüsyonu (3 M KAc, pH 5.5) eklenerek, 5 dakika 4 °C'de bekletildi. Karışım 14.000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi ve supernatant alınıp temiz bir tüpe aktarıldı. Supernatantın üzerine 1 mL %96'lık soğuk etanol eklendi ve 16 saat -20 °C'de bekletildi. Daha sonra karışım 14.000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi ve oluşan pellet 1 mL %70'lik etanol ile yıkandı. Pellet, alkolün uzaklaşması için tamamen kurutuldu ve 50 µL TE tamponu (10 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA pH 8) içerisinde çözüldü. İzole edilen DNA, %1 etidyum bromür içeren agaroz jel ile analiz edildi. DNA bandının varlığı UV transilluminator kullanılarak kontrol edildi ve KODAK Gel Logic 100 sistemi kullanılarak görüntü alındı.

2.3.3. BH0855 Geninin PZR ile çoğaltılması ve pJET1.2/blunt Ara Vektöre Klonlanması

BH0855 geninin PZR ile oğaltılması Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Biolabs Inc.) ve pMAsprF ve pMAsprR primerleri kullanılarak gerçekleştirildi. PZR için son hacim 50 µL olacak şekilde, 100 ng *B. halodurans* C-125 DNA'sı, 1,5 µL 1 mM ileri primer, 1,5 µL geri primer, 1 µL 10 mM dNTP, 10 µL 5X Phusion HF buffer ve 1 ünite Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase içeren reaksiyon kuruldu. PZR Tablo 9'daki şartlara göre gerçekleştirildi.

Tablo 9. BH0855 geni için PZR şartları.

| Prosedür | Sıcaklık | Süre | Döngü |
|------------------|----------|---------|-------|
| İlk denatürasyon | 98 | 30 sn. | 1 |
| Denatürasyon | 98 | 10 sn. | } 35 |
| Bağlanma | 60 | 30 sn. | |
| Uzatma | 72 | 35 sn. | |
| Son Uzatma | 72 | 10 dak. | 1 |

PZR sonunda çoğaltılan DNA fragmenti %1'lik agaroz jelde görüntülendi, jelden kesilerek alındı ve Nucleospin Gel and PZR Clean-up (Macherey-Nagel) kiti kullanılarak temizlendi. Daha sonra Nanodrop ile miktar tayini gerçekleştirildi.

Polimeraz enzimi aktivitesi sonucunda küt uç oluşturan PZR ürünleri CloneJET PZR Cloning (Thermo Fisher) kiti kullanılarak pJET1.2/blunt vektörüne klonlandı. Her bir gen için deney tüpüne son hacim 20 µL olacak şekilde 10 µL 2X Reaksiyon Buffer, 1 µL PZR ürünü, 1 µL pJET1.2/blunt klonlama vektörü (50 ng/µL) ve 1 µL T4 DNA ligaz konuldu. Karışım oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.

2.3.4. *E. coli* DH10β Kimyasal Kompotent Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyon

E. coli DH10β hücrelerinden tek koloni alınıp 3 ml LB besiyeri içerisine aşılandı ve 37 °C 200 rpm'de gece boyu çoğaltıldı. Kültürden 30 mL LB Broth besiyeri içerisine OD₆₀₀ 0,1 olacak şekilde aşılama yapıldı ve hücreler OD₆₀₀ 0,4–0,6 olacak şekilde çoğaltıldı. İstenilen yoğunluğa ulaşan hücreler buz üzerinde 30 dakika tutuldu ve ardından

4 °C’de 4.500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Oluşan pellet 100 mM CaCl₂ ile iki kez yıkandı ve son olarak 2 mL 100 mM CaCl₂ içerisinde çözüldü. 4 °C’de 2 saat beklendikten sonra kullanıldı.

Hazırlanan kompetent *E. coli* DH10β hücrelerinden 100 µL alındı ve üzerine 10 µL ligasyon ürünü konuldu. Karışım buz üzerinde 30 dakika bekletildi. Daha sonra 42 °C’de 45 saniye, buz üzerinde 2 dakika olacak şekilde ısı şokuna maruz bırakıldı. Hücrelerin üzerine 0,9 mL S.O.C besiyeri (%2 tripton, %0,5 maya özütü, %0,4 glukoz, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ ile 10 mM MgSO₄) konuldu ve 37 °C’de 1 saat çalkalandı. İnkübasyon sonucu çoğalan kültür 100 µg/mL ampicilin içeren seçici LB agar besiyerine yayıldı. Petriler 37 °C’de gece boyu bekletildi ve koloni seçimi gerçekleştirildi.

2.3.5. Rekombinant Plazmidlerin Koloni PZR ve Restriksiyon Endonükleaz Analizi

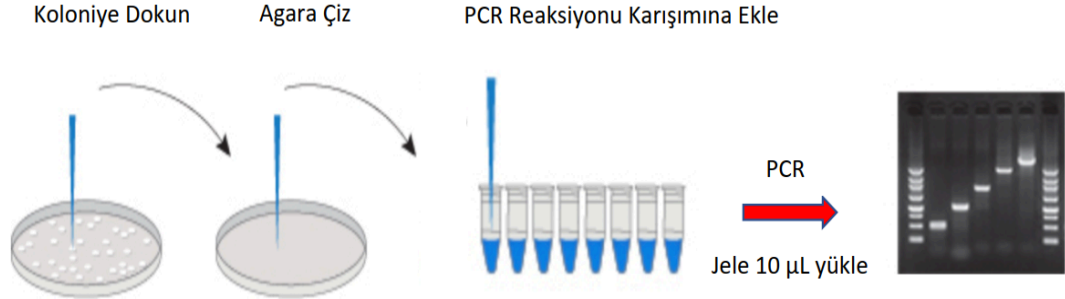
Rekombinat plazmidi içeren *E. coli* DH510β hücrelerinin belirlenmesi için koloni PZR gerçekleştirildi. Koloni PZR için 20 µL’lik PZR karışımı hazırlandı (Tablo 10).

Tablo 10. Koloni PZR şartları.

| Bileşenler | Miktar (µL) |
|--|-------------|
| 10X Buffer | 2 |
| MgCl ₂ | 1 |
| dNTP | 4 |
| Bh_spr_F | 0,4 |
| Bh_spr_R | 0,4 |
| i-Taq DNA Polimeraz (İntRON Biotechnolgy DR) | 0,2 |
| dH ₂ O | 12 |
| Toplam | 20 |

Koloni PZR protokolü Şekil 12’de özetlenmiştir. PZR reaksiyonu karışımını içeren her PZR tüpüne az bir miktar koloni eklendi. PZR şartları takip eden koşullarda gerçekleştirildi: 98 °C’de 2 dakikalık denatürasyondan sonra 35 döngü olacak şekilde 98 °C’de 20 saniye, 60 °C’de 20 saniye, 72 °C’de 1 dakika 10 saniye ve son olarak da 72

°C’de 5 dakika. Reaksiyon ürünü %1’lik agaroz jelde yürütüldü ve 1,029 bp uzunluğundaki geni içeren plazmitler belirlendi.



Şekil 12. Koloni PZR protokolü.

Koloni PZR ile pozitif sonuç veren kolonilerden seçilerek 3 mL LB Broth içeren (100 µg/mL ampisilin) besiyeri içerisinde ekim yapıldı ve 37 °C’de 180 rpm’de gece boyu üretilti. Plazmit DNA’larının izolasyonu PureYield™ Plazmid Miniprep System (Promega) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Klonlanan geni içeren rekombinant plazmidin doğrulanması için bir de restriksiyon endonükleaz kesimi gerçekleştirildi. Bunun için 250 ng plazmid DNA’sı, 0,5 µL *Bam*HI (Promega), 0,5 µL *Eco*RI (Promega), 2’şer µL enzimlere ait 10 X reaksiyon tamponlarından ve dH₂O olacak şekilde 20 µL’lik hacimlerde reaksiyon hazırlandı ve 37 °C’de 2 saat inkübe edildi. Ardından %1’lik jelde elektroforez yapılarak görüntülendi. Doğrulanmış plazmit, dizi analizi yaptırılmak üzere MacroGen firmasına (Hollanda) gönderildi. Dizi analizi sonucunda elde edilen nükleotit sırası gen bankasındaki (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) bu genlere ait sıralar ile BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programı kullanılarak karşılaştırıldı. Rekombinant plazmit pJET1.2- BH0855 olarak adlandırıldı.

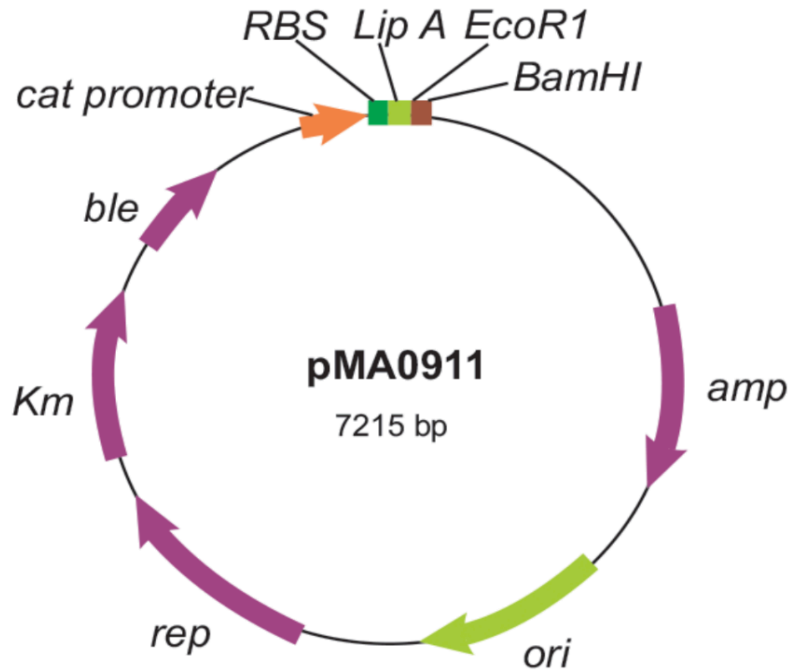
2.3.6. BH0855 Geninin pMA0911 Protein Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

pJET1.2- BH0855 vektörü *Bam*HI ve *Eco*RI restriksiyon enzimleri ile kesildi ve kesim ürünü (BH0855 geni) %1’lik agaroz jelde yürütüldü. Geni içeren fragment jelden DNA temizleme kiti ile temizlendi. Aynı yöntemle pMA0911 vektörü (Şekil 13) de *Bam*HI ve *Eco*RI enzimleri ile kesilerek doğrusal hale getirildi. Yapışkan uçlara sahip BH0855

geni ve pMA0911 ekspresyon vektörü T4 DNA Ligaz (NEB) kullanılarak birbirine yapıştırıldı. Ligasyon reaksiyonunun içeriği Tablo 11’de gösterildi. Oda sıcaklığında 30 dakika beklendikten sonra ligasyon ürünü *E. coli* DH10 β kompetent hücrelerine ısı şok yöntemi ile transforme edildi. Transforme edilen hücreler 100 μ g/mL ampisilin içeren seçici LB agar besiyerine yayıldı ve 37 °C’de gece boyu inkübasyondan sonra koloni seçimi gerçekleştirildi. Kolonilerin rekombinant geni içerip içermediği Bh_spr_F ve Bh_spr_R primerleri kullanılarak koloni PZR ile doğrulandı. Oluşan rekombinant plazmit pMA0911- BH0855 olarak adlandırıldı.

Tablo 11. pMA0911 ekspresyon vektörüne ligasyon için gerekli şartlar.

| Bileşenler | Miktar |
|---------------------------|------------------|
| T4 DNA Ligaz Buffer (10X) | 2 μ L |
| 100 mM DTT | 2 μ L |
| 10 mM ATP | 1 μ L |
| Vektör DNA (4 kb) | 50 ng |
| İnsert DNA (1 kb) | 37,5 ng |
| T4 DNA Ligaz | 1 μ l |
| Su | Total 20 μ L |



Şekil 13. pMA0911 ekspresyon vektörü haritası.

2.3.7. *Bacillus subtilis* WB800 Transformasyonu İçin SP1 ve SP2 Besiyerlerinin Hazırlanması

Öncelikli olarak aşağıda listelenmiş olan stok solüsyonlar hazırlandı. Tüm solüsyonlar otoklavda 20 dakika steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

- SP1 Tuz Karışımı (w/v) (>%0,2 (NH₄)₂SO₄, %1,4 K₂HPO₄, %0,6 KH₂PO₄, %0,1 Na₃C₆H₅O₇·2H₂O, %0,02 MgSO₄·7H₂O)
- 50 mM CaCl₂
- 250 mM MgCl₂
- %2 tripton- %10 maya özütü karışımı
- %50'lik glukoz çözeltisi (Filtre ile sterilize edilmiş)
- %0,5'lik triptofan (Filtre ile sterilize edilmiş)

SP1 besiyeri hazırlamak için SP1 tuz karışımı üzerine 1/100 oranında glukoz, tripton-maya özütü ve triptofan solüsyonlarından eklendi. SP2 besiyeri hazırlamak için ise SP1 besiyeri üzerine 1/100 oranında CaCl₂ ve MgCl₂ solüsyonlarından eklendi (Spizizen, 1958).

2.3.8. pMA0911-BH0855 Plazmitinin *Bacillus subtilis* WB800 Suşuna Transformasyonu

Bacillus subtilis WB800 hücreleri LB agar üzerine çizgi ekim ile inoküle edildi ve gece boyu 30 °C'de inkübe edildi. Ertesi sabah kolonilerden tek bir koloni 2 ml SP1 besiyeri içerisine inoküle edildi ve 37 °C'de 300 rpm hızda 3 saat 45 dakika sallandı. Daha sonra SP1 kültüründen 0,5 mL alınıp oda sıcaklığına getirilmiş 4,5 mL SP2 besiyeri içerisine transfer edildi ve 37 °C'de 150 rpm hızda 1 saat 30 dakika sallandı. 50 µL 100X EGTA SP2 besiyerine konuldu ve hücreler 37 °C'de 10 dakika daha çalkalandı. Kompetent hale gelmiş hücrelerden 0,5 mL alındı ve üzerine 400–1000 ng DNA eklendi ve yüksek hızda 1 saat 30 dakika sallandı. Hücreler Skim Milk Agar (g/L: 10 pepton, 5 maya özütü, 5 sodyum klorür, %10 yağsız UHT süt, 50 µg/µL Kanamisin) üzerine yayıldı ve 37 °C'de büyüme gözlenene kadar inkübe edildi. Kazein hidrolizi gösteren pozitif koloniler seçildi (URL-1).

2.3.9. Protein Ekspresyonu

Klonlanan geni içeren WB800 hücrelerinden tek koloni seçilip, 50 µg/µL kanamisin içeren LB besiyerinde 37 °C’de gece boyu inkübe edildi. Kültürden 1000 µg/µL kanamisin içeren proteaz üretim besiyerine (LB broth + %10 yağsız süt) OD₆₀₀ 0,1 olacak şekilde aşılama yapıldı ve 37 °C’de, 200 rpm’de 48 saat protein üretimi gerçekleştirildi.

2.3.10. Skim Milk Agar Kuyu Difüzyon Deneyi

Klonlanan geni içeren WB800’ün hücre dışı proteaz aktivitesi skim milk agar üzerinde gerçekleştirildi. Üretilen proteini içeren kültürlerden 100 µL agar içerisinde açılan kuyucuklara konuldu ve 37 °C’de 20–24 saat inkübe edildi.

2.4. Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu

2.4.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Kültür besiyerinin 12.000 rpm’de 15 dakika çökeltilmesi sonucu elde edilen ham enzim solüsyonuna, amonyum sülfat, konsantrasyonu %80 (561 gr/L) olacak şekilde buz içerisinde yavaş yavaş eklendi. Çözülme işlemi tamamlandıktan sonra karışım 2 saat daha karıştırılmaya devam edildi. Daha sonra oluşan çökelti 10.000 rpm’ de 30 dakika santrifüj edilerek ayrıldı. Oluşan pellet minimum miktarda Wash/Binding Buffer (100 mM HEPES, 10 mM İmidazol) içerisinde çözüldü.

2.4.2. Protein Saflaştırılması

Saflaştırma işlemi MagneHis™ Protein Purification System (Promega) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen karışıma 30 µL/mL olacak şekilde Ni partikülü eklendi ve proteinlerin bağlanması için oda sıcaklığında 10 dakika beklendi. Manyetik standı konulan karışımdan Nikel partiküller çekildi ve kalan sıvı kısım uzaklaştırıldı. Nikel partiküller Wash/Binding tamponuyla (100 mM HEPES, 10 mM İmidazol) aynı şekilde 3 kez yıkandı. Ardından çözücü tampon (100 mM HEPES, 500

mM İmidazol) ile oda sıcaklığında 5 dakika muamele edildi ve protein içeren sıvı kısım nikel partiküller uzaklaştırılarak alındı. Elde edilen protein imidazolun uzaklaştırılması için 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) içerisinde diyaliz edildi. Protein miktar tayini BSA (Sigma) kullanılarak Bradford boya-bağlama yöntemi ile gerçekleştirildi (Bradford, 1976).

2.4.3. Protein Konsantrasyonu Tayini

Kalibrasyon eğrisi hazırlamak için standart olarak BSA (bovine serum albumin) kullanıldı. BSA'nın 25–150 µg protein aralığında 6 seyreltiği hazırlandı. Mikroplate kuyucuklarına 10 µL standart ve üzerlerine 200 µL Quick Start™ Bradford Protein Assay solüsyonundan eklendikten sonra karanlıkta 15 dakika beklendi. 595 nm'de ölçüm gerçekleştirildi ve standart eğri çizildi. Protein miktarı µg/mL cinsinden hesaplandı. Örnekler için BSA yerine 10 µL enzim solüsyonu eklenerek aynı işlemler gerçekleştirildi.

2.4.4. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez ve Western Blot

Örneklerin üzerine eşit miktarlarda muamele tamponu (150 mM Tris-HCl (pH 6.8), %20 Gliserol, %4 SDS, %6 β-merkaptöetanol, %0,1 bromofenol blue) ilave edildikten sonra örnekler 100 °C'de 10 dakika kaynatılarak protein denatürasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra örnekler Laemmli (1970) tarafından tanımlanan %12'lik SDS-PAGE'e yüklendi ve örnekler yığma jelinden çıkana kadar 80 V akım uygulandı. Örnekler ayırma jeline geçince akım 120 V'a çıkarıldı. Yürütme boyası jelin sonuna gelene kadar yürütme işlemine devam edildi.

Jel fiksatif solüsyonu (%50 Metanol, %10 Asetik asit, 50 uL Formalaldehit/100 mL) kullanılarak bir saat çalkalanarak sabitlendi. Sabitleme işleminden sonra jel üç kez (her biri 20 dakika) %50 etanol yıkandı. Ardından jel hipo çözeltisi ile (Sodyum tiyosülfat çözeltisi 20 mg/100 mL) 2 dakika boyunca muamele edildi ve üç kez saf suyla yıkandı (her biri 20 saniye). Jel 30 dakika Gümüş nitrit çözeltisiyle (200 mg/100 mL) muamele edildi ve tekrar üç kez saf suyla yıkandı (her biri 20 saniye). Jel 100 mL görüntüleme çözeltisinde (6 g Sodyum karbonat, 2 mL hipo çözeltisi, 50 uL Formalaldehit) protein bantları görülmüye kadar bekletildi. Protein bantları görüldükten sonra reaksiyon %5 Asetik asit çözeltisi ile durduruldu.

Western blot analizi için jel içeriği elektroforetik blotlama (Bio Rad Power Pack Universal) cihazı kullanılarak membrana aktarıldı. Bunun için membran (İmmobilon-P Transfer Membrane, Merck Millipore) ve Whatman kâğıtları poliakrilamid jelin boyutuna uygun olacak şekilde kesildi. Membran önce metanol ile muamele edildi. Daha sonra membran, poliakrilamid jel ve Whatman kağıtları elektroblotlama tamponunda (48 mM Tris, 39 mM Glisin, %0,0375-w/v SDS) 2-3 dakika bekletildikten sonra, cihaza 2 Whatman kâğıdı, membran, poliakrilamid jel ve 2 Whatman kâğıdı olacak şekilde sırasıyla yerleştirildi. Cihaz 40 mA akımda 2 saat çalıştırılarak blotlama işlemi gerçekleştirildi. Blotlama işleminden sonra membran PBS içerisinde hazırlanmış %5'lik süt tozunda gece boyu 4 °C'de bekletildi. Ardından membran PBS içerisinde hazırlanmış %0,5'lik süt tozunda 3 kere 10'ar dakika yıkandı. Yıkama işleminden sonra membran 3 saat anti-poly Histidine antikoru (1:1000 sulandırma) (Sigma, H-1029) içeren %0,5'lik süt tozunda oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edildi ve bu sürenin sonunda tekrar 3 kere 10'ar dakika %0,5'lik süt tozunda yıkandı. Daha sonra 2 saat Anti IgG-Alkalin Fosfataz antikoru (1:1000 sulandırma) (Sigma, A-3562) içeren %0,5'lik süt tozu içinde oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. Sonra tekrar 3 kez 10'ar dakika %0,5'lik süt tozu içinde ve 2 kez de 5'er dakika AP (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9.5, 1X) tamponu içinde yıkandı.

Son olarak membran 100 µL NBT/BCIP (Nitro Blue Tetrazolium/ Bromo ChloroIndolyl Phosphate, Roche, 11681451001) içeren 10 mL AP tamponu ile muamele edildi. Protein bantlarının oluşumundan sonra reaksiyon, membranın dH₂O ile yıkanmasıyla durduruldu.

2.4.5. Tirozin Standart Eğrisinin Hazırlanması

Deneye başlamadan önce aşağıdaki solüsyonlar hazırlandı (Cupp-Enyard, 2008).

- 1) 50 mM Potasyum Fosfat Tamponu (pH 7.5): 11,4 mg/mL potasyum fosfat dibazik kullanarak saf su içerisinde hazırlandı ve pH'ı 1 M HCl ile ayarlandı.
- 2) %0,65 (w/v) Kazein solüsyonu: 50 mM potasyum fosfat tamponu içerisinde 6,5 mg/mL kazein kullanılarak hazırlandı. Karışım kazeinin tamamen çözünmesi için kaynama meydana gelmeyecek şekilde ısıtıldı. pH, NaOH veya HCl ile ayarlandı.

- 3) 110 mM Trikloroasetik asit çözeltisi: 6.1 N stok, saf su ile 1:55 oranında seyreltildi.
- 4) 0.5 mM Folin & Ciocaltea's: 1:3 oranında saf su ile seyreltilerek kullanıldı.
- 5) 500 mM Sodyum Karbonat: 53 mg/mL olacak şekilde saf su ile hazırlandı.
- 6) 1.1 mM L-tyrosine Standart Stok Solüsyonu: 0,2 mg/mL L-tyrosine olacak şekilde saf su içerisinde ısıtılarak hazırlandı.

Reaktifleri mikrosantrifüj tüplerine Tablo 12'deki gibi pipetleyerek standart eğri oluşturuldu. Mikrosantrifüj tüpleri güzel şekilde karıştırıldıktan sonra 37 °C'de 30 dakika beklendi. Her kuyucuğa 200 µL koyulduktan sonra absorbans 660 nm'de okundu. Standartın körü, her bir konsantrasyon için ölçülen absorbans değerinden çıkarıldıktan sonra grafik çizildi.

$$A_{660} \text{ Standard} = A_{660} \text{ Standard} - A_{660} \text{ Standard Kör}$$

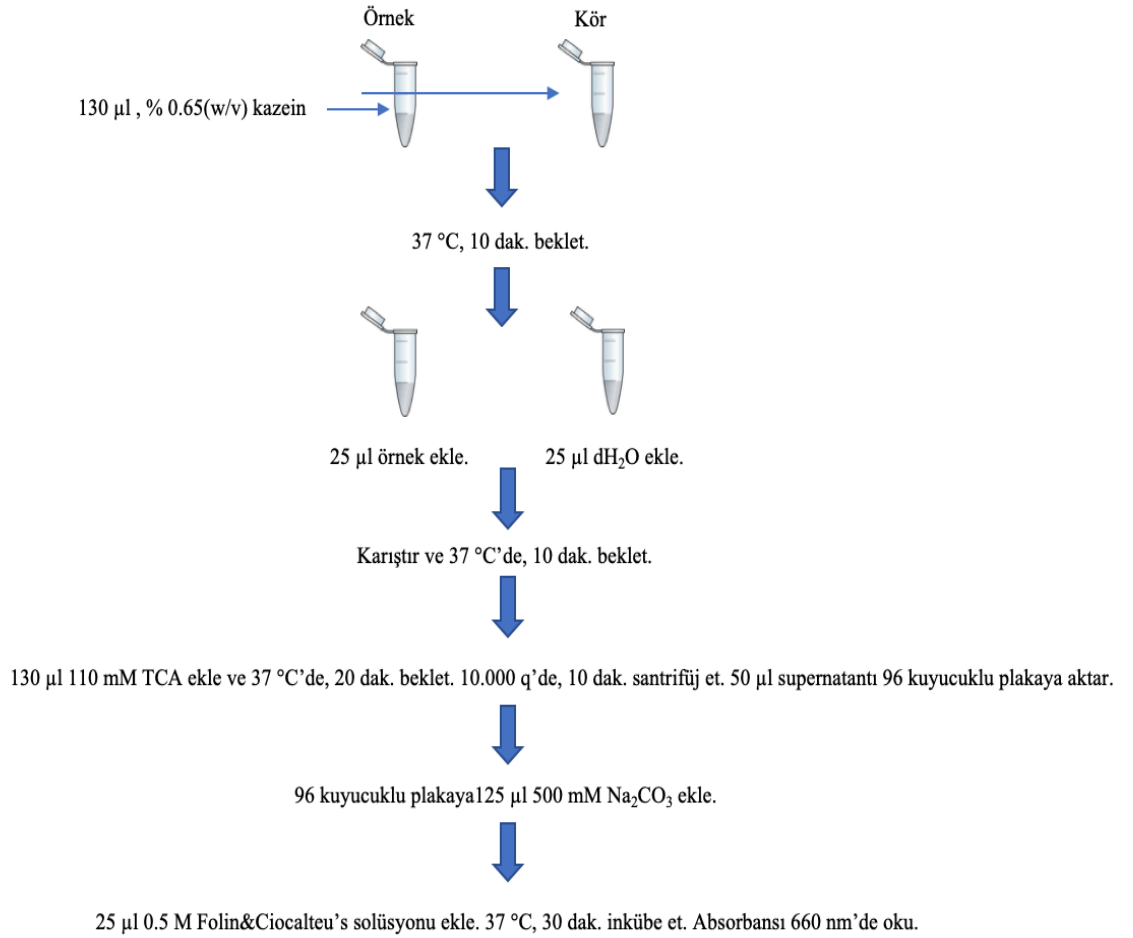
Tablo 12. Tirozin standart eğrisi için reaksiyon şeması.

| Reaktif | Standart 1 | Standart 2 | Standart 3 | Standart 4 | Standart 5 | Standart 6 |
|---------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Tirozin Stok | 0 µL | 5 µL | 10 µL | 25 µL | 50 µL | 75 µL |
| Su | 250 µL | 245 µL | 240 µL | 225 µL | 200 µL | 175 µL |
| Na ₂ CO ₃ | 625 µL | 625 µL | 625 µL | 625 µL | 625 µL | 625 µL |
| F-C | 125 µL | 125 µL | 125 µL | 125 µL | 125 µL | 125 µL |
| Tirozin (µmoles) | 0 | 0,0055 | 0,0110 | 0,0275 | 0,055 | 0,0825 |

2.4.6. Proteaz Aktivite Tayini

Metod Cupp-Enyard (2008)'den değiştirilerek yapılmıştır. Sıcaklık ve pH değerleri deneyin amacına uygun olarak değiştirilmiştir. Bir mikrosantrifüj tüpüne, 130 µL %0,65'lik ve 25 µL uygun dilüsyonda enzim veya kontrol için enzimin seyreltiği tampondan eklendi. Karışım 10 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, 130 µL 100 mM TCA eklendi ve karıştırılarak ve 37 °C'de 20 dakika boyunca inkübe edildi. Daha sonra tüpler 10 dakika boyunca 10.000 x g'de santrifüj yapıldı.

Ölçüm işlemi 96 gözlü kap içerisinde SpektraMax M2 (Molecular Devices) cihazı ile gerçekleştirildi. Sıra ile 50 µL süpernatant, 125 µL 500 mM sodyum karbonat solüsyonu ve 25 µL seyreltilmiş Folin&Ciocalteu solüsyonundan (F-9252, Sigma -Aldrich) plakanın her kuyucuğuna koyuldu. Buharlaşmayı önlemek için plaka kapatıldı ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Kapak açılarak absorbans 660 nm'de ölçüldü. Prosedür basamakları Şekil 14'te özetlendi.



Şekil 14. Proteaz aktivite tayini. Sıcaklık ve pH değerleri deneyin amacına uygun olarak değiştirilmiştir.

2.4.7. Proteaz Aktivitesinin Hesaplanması

- 1) Örnek körün absorbansı her numunenin absorbansından çıkarılır.

$$A_{660} \text{ Örnek} = A_{660} \text{ Örnek} - A_{660} \text{ Örnek kör}$$

- 2) Tirozin standart eğri grafiğinden elde edilen denklem kullanılarak serbest bırakılan tirozin eşdeğerlerinin µmolleri belirlenir.

- 3) Proteaz örneğinin mL başına ünite (U/mL) cinsinden aktivitesi ve spesifik aktivitesi (U/mg) aşağıdaki formül ile hesaplanır.

$$\text{Aktivite} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{(\mu\text{mole tirozin}) \times (\text{reaksiyon hacmi})}{(\text{örnek hacmi}) \times (\text{reaksiyon zamanı}) \times (\text{ölçülen örnek hacmi})}$$

$$U/mg = \frac{\frac{U}{mL} \text{ enzim}}{\frac{mg}{mL} \text{ enzim}}$$

- 4) Ünite Tanımı: Bir ünite, 37 °C'de pH 7.5'te dakikada 1.0 µmol (181 µg) tirozin eşdeğeri renk üretecek şekilde kazein hidrolize eden enzim miktarı.

2.4.8. Enzimin Optimum pH'ının Belirlenmesi

pH'ın proteaz enziminin (BHASP) aktivitesi üzerindeki etkisi, enzimin aktivitesinin farklı pH değerlerindeki tamponlarda (pH 7-8 Tris HCl, pH 9-13 Glisin NaOH) ölçülmesi ile belirlendi. Aktivite tayininde sıcaklık değeri olarak 60 °C olarak kullanıldı ve aktivite tayini bölüm 2.4.6.'da anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

2.4.9. Enzimin Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi

Sıcaklığın proteaz (BHASP) aktivitesi üzerindeki etkisi, enzim aktivitesinin 30–80 °C aralığında farklı sıcaklık değerlerinde ölçülmesi ile belirlendi. Aktivite tayini pH 12'de bölüm 2.4.6.'da anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

2.4.10. Enzimin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

Proteaz (BHASP) kinetik parametreleri, V_{max} ve K_m , enzimin farklı kazein konsantrasyonlarında (0,15–15 mg/mL) aktivitesi ölçülerek belirlendi. Aktivite tayini bölüm 2.4.6.'da anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Michaelis Menten denkleminde K_m ve V_{max} değerleri GraphPad Prism 5 programı kullanılarak hesaplandı.

2.4.11. Enzimin Sıcaklık Kararlılığının Belirlenmesi

Proteaz (BHASP) sıcaklık kararlılığını belirlemek için enzim çözeltisi 50–80 °C’de her bir sıcaklık için 30, 45 ve 60 dakikalık sürelerde inkübe edildi ve aktivite tayini bölüm 2.4.6’da anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

2.4.12. Enzimin pH Kararlılığının Belirlenmesi

Proteaz (BHASP) pH kararlılığının belirlenmesi için enzim optimal pH’ında 37 °C’de 24 saat ön inkübasyona bırakıldı ve 8 saatte bir örnek alındı. Aktivite tayini bölüm 2.4.6.’da anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

2.5. Kan Lekesi Gideriminde Saflaştırılmış Enzim Uygulaması

Bu çalışmada saflaştırılmış proteazın deterjan katkısı olarak kullanılma potansiyeli araştırıldı. Beyaz pamuk kumaşlar 4 cm x 4 cm boyutunda kesildi ve üzerine eşit miktarda kan konuldu. Daha sonra kanın kuruması için 60 °C’de 30 dakika bekletildi. Ayrı kaplarda olacak şekilde aşağıdaki deney düzenekleri hazırlandı ve uygulandı. Ticari deterjan, içeriğindeki proteazın denatüre olması için 10 dakika kaynatıldıktan sonra kullanıldı.

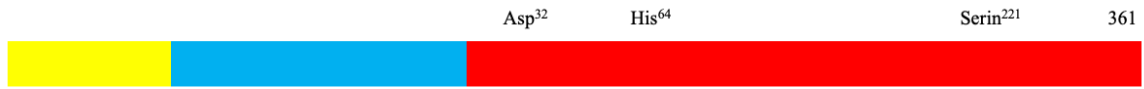
- a) Distile su (20 mL) + kan lekeli bez
- b) Distile su (20 mL) + kan lekeli bez + 500 µL ticari deterjan (5 mg/mL)
- c) Distile su (20 mL) + kan lekeli bez + 500 µL ticari deterjan (5 mg/mL) + 500 µL enzim
- d) Distile su (20 mL) + kan lekeli bez + 500 µl mL enzim
- e) Kan lekeli kumaş (kontrol)

Deney kapları 60 °C’de 30 dakika bekletildikten sonra kanlı bez parçaları saf su ile yıkandı. Kurutulan bez parçaları görsel olarak değerlendirildi.

3. BULGULAR

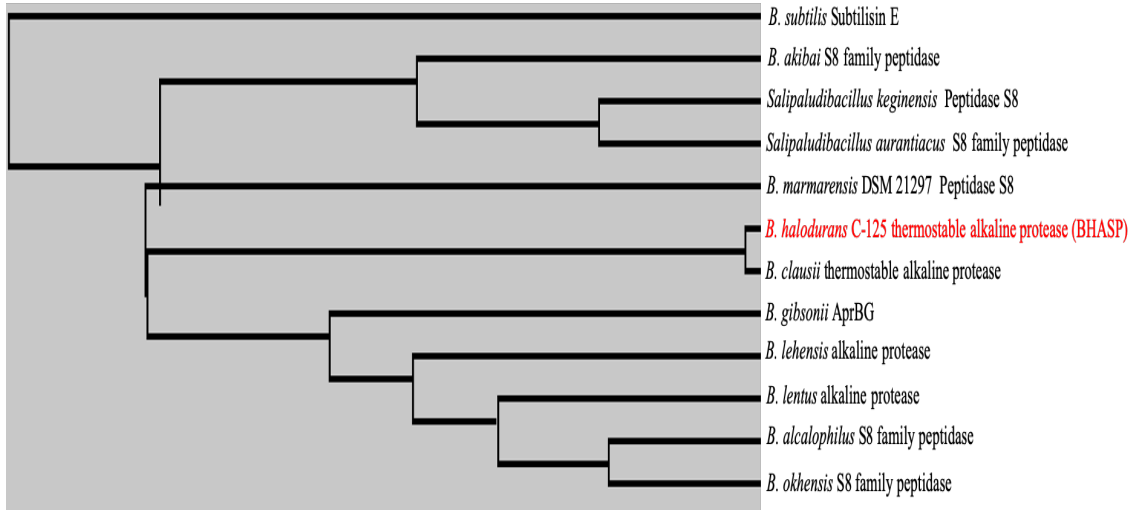
3.1. BHASP Proteinin Biyoinformatik Analizi

B. halodurans C-125 serin proteaz geni (BHO855) 361 amino asit uzunluğunda bir protein (BHASP) kodlamaktadır. 361 aminoasitten, 24'ü sinyal peptidi, 69'u propeptidi ve 268'i olgun peptidi oluşturmaktadır (Şekil 15).



Şekil 15. BHASP'ının primer yapısının şematik gösterimi. Sarı kutu sinyal peptidi, mavi kutu propeptid ve kırmızı kutu olgun peptidi temsil etmektedir.

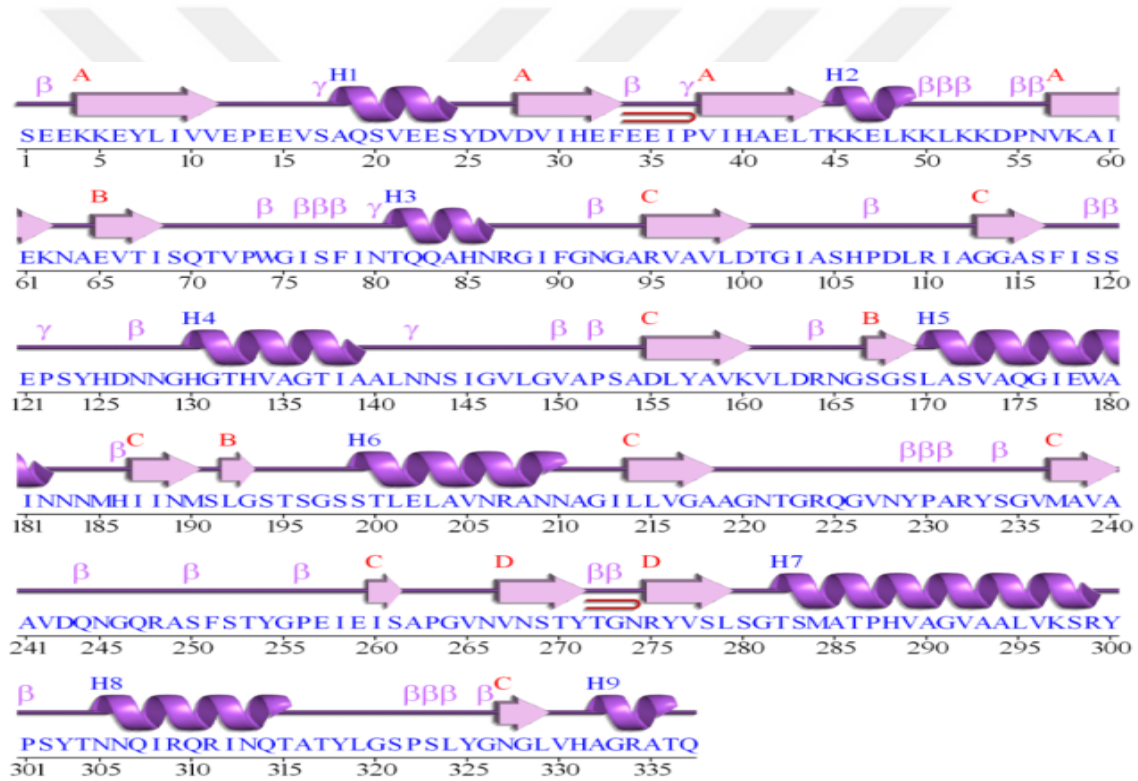
UniProt'tan çeşitli bakteri türlerine ait proteaz genleri alındı ve Clustal Omega programı kullanılarak birbirleriyle karşılaştırıldı. BHASP proteini en büyük benzerliği *B. clausii* alkalın proteazı ile gösterdi (Şekil 16).



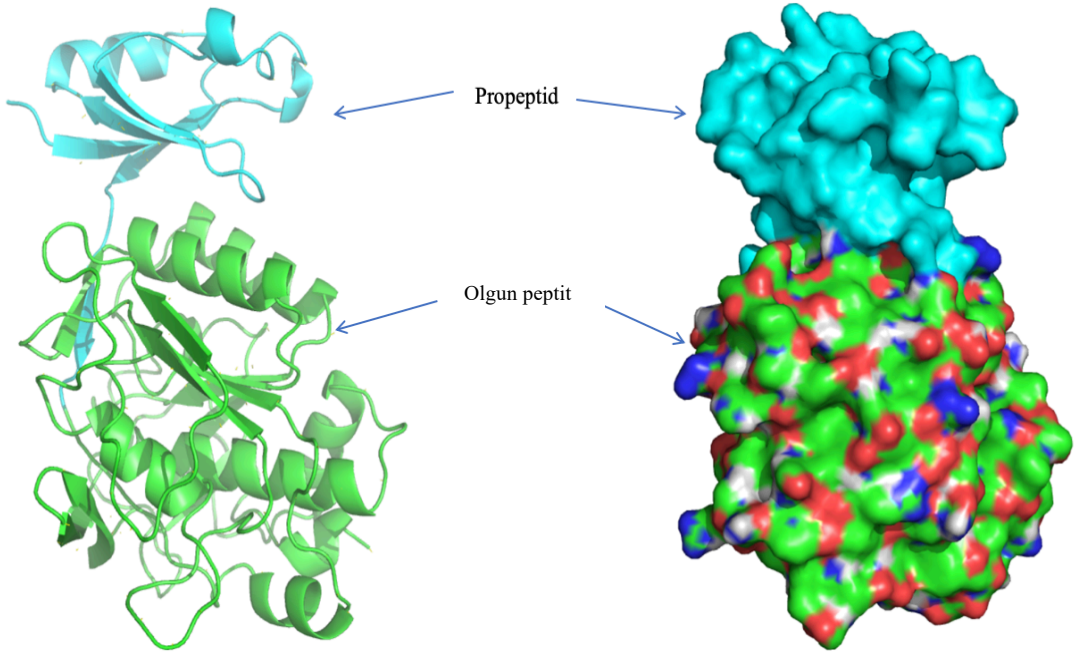
Şekil 16. Çeşitli bakteri türlerinden elde edilen proteazların benzerlik ağacı

BHASP'ının iki ve üç boyutlu (3D) yapı tahmini I-TASSER protein yapı ve fonksiyon tahmin programı ile gerçekleştirildi. Tahmin edilen 3 boyutlu yapı, tüm kimyasal etkileşimleri doğrulamak için daha iyi ayarlandı. 3D yapı daha sonra bilgisayar ortamında Ramachandran plot, yapısal benzerlik araştırması, β -faktör ve RMSF (root mean square fluctuations) gibi biyoinformatik araçlar ile incelendi.

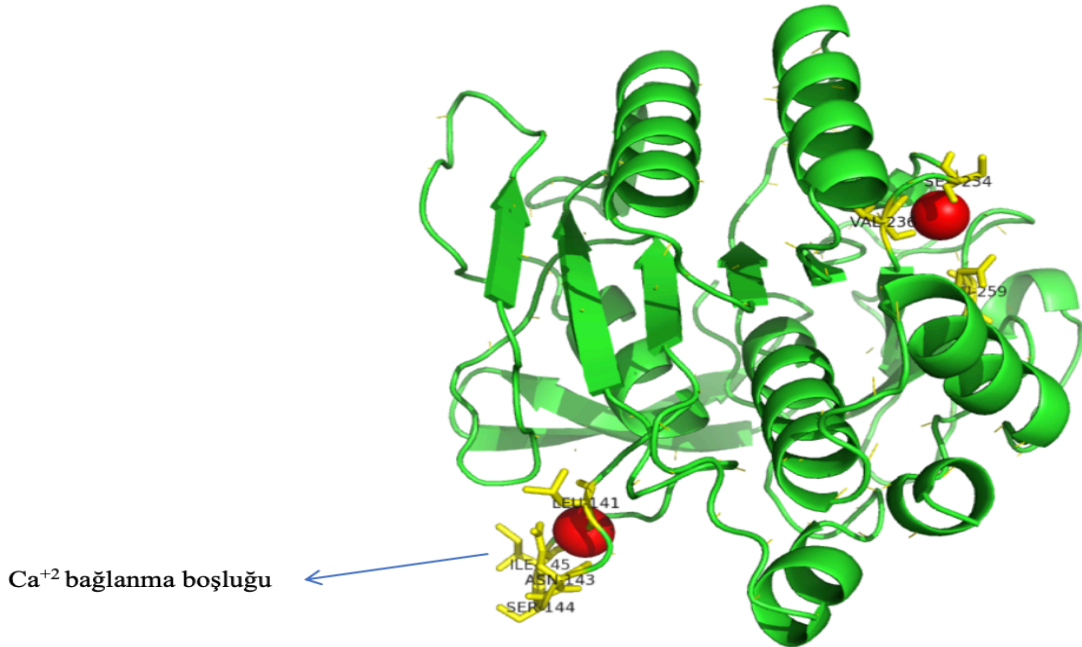
BHASP'ının yapısında, N-terminalden C-terminale 17 β -yaprak ve 9 α -heliks içerdiği tespit edildi (Şekil 17). Enzim, inaktif öncül şekilde sentezlenmekte daha sonra bir ya da birkaç peptid hidrolazın etkisi ile propeptit kısmı uzaklaştırılmakta ve aktif hale dönüşmektedir. BHASP'ının 3 boyutlu yapısı Şekil 18'de gösterildi. BHASP'ının iki tane Ca^{+2} bağlanma bölgesine sahip olduğu belirlendi (Şekil 19).



Şekil 17. BHASP'ının ikincil yapı elemanlarını ve konumlarını gösteren topolojik haritası.

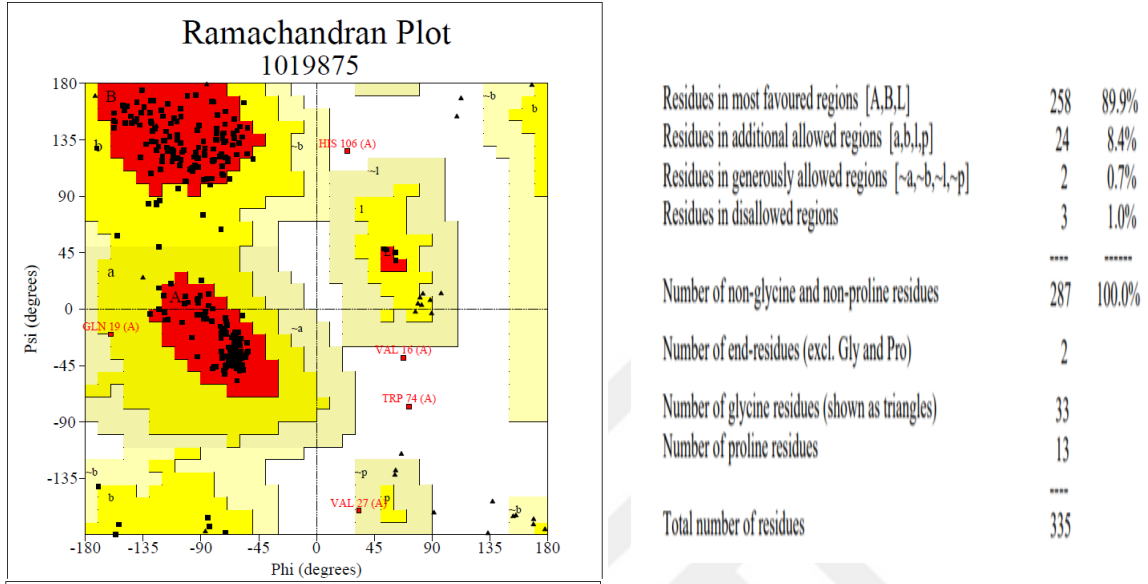


Şekil 18. BHASP'ının 3 boyutlu yapı modellemesi.



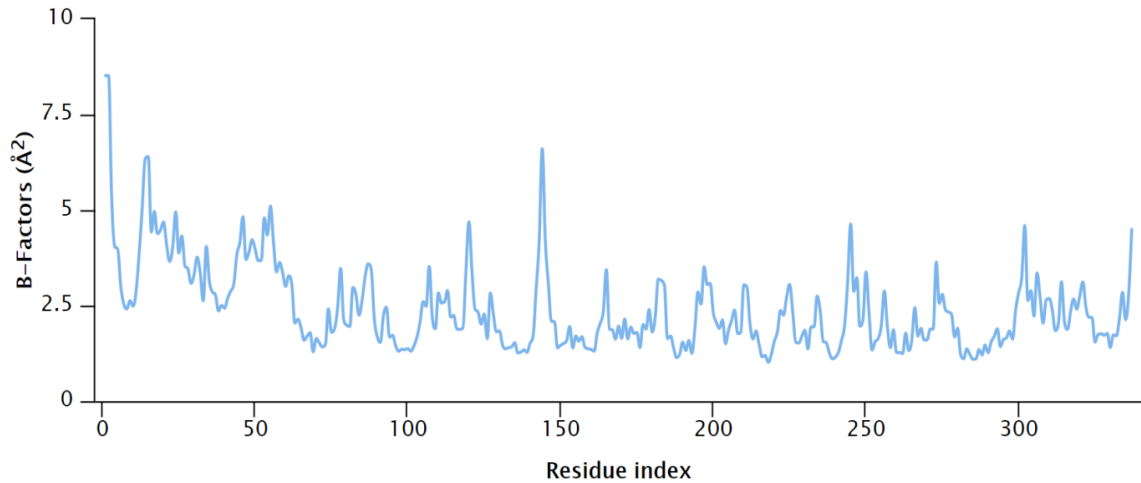
Şekil 19. BHASP'ının yapısındaki Ca^{+2} bağlanma bölgeleri. Ca^{+2} 'ler kırmızı toplar şeklinde şematize edildi.

Ramachandran plot analizi, aminoasitlerin büyük çoğunluğunun (%89,4) istenilen bölgede olduğunu gösterdi (Şekil 20). Aminoasitlerin %82'sinden fazlasının istenilen bölgede bulunması, modelleme çalışmasının başarılı olduğunu göstermektedir.



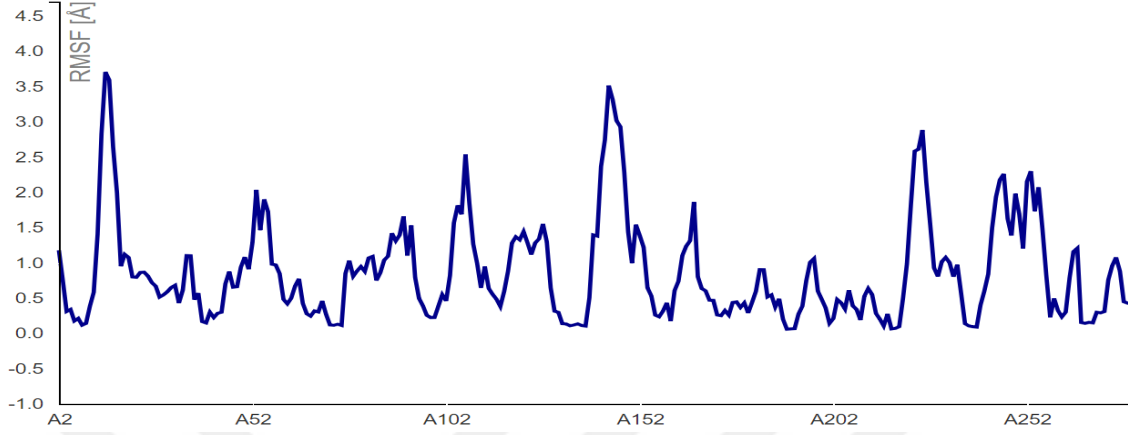
Şekil 20. Ramachandran plot analizi.

Yapısal dinamik analizler N-terminalin, 8.52 Å β -faktör değeriyle BHASP'ının en dinamik bölgesi olduğunu ortaya koydu (Şekil 21).



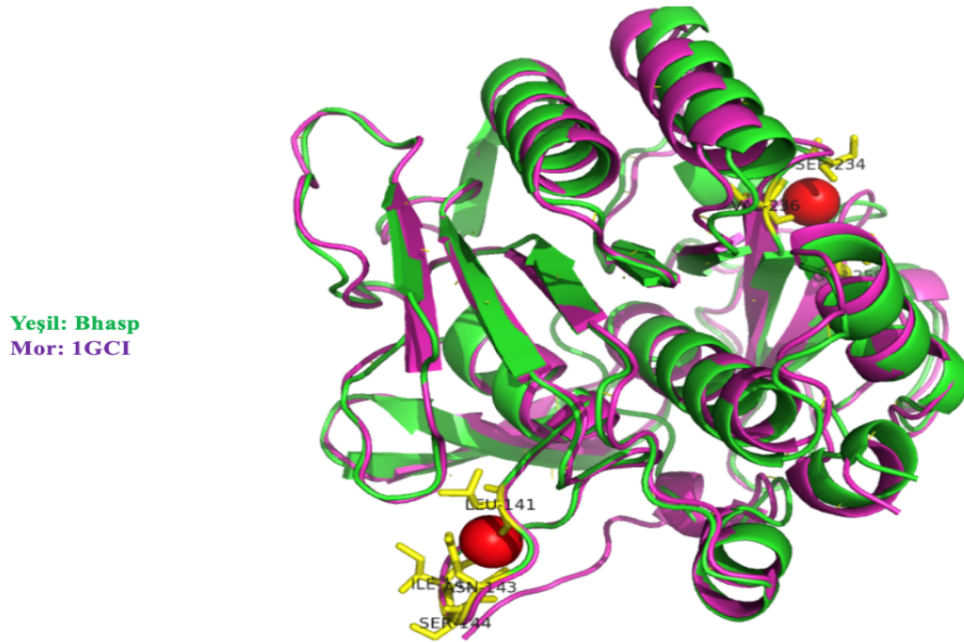
Şekil 21. BHASP'ının rezidü bazlı moleküler dinamiği.

Aynı zamanda RMSF analizi ile BHASP'nın N-terminalinin, küresel protein yapısındaki en dinamik bölge olduğu doğrulandı (Şekil 22).



Şekil 22. BHASP'nın 3 boyutlu yapısındaki RMSF dalgalanmaları.

Çalışmalar sonucu fonksiyonel BHASP'nın, *B. lentus* (PDB ID: 1GCI) proteazı ile %65,4 oranında sekans benzerliği gösterdiği belirlendi (Şekil 22). Ek olarak yapısal sürempresyon üzerine, tahmin edilen BHASP ve 1GCI yapılarının 0,80 RMSD dahilinde %98,14'lik benzerliğe sahip olduğu gösterildi (Şekil 23).



Şekil 23. BHASP ve 1GCI yapılarının üst üste çakıştırılması

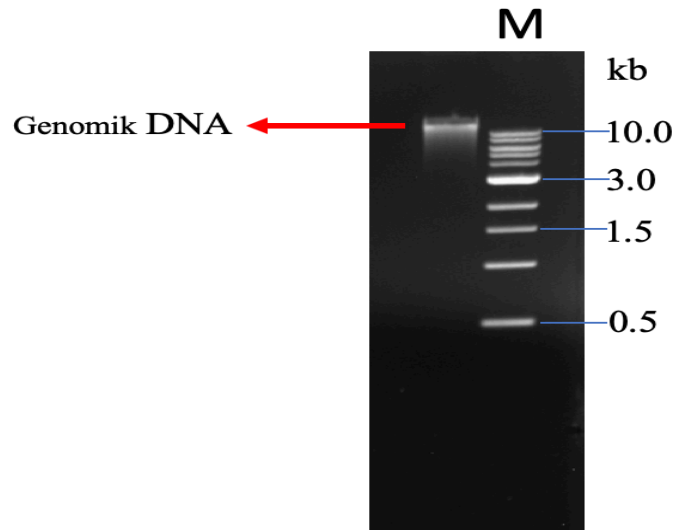
| PDB code | Model | Length | %-tage | a.a. | z-score | Ligands | Protein name |
|-----------------------------|-------------|--------|--------|------|---------|--|--|
| 1. 1qci(A) | X-ray 0.78Å | 269 | 65.4% | 269 | 1404.9 | SO4, GOL. | The 0.78 angstroms structure of a serine protease-bacillus lentus subtilisin |
| 2. 5aqe(A) | X-ray 1.10Å | 269 | 65.4% | 269 | 1404.9 | VOD, SO4, GOL. | Cooperative bio-metallic selectivity in a tailored protease enables creation of a c-c cross-coupling heckase |
| 3. 4cty(A) | X-ray 1.17Å | 269 | 65.4% | 269 | 1404.9 | | Savinase crystal structures for combined single crystal diffraction and powder diffraction analysis |
| 4. 4cgo(A) | X-ray 1.36Å | 269 | 65.4% | 269 | 1404.9 | | Savinase crystal structures for combined single crystal diffraction and powder diffraction analysis |
| 5. 1svn(A) | X-ray 1.40Å | 269 | 65.4% | 269 | 1404.9 | | Savinase |
| 6. 1wsd(A) | X-ray 1.50Å | 269 | 65.4% | 269 | 1404.9 | SO4. | Alkaline m-protease form i crystal strcuture |
| 7. 1tk2(A) | X-ray 1.54Å | 269 | 65.4% | 269 | 1404.9 | VAL-ORN-LEU-DPN-PRO-VAL-ORN-LEU-DPN-PRO. SO4. | Crystal structure of the complex formed between alkaline proteinase savinase and gramicidin s at 1.5a resolution |
| 8. 4ctz(A) | X-ray 1.57Å | 269 | 65.4% | 269 | 1404.9 | | Savinase crystal structures for combined single crystal diffraction and powder diffraction analysis |
| 9. 1ndq(A) | X-ray 1.80Å | 269 | 65.4% | 269 | 1404.9 | | Bacillus lentus subtilisin |
| 10. 3bx1(A) | X-ray | 269 | 65.4% | 269 | 1404.9 | | Complex between the barley alpha-amylase/subtilisin inhibitor and the subtilisin savinase |

Şekil 24. PDB veritabanında BHASP'ına yapısal olarak çok benzeyen proteinlerin listesi.

3.2. Genin Moleküler Karakterizasyonu

3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

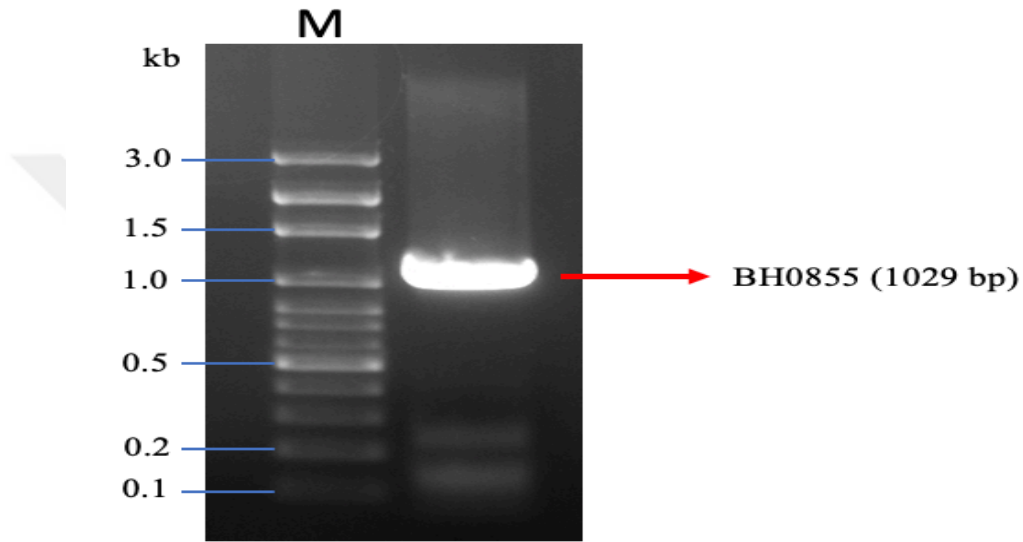
B. halodurans C-125 suşundan genomik DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA, %1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı (Şekil 25).



Şekil 25. *Bacillus halodurans* C-125 genomik DNA'sının jel görüntüsü.

3.2.2. BH0855 Geninin PZR ile çoğaltılması ve pJET 1.2/blunt Ara Vektöre Klonlanması

B. halodurans C-125 suşunda bulunan BH0855 geni uçlarına uygun restriksiyon enzim (*Bam*HI, *Eco*R1) bölgeleri eklenmiş primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Beklenen büyüklükteki (1029 bp) PZR ürünü 0,5 µg/mL etidyum bromür ihtiva eden % 1'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 26).

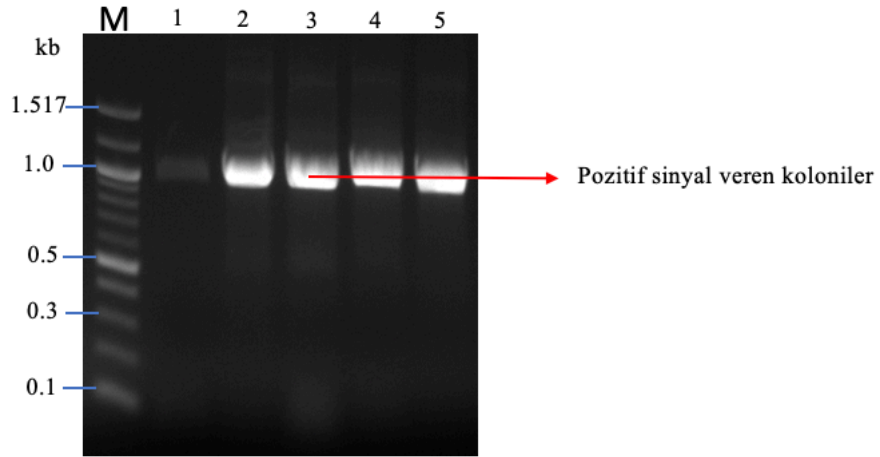


Şekil 26. BH0855 geninin bakteri genomundan PZR ile oğaltılması.

Küt uçlara sahip olarak elde edilen PZR ürünleri jelden temizlendikten sonra pJET1.2/blunt ara ektöre klonlandı ve ardından *E. coli* DH10β hücrelerine transform edildi.

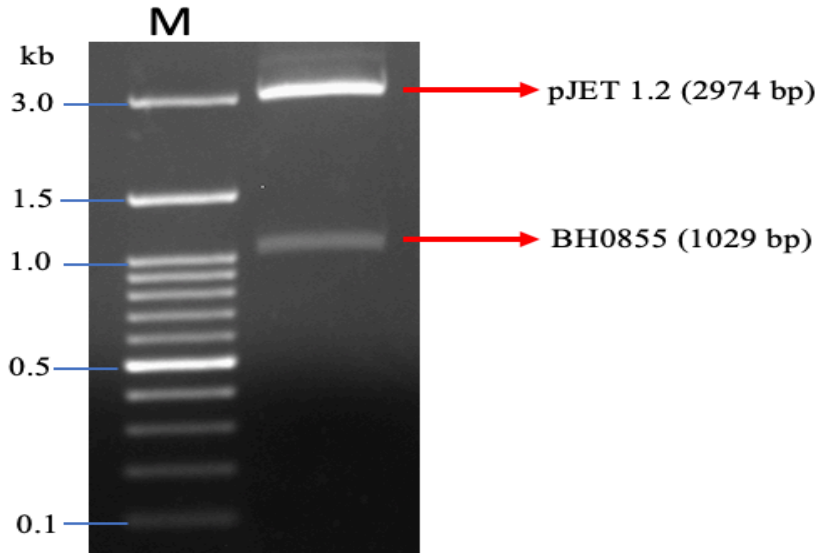
3.2.3. Rekombinant Plazmitlerin Koloni PZR ve Restriksiyon Endonükleaz Analizi

E. coli DH10β hücrelerine transformasyon sonucu elde edilen kolonilerden gene ait primerler ile koloni PZR gerçekleştirildi (Şekil 27).



Şekil 27. Gen spesifik primerler ile gerçekleştirilen PZR sonucu pozitif sinyal veren koloniler.

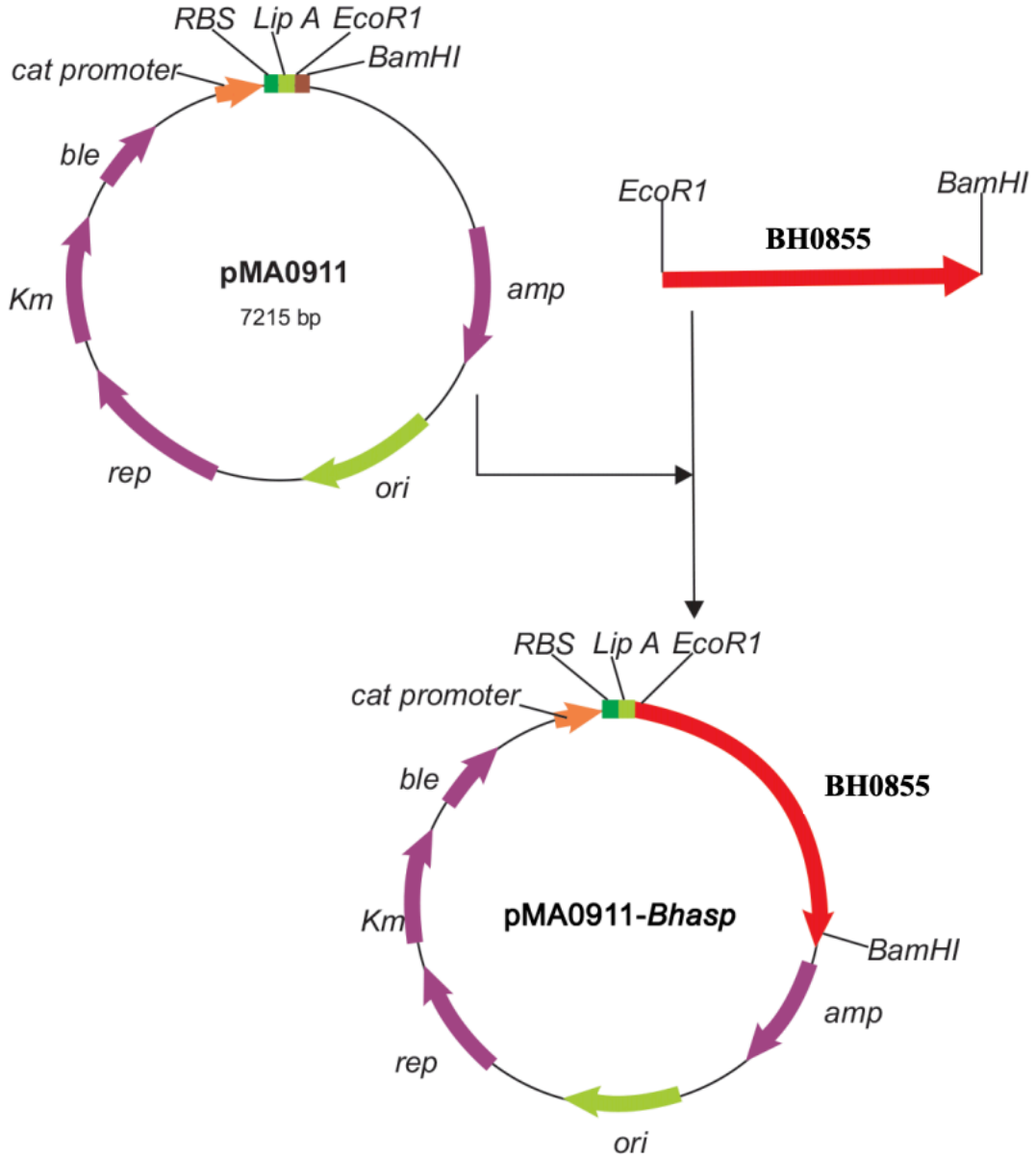
Pozitif sinyal veren kolonilerden plazmid DNA izolasyonu yapıldı ve klonlanan genleri içerip içermediklerini belirlemek için restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. Kesim sonuçları agaroz jel ile görüntülendi (Şekil 28).



Şekil 28. BH0855 geninin pJET 1.2/blunt transfer vektöründe plazmit kesimi (*Bam*H1, *Eco*R1) ile doğrulanması.

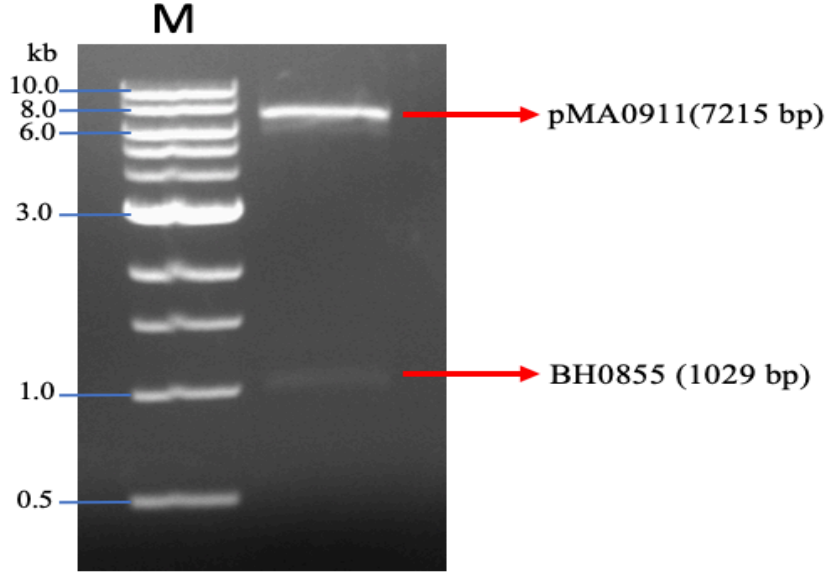
3.2.4. BH0855 geninin pMA0911 Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

BH0855 genini *B. subtilis*'te ekspres etmek için pJET-BH0855 plazmidini *Bam*HI ve *Eco*RI enzimleri ile kesildi ve gen aynı enzimlerle kesilen *B. subtilis* mekik vektörü pMA0911 içerisine sokuldu (Şekil 29).



Şekil 29. Rekombinat plazmit pMA0911-BH0855'in konstrüksiyonu. Lip A *B. subtilis*'ten alınan sinyal peptid kodlayan sekans. Ori, *amp*, *rep* ve *km* βdirenc markırını kodlayan genler.

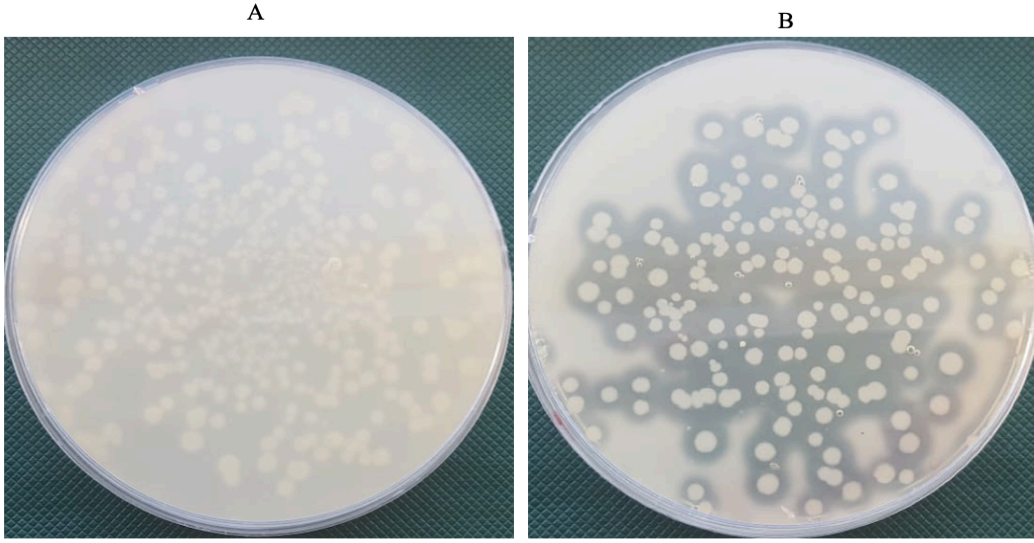
Ligasyon karışımı ilk olarak *E. coli* DH10 β hücrelerine transforme edildi. Oluşan kolonilerden plazmid DNA izolasyonu yapıldı ve klonlanan genleri içerip içermediklerini tespit etmek için restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. Kesim sonuçları jel üzerinde görüntülendi (Şekil 30).



Şekil 30. pMA0911-BH0855 ekspresyon klonunun restriksiyon enzimleri (*Bam*H1, *Eco*R1) ile doğrulanması.

3.2.5. pMA0911–BH0855 Plazmidinin *B. subtilis* WB800 Suşuna Transformasyonu

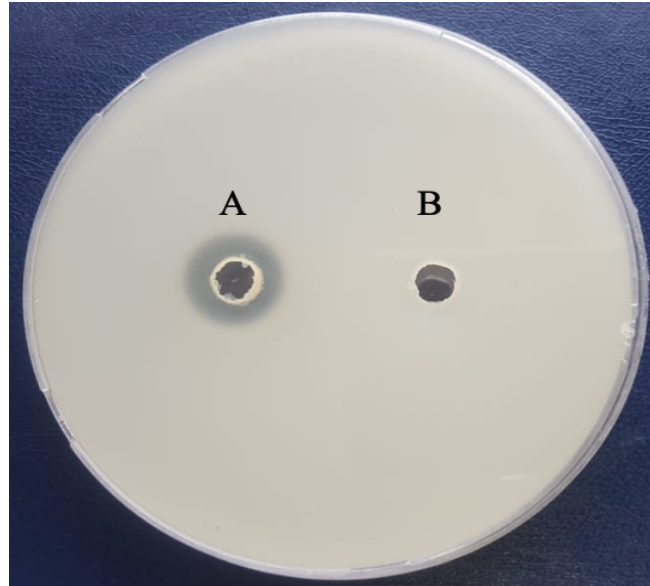
Seçilen rekombinant plazmitler (pMA0911-BH0855) WB800'e transforme edildi. % 10 yağsız süt içeren LB agarda (50 μ g/mL), klonladığımız geni içeren (pMA0911-BH0855) *B. subtilis* WB800 kolonilerinin etrafında proteaz aktivitesini gösteren halo zonlar oluşurken, boş plazmit (pMA0911) içeren hücrelerde bu zonlar oluşmadı (Şekil 31).



Şekil 31. Rekombinant *B. subtilis* WB800 hücrelerinde protein hidrolizi A (WB800-pMA0911) B (WB800-pMA0911-BH0855).

3.2.6. Skim Milk Agar Kuyu Difüzyon Deneyi

WB800 hücreleri 37 °C'de 48 saat çoğaltıldıktan sonra hücreler uzaklaştırıldı ve elde edilen supernatantlar hücre dışı protein ekspresyonu açısından değerlendirildi (Şekil 32).

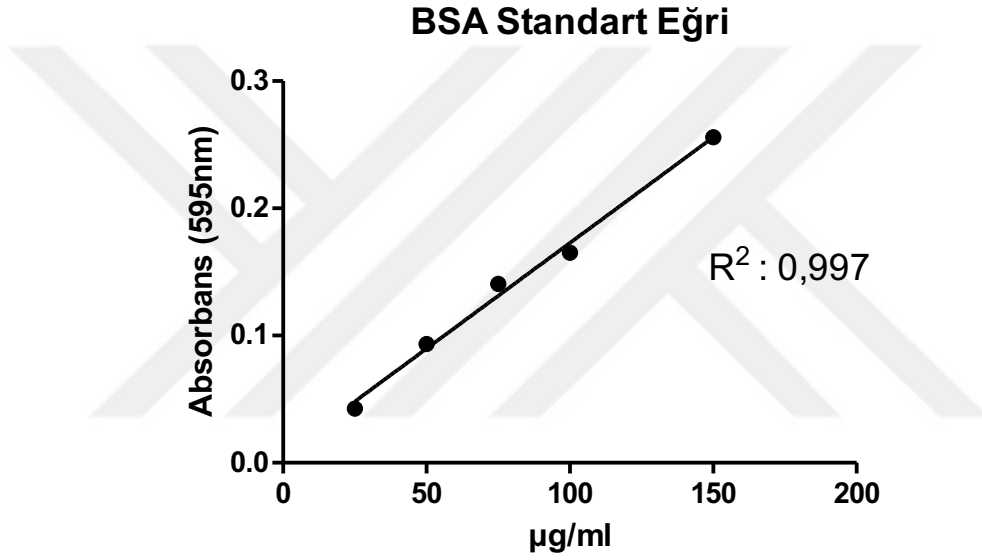


Şekil 32: Hücre dışı proteaz ekspresyonunun skim milk agarda görüntülenmesi A (WB800-pMA0911) B (WB800-pMA0911-BH0855).

3.3. Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.3.1. Protein Konsantrasyon Tayini

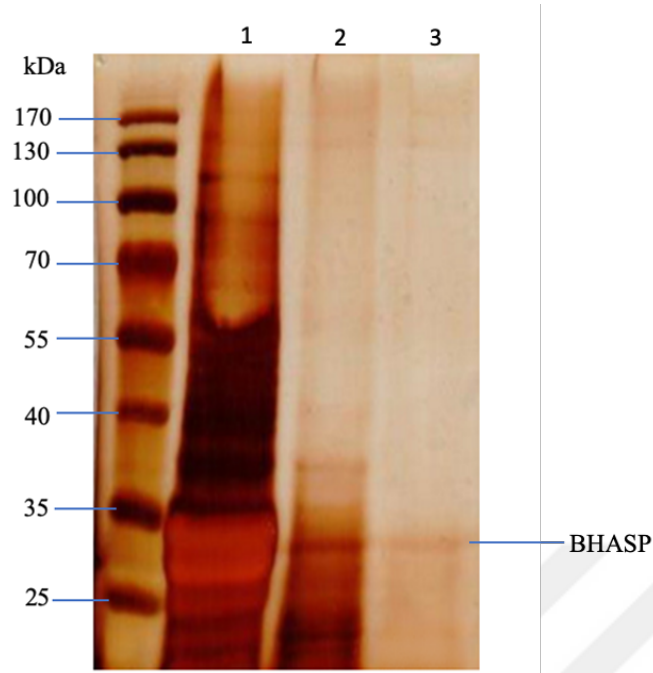
Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen enzim çözeltilerindeki proteinlerin kantitatif tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla 25–150 µg aralığında BSA kullanılarak standart grafik hazırlandı (Şekil 33). Hesaplamalar lineer regresyon analizi sonucu elde edilen eşitlik kullanılarak gerçekleştirildi.



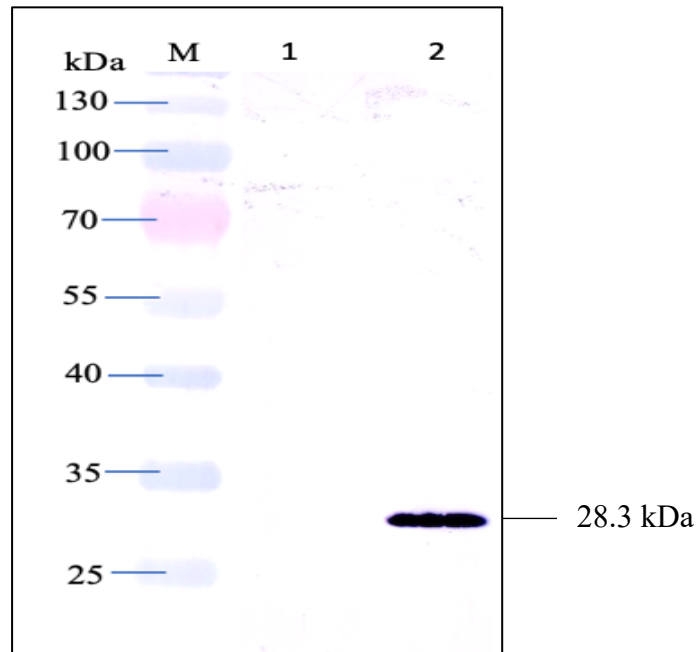
Şekil 33. BSA standart eğrisi.

3.3.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez ve Western Blot Analizi

“MagneHis™ Protein Purification System” protein saflaştırma kiti kullanılarak C-terminalinde 6XHis-tag kuyruğuna sahip BHASP saflaştırıldı. Bu proteinler kullanılarak gümüş boyama (Şekil 34) ve Western Blot Analizi yapıldı (Şekil 35).



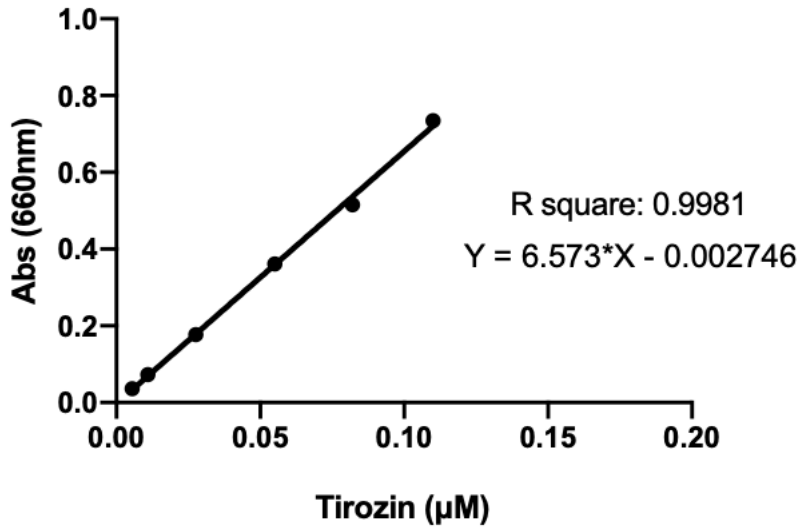
Şekil 34. Üretilen proteinlerin gümüş nitrat boyama yöntemi ile gösterilmesi. (1) WB800-pMA0911, (2) WB800-pMA0911-BH0855 (3) Saflaştırılmış BHASP



Şekil 35. BH0855 geninin kodladığı serin proteazın western blot analizi ile gösterilmesi. (1) WB800 - pMA0911, (2) WB800-pMA0911-BH0855.

3.3.3. Tirozin Standart Eğrisinin Hazırlanması

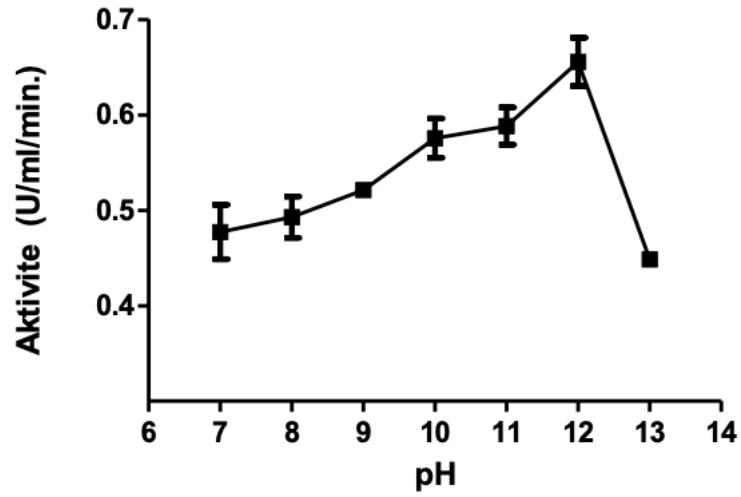
Enzim aktivitesi hesaplanmasında kullanılan tirozin standart grafiği Bölüm 2.4.5’de anlatıldığı gibi hazırlandı ve standart çözeltileri μmol proteine denk gelen absorbans değerleri Şekil 36’de gösterildi. Proteaz aktivitesi sonucu serbest kalan tirozin miktarları, grafik sonucu elde edilen formülle hesaplandı.



Şekil 36. Tirozin standart eğrisi.

3.3.4. Enzimin Optimum pH'nın Belirlenmesi

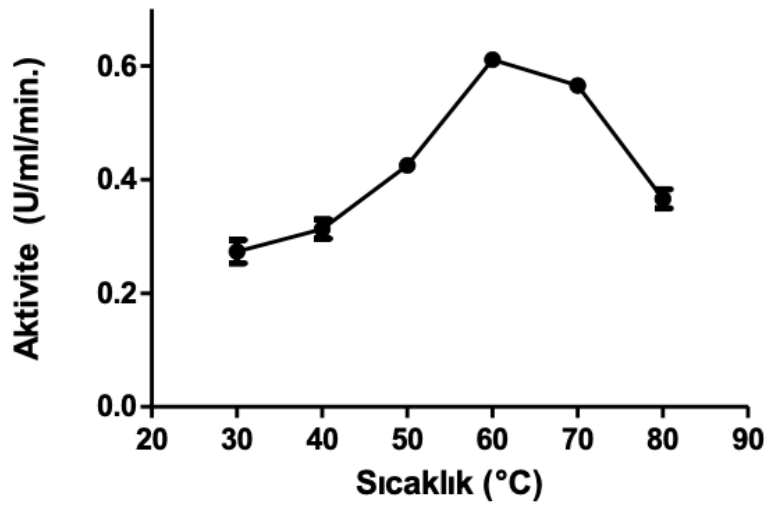
BHASP'nin optimal pH'nın belirlenmesi için enzimatik aktivite 0,1 M farklı pH değerlerindeki Tris-HCl (pH 7.0 – 8.0) ve Glisin-NaOH (pH 9.0 – 13.0) tampon çözeltileri kullanılarak gerçekleştirildi. Serin proteazın optimal pH'nın 12 olduğu belirlendi (Şekil 37).



Şekil 37. BHASP'ının optimum pH grafiği.

3.3.5. Enzimin Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi

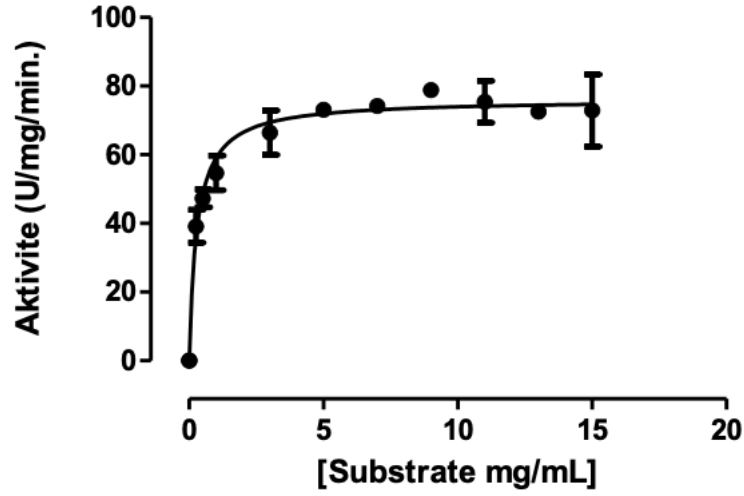
BHASP'ının optimal sıcaklığının belirlenmesi için enzimatik aktivite 30–80 °C sıcaklık aralığında pH 12'de gerçekleştirildi. Serin proteazın optimal sıcaklığı 60 °C olarak belirlendi (Şekil 38).



Şekil 38. BHASP'ının optimum sıcaklık grafiği.

3.3.6. Enzimin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

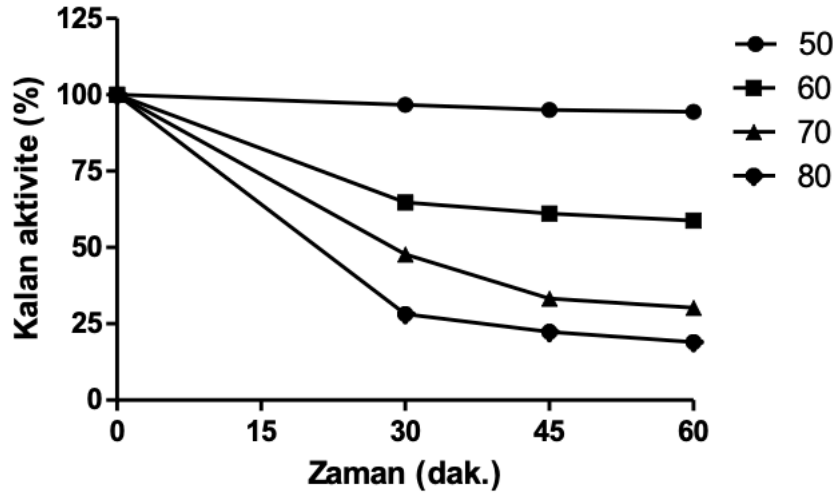
BHASP'ının başlangıç tepkime hızı 60 °C'de, 0,1 M Glisin NaOH tamponunda (pH 12), 0,15–15 mg/mL kazein konsantrasyonu aralığında ölçüldü. Aktivite tayini bölüm 2.4.6.'da anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Michaelis-Menten denkleminde K_m ve V_{max} değerleri GraphPad Prism 5 programı kullanılarak, V_{max} (76,12 U/mL) ve K_m (0,2899 mg/mL) olarak hesaplandı (Şekil 39).



Şekil 39. BHASP'ına ait Michaelis-Menten grafiği.

3.3.7. Enzimin Sıcaklık Kararlılığının Belirlenmesi

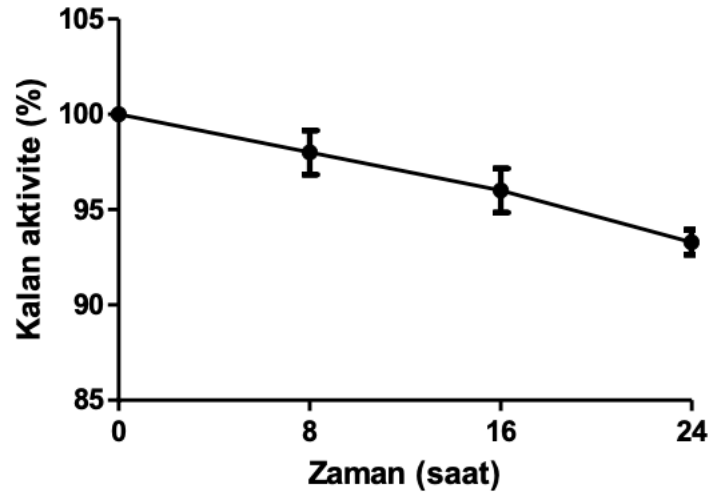
BHASP'ının sıcaklık kararlılığının belirlenmesi için enzim 50–80 °C aralığında 30, 45 ve 60 dakikalık sürelerde ön inkübasyona maruz bırakıldı. Kalan aktivite Bölüm 2.4.6.'da anlatıldığı gibi pH 12'de belirlendi. Enzimin aktivitesini 60 dakika sonunda 50 °C'de %94,4 oranında, 60 °C'de %59,8 oranında, 70 °C'de %30 oranında ve 80 °C'de ise %19 oranında koruduğu tespit edildi (Şekil 40).



Şekil 40. BHASP'ın ısı kararlılık grafiği.

3.3.8. Enzimin pH Kararlılığının Belirlenmesi

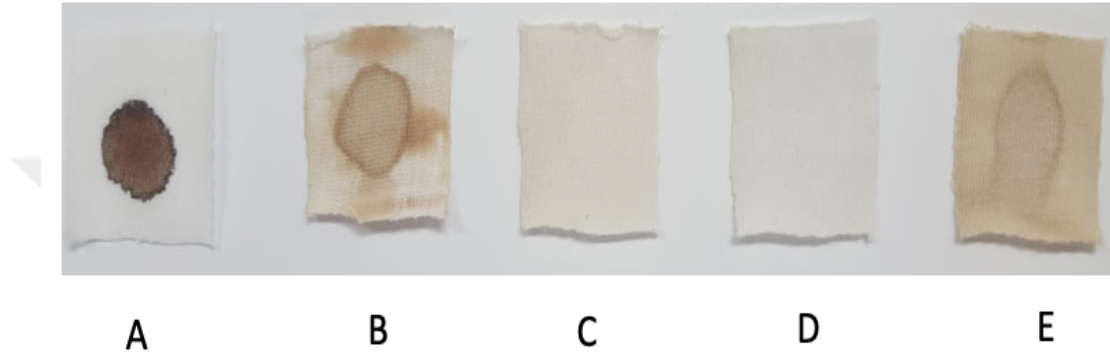
BHASP'ın pH kararlılığının belirlenmesi için enzim optimal pH'ında 37 °C'de 24 süre inkübe edildi ve 8 saat saat aralıklarla örnek alındı. Ön inkübasyondan sonra aktivite tayini bölüm 2.4.6.'da anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Sonuçlar Şekil 41'de gösterildi. Enzimin 24 saatlik süre sonunda başlangıç aktivitesinin %93,82'sini koruduğu belirlendi.



Şekil 41. BHASP'ın pH kararlılık grafiği.

3.4. Kan Lekesi Gideriminde Safılaştırılmış Enzim Uygulaması

BHASP'ının insan kanının neden olduğu lekeleri giderme yeteneği açısından performansının değerlendirmek için, çeşitli koşullarda lekeli pamuklu bez parçaları inkübe edildi (şekil 42). Sonuçlara göre BHASP enziminin kan lekesini çıkarmada etkisi olduğu görülmektedir. En iyi etki enzim ile deterjanın beraber uygulanması sonucu alınmıştır.



şekil 42. BHASP için yıkama testi rnekleri. A) Kontrol B) Su C) Deterjan (5 mg/mL) D) Deterjan (5 mg/mL) + 500 µL enzim E) 500 µL enzim

4. TARTIŞMA

Uygulama koşulları göz önüne alındığında araştırmacıların önceliği başta pH ve sıcaklık gibi ekstrem koşullara dayanıklı enzim çeşitlerinin keşfedilmesidir. Proteazlar deri, gıda, deterjan, meşrubat ve ilaç endüstrisi, atık su arıtımı, peptid sentezi gibi geniş endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalar ile dünya enzim pazarının en büyük grubunu oluşturur. Bunun yanı sıra canlı organizmalarda hayati olan fizyolojik süreçlerde önemli rollere sahiptirler. Bu sebeple ekonomik değeri olan yeni proteazların *in siliko* ve biyokimyasal olarak karakterize edilmesi önem teşkil etmektedir.

Proteazlar bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi çeşitli canlı grupları tarafından üretilmekte ve bunlardan elde edilen enzimler çeşitli endüstri dallarında geniş şekilde kullanılmaktadır. Bunlar arasında mikroorganizmalar ucuz ve kolay şekilde kültüre edilebilmeleri ve yüksek verimlilik gibi avantajları sayesinde enzim kaynağı olarak kullanılacak en ideal gruptur. Endüstrideki zorlu koşullara dayanıklı enzimlerin buzullar, çöller, tuzlu topraklar, kaplıcalar, yüksek basınç ve radyasyonlu ortamlar gibi ekstrem koşullarda yaşayan mikroorganizmalardan elde edilmesi kuvvetle muhtemeldir.

Genel olarak, alkalofilik *Bacillus* suşları nötr pH koşullarında ya büyüyemez ya da zayıf şekilde büyürken, pH'ı 9,5'ten büyük ortamlarda iyi şekilde büyümektedirler. 1969'dan beri çeşitli ortamlardan çok sayıda alkalifilik *Bacillus* suşu izole edilmiş ve birçok alkalik enzimi saflaştırılmıştır. Geçtiğimiz yirmi yıl boyunca, çalışmalar, alkali ortamlara adaptasyon mekanizmalarının aydınlatılması için alkalifilik mikroorganizmaların enzimolojisi, fizyolojisi ve moleküler genetiğine odaklanmıştır. Bu mikropların endüstriyel uygulamaları araştırılmış ve proteazlar, amilazlar, selülazlar ve ksilanazlar gibi bazı enzimler ticarileştirilmiştir (Takami vd., 2000). *B. halodurans*, toprakta bulunan, çubuk şeklinde, Gram pozitif, hareketli ve spor oluşturan bir bakteridir. *B. subtilis* ile yapılan genomik bir karşılaştırmada, *B. halodurans* suşu C-125'in daha alkali ortamlara adaptasyonuna yardımcı olabilecek benzersiz genler ve sigma faktörleri içerdiği bulunmuştur (Takami ve Horikoshi, 1999). *B. halodurans* C – 125'in tüm genom analizi Hideto Takami (1999) tarafından tamamlanmıştır.

Bu çalışmada *Bacillus halodurans* C-125 alkalik serin proteazı (BHASP) üzerinde ekspresyon çalışmaları yapıldı ve enzim *in siliko* ve fiziko-kimyasal olarak karakterize edildi.

İlk olarak alkali koşullara çok iyi adapte olmuş *Bacillus halodurans* C-125 termostabil alkalın serin proteazının (BHASP) derinlemesine yapısal dinamik analizi incelendi. Toplam 361 amino asit uzunluğuna sahip olan protein 24 amino asit uzunluğunda sinyal peptid, 69 aminoasit uzunluğunda propeptid ve 268 aminoasit uzunluğunda olgun peptitten oluşmaktadır. Sinyal peptid yapı tahmini çalışmaları sırasında hesaba katılmadı. BHASP'ının (337 aa) iki ve üç boyutlu (3D) yapı tahmini I-TASSER ile gerçekleştirildi. Tahmin edilen 3 boyutlu yapı, tüm kimyasal etkileşimleri doğrulamak için daha iyi ayarlandı. 3D yapı daha sonra bilgisayar ortamında ramachandran plot, yapısal benzerlik araştırması, β -faktör ve RMSF (root mean square fluctuations) gibi biyoinformatik araçlar ile incelendi. Çalışmalar fonksiyonel BHASP'ının, *Bacillus lentus* (PDB ID: 1GCI) alkalın proteazı ile %65,4 oranında yüksek sekans benzerliği gösterdiğini ortaya çıkardı. Ek olarak yapısal sürempresyon üzerine, tahmin edilen BHASP ve 1GCI yapılarının 0,80 RMSD dahilinde %98,14 benzerliğe sahip olduğu ortaya çıktı. BHASP'ı yapısında N-terminalden C-terminale 17 β -yaprak ve 9 α -heliks içermektedir. Ayrıca, yapısal dinamik analizler N-terminalin 8,52 Å β -faktör değeriyle BHASP'ının en dinamik bölgesi olduğunu ortaya koydu. Aynı zamanda RMSF analizi BHASP'ının N-terminalinin, küresel protein yapısındaki en dinamik bölge olduğunu doğruladı. Sonuç olarak, X-ışını veya NMR verileri olmaksızın yeni katalizör ve proteinlerin yapı-fonksiyon ilişkilerini açığa çıkarmak için 3D yapıların ve ilgili dinamik bilgilerinin deşifre edilmesi şarttır. Ek olarak ilgili bulgular geliştirilmiş termostabilite ve pH özelliklerine yönelik yapılacak BHASP mühendisliği için yararlı bilgiler sunmaktadır.

Genellikle *E. coli*, rekombinant proteinlerin üretimi için hızlı ve ekonomik bir araçtır. Fakat rekombinat proteinlerin *E. coli* sitoplazmasında aşırı üretimi sıklıkla çözünmez ve biyolojik olarak aktif olmayan inklüzyon cisimciklerinin oluşumuna neden olur. Inklüzyon cisimciklerin oluşumu büyük hacimli üretimde ana problemdir (An vd., 2004). Bu tez kapsamında yapılan klonlama çalışmalarında BH0855 geni, pET-28 a (+) vektörüne klonlanmış fakat protein ekspresyonunda başarılı olunmadı. Bunun konak hücre içinde aktivite gösteren proteazın hücreye toksik etki göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Proteazlar heterolog protein ekspresyonunda sıklıkla sorunla karşılaşılan enzim gruplarından biridir. Böyle bir durumda alternatiflerden biri ekspresyonun farklı füzyon proteinleri kullanılarak denenmesidir. Bu yüzden devamında genimiz pGEX-2T ekspresyon vektöründe GST (Glutathione S-transferase) eklenmiş şekilde üretildi. Ekspresyon gerçekleşti fakat protein sitoplazma içerisinde inaktif inklüzyon cisimcikleri

şeklinde birikti. İnküzyon cisimcikleri, üretilen proteinin doğru katlanmadığının ve bunun sonucu olarak yüksek ihtimalle aktivitede problemle karşılaşılacağına göstergesidir (Veriler paylaşılmamıştır). Heterolog protein ekspresyonunda diğer alternatifler ekspresyon için maya, virüs, böcek ve memeli hücresi gibi farklı ekspresyon sistemlerinin kullanılmasıdır. Bunların arasında *Bacillus subtilis* ekspresyon sistemi patojenik olmaması, ucuz olarak kültüre edilebilmesi, genetik manipülasyonlara açıklığı ve doğrudan büyüme ortamına salınabilen çok sayıda protein üretmesi gibi özelliklerle ön plana çıkmaktadır.

Çalışmamızda 8 (sekiz) tane proteaz geni silinmiş *B. subtilis* WB800 ($\Delta nprE$, $\Delta aprE$, Δepr , Δbpr , $mpr::ble$, $nprB::bsr$, Δvpr , $wprA::hyg$) suşu ve *Bacillus* sisteminde hücre dışı ekspresyon için tasarlanmış LipA sinyal peptidi içeren pMA0911 plazmiti kullanıldı. Plazmit, saflaştırmada kullanılacak herhangi bir etiket (tag) içermediğinden reverse primerin sonuna saflaştırmada kullanılmak üzere 6x His-Tag bölgesi eklendi.

Proteazların saflaştırılması için belirlenmiş kurallar yoktur. Kültürü fermentasyon ortamından süzme veya santrifüjleme ile ayırdıktan sonra, kültür süpernatantı, ultrafiltrasyon, amonyum sülfat çökeltmesi ya da aseton ve etanol kullanılarak gerçekleştirilen çözücü ekstraksiyonu yoluyla konsantre edilir. Ayrıca, PEG-35.000, aktive edilmiş kömür, sıcaklığa duyarlı hidrojel, enzimim ısıl işlemi ve liyofilizasyon diğer yöntemler de alkalın proteazların konsantrasyonunda kullanılır. Enzimin daha ileri saflaştırılması için afinite kromatografisi (AC), iyon değişim kromatografisi (IEC), hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC) ve jel filtrasyon kromatografisi gibi bir veya daha fazla tekniğin kombinasyonu kullanılabilir (R. Gupta vd., 2002). Çalışmamızda ekspresyon çalışmalarından sonra BHASP enzimi öncelikli olarak kültür ortamından amonyum sülfat ve diyaliz işlemi ile kısmi olarak saflaştırıldı. Saflaştırma işlemine MagneHis Protein Saflaştırma Sistemi (Promega) kullanılarak devam edildi. Bu sistem paramanyetik olarak önceden yüklenmiş nikel partiküllerinin polihistidinli proteini doğrudan ham hücre lizatından izole edilmesine olanak sağlamaktadır. Saflaştırma işleminin ardından protein Western Blot analizi ile görüntülendi. BHASP enziminin 24 aminoasitlik sinyal peptidi yapısal ve ekspresyon çalışmalarına dahil edilmedi. 69 aminoasit uzunluğundaki propeptid ekspresyon sırasında üretilmekte, sonrasında ise enzimin aktifleşmesi için bazı peptid hidrolazlar tarafından uzaklaştırılmaktadır. Bazı çalışmalar propeptidin protein katlanmasında, protein salgısında ve enzim aktivitesinin inhibisyonunda rolünü göstermiştir (Li vd., 1995). Dolayısıyla kültür ortamında sadece olgun peptidin bulunması beklenmektedir.

268 aminoasit uzunluğundaki olgun peptid (27,67 kDa) ve saflaştırma amacı ile sonuna tarafımızdan eklenen 6XHis-Tag'ın (0,82 kDa) toplam büyüklüğü 28,49 kDa'dur (<https://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>). Western Blot analizinde bu büyüklükte bir bant görülmesi ekspresyon ve saflaştırma çalışmalarının başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir. Kültür ortamından direkt olarak örnek alınıp gümüş boyama yapıldığında ekspre edilen protein jelde zayıf şekilde görüntülenmiştir. Bu ekspresyonun yeterli düzeyde gerçekleşmediğinin göstergesidir. Fermantasyon işlemi sırasında *B. subtilis*'te rekombinant plazmit kaybı ve plazmidin yapısal kararsızlığı, *B. subtilis* ekspresyon sistemi için sınırlayıcı faktörler olarak bildirilmiştir (Nguyen vd., 2005).

Genelde proteazların moleküler ağırlıkları 15–45 kDa arasında değişmektedir. Serin proteazların molekül kütleleri 18–35 kDa, subtilisinlerin molekül kütleleri ise 20-45 kDa arasındadır (Rao vd., 1998). Bazı *Bacillus* türlerinde çoklu elektroforetik alkalın proteaz formları gözlenmiştir. Bu enzimlerin çoklu formları, protein moleküllerinde enzimatik veya geri dönüşü olmayan glutamin veya asparajin kalıntılarının deaminasyonundan ya da otoproteolizden kaynaklanabilir (Jisha vd., 2013). Literatür incelendiğinde bu değerlerin altında ve üstünde sonuçlar görmek mümkündür. *Bacillus* türleri ile yapılan ve molekül kütesinin belirlendiği bazı çalışmalarda Kumar (2002) 28 kDa, Guangrong vd. (2006) 30,9 kDa, Ferrero vd. (1996) 25–40 kDa, Gessesse vd. (2003) 24 kDa, Niu vd. (2006) 40 kDa'luk proteazlar elde etmişlerdir. Balasubramani vd. (2011) *B. cereus* 1173900'den 66 kDa, Kato vd. (1992) *B. subtilis*'den 90 kDa'luk yüksek molekül kütesine sahip proteazlar elde ederken, Rai ve Mukherjee (2010) *B. subtilis* DM-04'ten 16,9 kDa ağırlığında küçük moleküler ağırlığa sahip proteaz elde etmişlerdir.

Çeşitli mikroorganizmalardan alkalın proteazlar yoğun bir şekilde incelenmekte ve özelliklerine bağlı olarak çeşitli endüstrilerde kullanılmaktadır. Alkalın proteazların elde edildiği mikroorganizma, optimal pH ve sıcaklık, substrat spesifitesi, moleküler ağırlığı, sıcaklık ve pH stabilitesi, bazı metal iyonları ve organik çözücülerin aktivite üzerine etkisi üzerinde durulan en önemli parametrelerdir.

Bir enzimin karakterizasyon çalışmaları öncelikli olarak enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi ile başlamaktadır. Çalışmamızda BHASP enziminin optimum pH'ının 12 olduğu belirlendi. Literatür incelendiğinde Wang vd. (2013) *B. amyloliquefaciens* SYB-001'den 7, Farhadian (2015) *B. subtilis* DR8806'dan 8, Silva vd. (2007) *Bacillus sp.*'den 8,5, Hutadilok-Towatana vd. (1999) *Bacillus sp.*

PS719'dan 9, Beg ve Gupta (2003) *B. mojavensis*'den 10,5, Johnvesly ve Naik (2001) *Bacillus* sp. JB-99'dan 11 optimal pH'a sahip proteazlar elde etmişlerdir. Kumar vd. (2004) *B. clausii*'den 11,5, Joshi ve Satyanarayana (2013) ise *B. lehensis*'ten 12,8 gibi yüksek optimal pH'a sahip proteazlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. *B. halodurans* C-125'ten elde ettiğimiz BHASP'mın optimal pH'ı literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında oldukça yüksektir.

Alkalin proteazlar genellikle 50–70°C aralığında optimum sıcaklık değerlerine sahiptirler. *B. halodurans* C-125'ten saflaştırılan BHASP enzimi için sıcaklık profili incelendi ve enzimin optimum sıcaklık değeri 60 °C olarak belirlendi. Literatürdeki optimum sıcaklık değerleri karşılaştırıldığında benzer ve farklı sonuçlar olduğu görülmektedir. Banerjee vd. (1999) *B. brevis* MTCC B0016'dan 37 °C, Venugopal ve Saramma (2007) *B. circulans* BM15'ten 40 °C, Matta ve Punj (1998) *B. polymyxa*'dan 50 °C, Krishna ve Devi (2005) *Bacillus* sp.'den 55 °C, Anbu (2013) *B. koreensis* BK-P21A'dan 60 °C, B. Jaouadi vd. (2008) *B. pumilus* CBS'den 65 °C, Chopra ve Mathur (1985) *B. stearothermophilus* RM-67'den 70 °C optimal sıcaklığa sahip proteazlar elde etmişlerdir. Literatürdeki bu çalışmalarda belirlenen optimum sıcaklık değerleri, saflaştırdığımız enzimin optimum sıcaklık değeri ile örtüşmektedir. Takii vd. (1998) *B. brevis* MIB001'den 75 °C, Ohta vd. (1966) *B. thermoproteolyticus*'dan 80 °C, Kaur vd. (2001) ise *Bacillus* sp. P-2'den 90 °C gibi yüksek optimum sıcaklık değerine sahip proteazlar izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Enzim kararlılığı özellikle farmasötik uygulamalarda ve endüstriyel üretimde önemli özelliklerden biridir. Kararlılık enzimlerin doğru çalışması ve ürün geliştirme etkinliği için aynı derecede önemlidir. BHASP enziminin sıcaklık kararlılığı, enzimin 1 saat boyunca optimum pH'ında farklı sıcaklıklarda (50–80 °C) inkübe edilmesiyle araştırıldı. İnkübasyon süresinden sonra (30, 45 ve 60 dakika), kalan aktiviteler standart test koşullarında spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kontrolde enzime sıcaklık muamelesi yapılmadı ve proteaz enziminin etkinliği yüzde yüz olarak kabul edildi. Sonuçlara göre 1 saat sonunda enzimin;

- 50 °C'de başlangıç aktivitesinin %94,4'ünü,
- 60 °C'de başlangıç aktivitesinin %59,8'ini,
- 70 °C'de başlangıç aktivitesinin %30,12'sini,
- 80 °C'de ise başlangıç aktivitesinin %19'unu koruduğu görüldü.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde benzer ve farklı sonuçların olduğu görülmektedir. Anandharaj vd. (2016) *B. alkalitelluris* TWI3'ten izole ettikleri proteazın 60 °C' de 30 dakika sonunda aktivitesinin %100'ünü, Briki vd. (2016) *Bacillus* sp. SB12'den izole ettikleri proteazın 60 °C'de 1 saat sonunda aktivitesinin %50'sini, Sathishkumar vd. (2015) *B. subtilis* GA CAS8'den izole ettikleri proteazın 60 °C'de 24 saat sonunda aktivitesinin %100'ünü, Farhadian vd. (2015) *B. subtilis* DR8806'dan izole ettikleri proteazın 60 °C'de 1 saat sonunda aktivitesinin %50'sini, Wang vd. (2013) *B. amyloliquefaciens* SYB-001'den elde ettikleri proteazın 60 °C'de 10 dakika sonunda aktivitesinin %20'sini, Jain vd. (2012) *Bacillus* sp.'den izole ettikleri proteazın 60 °C'de 2 saat sonunda aktivitesinin %80'inini koruduğunu bildirmişlerdir. Sonuçlar BHASP enzimin 50–60 °C'de yüksek stabiliteye sahip olduğunu gösterdi. Sıcaklık yükseldikçe enzimin kararlılığının azaldığı görüldü.

Enzimin alkali pH'da yüksek aktivite göstermesi onu deterjan endüstrisi için uygun yapmaktadır. Saflaştırılan proteazın aktivitesi kadar alkali pH'larda stabil kalması da önemlidir. BHASP'ının pH kararlılığı enzimin 37 °C'de pH 12'de 24 saatlik ön inkübasyondan sonra kalan aktivitesinin hesaplanması ile belirlendi. Enzimin 24 saat süre sonunda başlangıç aktivitesinin %93,82'sini koruduğu belirlendi. Çeşitli proteazlarla yapılan çalışmalarda Jaouadi vd. (2008) *B. pumilus* CBS'den izole ettikleri proteazın 40 °C'de pH 10,6'da 1 ve 72 saatlik süreler sonunda aktivitesinin %60'ının, Haddar vd. (2009) *B. movajensis* A21'den elde ettikleri enzimin 40 °C'de pH 7–12'de 1 saat sonunda aktivitesinin %100'ünün, Kaur vd. (2001) *Bacillus* sp. P-2'den elde ettikleri enzimin pH 7–10'da aktivitesinin %80'inin, Nascimento ve Martins (2004) *Bacillus* sp. SMIA-2'den elde ettikleri enzimin pH 9'da 24 saat sonunda aktivitesinin % 34'ünün, Sellami-Kamoun vd. (2008) *B. licheniformis* RP1'den izole ettikleri enzimin 40 °C'de pH 8–10'da aktivitesinin %100'ünün, Gomaa (2013) *B. pumilus*'tan elde ettikleri enzimin 40 °C' de pH 9'da 1 saat sonunda aktivitesinin %92,3'ünün korunduğunu bildirmişlerdir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar literatürle karşılaştırıldığında enzimin 37 °C'de pH 12'de 24 saat sonunda başlangıç aktivitesinin %93'ünden fazlasının korunması, enzimin önemli bir pH kararlılığına sahip olduğunu gösterdi.

BHASP'ının farklı kazein konsantrasyonları kullanarak (0,15–15 mg/mL) hesaplanan K_m ve V_{max} değerleri sırası ile 0,28 mg/mL ve 76,12 U/ml olarak belirlendi. Michaelis Menten denkleminde K_m ve V_{max} değerleri GraphPad Prism 5 programı kullanılarak hesaplandı. Literatürde rapor edilen alkalın proteazlar incelendiğinde, Rao vd.

(2009) *B. circulans*'tan elde ettikleri proteazın K_m değerini 0,597 mg/ml, V_{max} değerini 13825 $\mu\text{mol}/\text{min}$, Joshi ve Satyanarayana (2013) *B. lehensis*' ten elde ettikleri proteazın K_m değerini 0,35mg/ml, V_{max} değerini 7 nmol/mg/sec, Gupta vd. (2005a) *P. aeruginosa*'dan elde ettikleri proteazın K_m değerini 2,7 mg/ml, V_{max} değerini 3 $\mu\text{mol}/\text{min}$, Sari vd. (2015) *B. circulans* M34'ten izole ettikleri proteazın K_m değerini 0,96 mg/ml, V_{max} değerini 9,548 $\mu\text{mol}/\text{ml}/\text{min}$, Gupta vd. (2005b) *Bacillus* sp.'den izole ettikleri proteazın K_m değerini 3 mg/ml, V_{max} değerini 289,8 $\mu\text{g}/\text{min}$, Kazan vd. (2005) *B. clausii* GMBAE 42'den izole ettikleri proteazın K_m değerini 1,8 mg/ml, V_{max} değerini 11,5 μM , Gupta vd. (2005b) *Bacillus* sp.'den izole ettikleri proteazın K_m değerini 2 mg/ml ve V_{max} değerini 289 $\mu\text{g}/\text{min}$, Dodia vd. (2008) *Haloalkaliphilic bacterium* sp. AH-6' dan izole ettikleri proteazın K_m değerini 2,5 mg/ml ve V_{max} değerini 3,03 $\mu\text{mol}/\text{min}$ olarak bildirmişlerdir. K_m değerinin düşük olması enzimin substrata karşı ilgisinin yüksek olduğunun göstergesidir. Sonuçlar karşılaştırıldığında BHASP enziminin kazeine karşı ilgisinin yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca V_{max}/K_m değerinin yüksekliği de enzimin substratı parçalamak için güçlü bir katalitik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

Enzimin kan giderme özelliği pamuklu kumaş kullanılarak değerlendirildi. Literatür incelendiğinde benzer çalışmalar olduğu görülmektedir. Jaouadi vd. (2011) *B. pumilus*'tan, Banerjee vd., (1999) *B. brevis*'ten ve Marathe vd. (2018) *B. subtilis*'ten saflaştırdıkları alkalın proteazların deterjan varlığında ve yokluğunda pamuklu bezden kan lekesinin çıkarılmasına yardımcı olduklarını daha önce bildirmişlerdir. Çalışmamızda enzimin tek başına uygulandığında kontrole göre kan lekesini daha iyi çözdüğü açıkça görülmüştür. Fakat en iyi etki enzim ile deterjan beraber uygulandığında görülmüştür. Bunun sebebinin deterjan varlığı ile ortamın daha alkali olması ve enzimin doğası gereği optimum aktiveyi alkalın ortamda göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Proteazların endüstride ve terapötiklerde uygulamaları son yirmi yılda hızla artmıştır. Yeni protein mühendisliği stratejileri ve teknikleri, ticari proteaz pazarlarını genişletmeye devam edecektir. Çalışmamızda *B. halodurans* C-125'ten termostabil alkalın proteaz (BHASP), endüstriyel uygulamalarda başarılı bir şekilde kullanılabilmesi için arzu edilen spesifik özellikler bakımından *in siliko* ve biyokimyasal olarak karakterize edildi. Sonuç olarak BHASP, *Bacillus subtilis* sisteminde ekspresyon olanağı, yüksek termostabilite, geniş pH aralığı gibi ilgi çekici özellikler sergilemektedir. BHASP ekstrem reaksiyon koşulları altında proteoliz ve devamında yapılacak protein mühendisliği çalışmaları için iyi bir alternatiftir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada *Bacillus halodurans* C-125 alkalın serin proteaz enzimini (BHASP) kodlayan BH0855 geni, mekik vektörü pMA0911 içerisine klonlanmış ve sekiz protez geni silinmiş *Bacillus subtilis* WB800 içerisinde hücre dışı ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan proteazın optimal pH, optimal sıcaklık, pH ve sıcaklık kararlılığı ve $Km/Vmax$ gibi parametreler açısından özellikleri araştırılmıştır.

- BHASP enzimi *in silico* olarak analiz edildi.
- BH0855 geninin (1,083 bp) kodladığı alkalın serin proteaz proteini, 22 aminoasit sinyal peptit, 69 aminoasit propeptit ve 268 olgun peptit olmak üzere toplam 361 amino asit uzunluğundadır.
- Sinyal peptidi çıkarılmış BH0855 geni PZR ile çoğaltıldı ve pJET1.2/blunt ara vektöre klonlandı. Plazmit sekans ettirilerek istenilen geni içerdiği doğrulandı. Geri primerin sonuna saflaştırmada kullanılmak üzere 6XHis-tag içeren bir kuyruk eklendi.
- BH0855 geni pMA0911 mekik vektörü içerisine klonlandıktan sonra *B. subtilis* WB800 suşuna transforme edildi. Transformasyon sonrasında ekspre edilen enzim MagneHis protein saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan enzim biyokimyasal olarak karakterize edildi.
- BHASP'ının optimum pH'ı 12, optimum sıcaklığı 60 °C olarak belirlendi.
- BHASP'ının başlangıç aktivitesini, 1 saat sonunda 50 °C'de %94, 60 °C'de %59,8, 70 °C'de %30 ve 80 °C'de %19 oranında koruduğu belirlendi.
- BHASP'ının başlangıç aktivitesini, pH 12'de, 37 °C'de, 24 saat sonunda %93,82 oranında koruduğu belirlendi.
- BHASP'ının $Vmax$ değeri 76,12 U/ml , Km değeri 0,2899 mg/ml olarak hesaplandı.
- BHASP'ının deterjan katkı maddesi olarak kullanılabilceği gösterildi.

6. ÖNERİLER

Bu tez kapsamında *B. halodurans* C-125 alkalın serin proteaz geninin, *B. subtilis* WB800 suşunda hücre dışı ekspresyonu gerçekleştirilmiş ve enzim *in siliko* ve biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Elde edilen bulgular, enzimin endüstriyel olarak kullanılabilirliğini göstermiştir.

Gram – pozitif bakteri *Bacillus subtilis*, genellikle güvenli olarak kabul edilen doğası (GRAS) ve salgılama yeteneği ile protein üretimi için bir hücre fabrikası olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Besiyeri içerisine salgılanan rekombinant proteinler sıklıkla iki sebeple başarısızlığa uğrayabilir; i) rekombinant plazmitlerin kararsızlığı ii) besiyeri içerisine salgılan rekombinant proteinlerin degradasyon sebebi ile kararsızlığı. Çalışmamızda sekiz tane hücre dışı proteaz geni silinmiş WB800 suşu kullanmamız ve üretilen rekombinant proteinin göreceli olarak sıcaklık kararlılığı sebebi ile protein degradasyonu gibi bir problemle karşılaşılmamıştır. Fakat üretilen protein, plazmit kararsızlığı sebebi ile istenilen seviyede elde edilememiştir. Bu sebeple çalışmaların devamında üretilen proteazda verimi artırmak amacı ile;

- Farklı plazmit tipleri,
- Promotor optimizasyonu (doğal veya sentetik, kimyasal veya sıcaklık indüklenebilir),
- Ribozom bağlanma bölgesi kullanım stratejileri,
- Düzenleyici elementlerin optimizasyonu,
- Sinyal peptid seçimi,
- Füzyon sistemleri

gibi yöntemlerin bir veya birkaçı kullanılarak daha kompleks bir gen ekspresyon sistemi oluşturulabilir.

Ayrıca bölgeye uygun mutasyonlar ile enzim yüksek sıcaklıklarda daha kararlı hale getirilerek endüstriyel uygulamalar açısından avantaj sağlanabilir. Aynı yöntemle enzimin substrat spesifikliğı de arttırılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Abrar, T., 2017. Bacterial Protease Enzyme: Safe and Good Alternative for Industrial and Commercial Use, International Journal of Chemical and Biomolecular Science, 3, 1–10.
- Adler-Nissen, J., 1986. Enzymic Hydrolysis of Food Protein, 8.
- Adrio, J. L. ve Demain, A. L., 2014. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes, Biomolecules, 4,1, 117–139.
- An, S.-Y., Ok, M., Kim, J.-Y., Jang, M.-S., Cho, Y.-S., Choi, Y.-L., Kim, C.-H. ve Lee, Y.-C., 2004. Cloning, high-level expression and enzymatic properties of an intracellular serine protease from *Bacillus* sp. WRD-2, Indian Journal of Biochemistry&Biophysics, 41, 141–147.
- Anandharaj, M., Sivasankari, B., Siddharthan, N., Rani, R. P. ve Sivakumar, S., 2016. Production, Purification, and Biochemical Characterization of Thermostable Metallo-Protease from Novel *Bacillus alkalitelluris* TWI3 Isolated from Tannery Waste, Appl Biochem Biotechnol, 178,8, 1666–1686.
- Anbu, P., 2013. Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A), Int J Biol Macromol, 56, 162–168.
- Ather, A., 2009. Identification, Cloning and Expressions of Proteases from a Cold Adapted Organism *Aliivibrio salmonicida*.
- Baardsnes, J., Sidhu, S., MacLeod, A., Elliott, J., Morden, D., Watson, J. ve Borgford, T., 1998. *Streptomyces griseus* protease B: secretion correlates with the length of the propeptide, Journal of bacteriology, 180,12, 3241–3244.
- Balasubramani, R., Kumar, A. G., Bhavani, P. S. ve Sekaran, G., 2011. Solid-state fermentation for the production of alkaline protease by *Bacillus cereus* 1173900 using proteinaceous tannery solid waste, Current science, 100, 726–730.
- Banerjee, G. ve Ray, A. K., 2017. Impact of microbial proteases on biotechnological industries, Biotechnol Genet Eng Rev, 33,2, 119–143.
- Banerjee, U. C., Sani, R. K., Azmi, W. ve Soni, R., 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive, Process Biochemistry, 35,1, 213–219.
- Beg, Q. K. ve Gupta, R., 2003. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*, Enzyme and Microbial Technology, 32,2, 294–304.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. ve Stryer, L., 2002. Biochemistry, W H Freeman.

- Bogo, M., Cruz, K., Gonzalez Revello, A., Paula Folm, A., Brandelli, A., Paula Gued, A. ve de Souza d, A., 2017. Thermal Resistance of Proteolytic Enzymes Produced by Psychrotrophic Bacteria Isolated from Buffalo Milk, International Journal of Dairy Science, 12, 339–347.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem, 72, 248–254.
- Brandt, M., https://www.rosehulman.edu/~brandt/Chem330/Enzyme_mech_examples.pdf Enzyme Mechanism. 27.01 2019.
- Briki, S., Hamdi, O. ve Landoulsi, A., 2016. Enzymatic dehairing of goat skins using alkaline protease from *Bacillus* sp. SB12, Protein Expression and Purification, 121, 9–16.
- Brömme, D. ve Schmidt, B. F., 1999. Proteolytic Enzymes: Tools and Targets, Functional Expression of Recombinant Proteases, 13, E. E. Sterchi ve W. Stöcker editors, Springer, 199–224.
- Chopra, A. K. ve Mathur, D. K., 1985. Purification and characterization of heat-stable proteases from *Bacillus stearothermophilus* RM-67, J Dairy Sci, 68,12, 3202–3211.
- Contesini, F. J., Melo, R. R. ve Sato, H. H., 2018. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application, Crit Rev Biotechnol, 38,3, 321–334.
- Cupp-Enyard, C., 2008. Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate, J Vis Exp,19.
- Dodia, M. S., Rawal, C. M., Bhimani, H. G., Joshi, R. H., Khare, S. K. ve Singh, S. P., 2008. Purification and stability characteristics of an alkaline serine protease from a newly isolated *Haloalkaliphilic bacterium* sp. AH-6, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 35,2, 121–131.
- Doi, R. H., He, X.-S., McCready, P. ve Bakheit, N., 1991. Applications of Enzyme Biotechnology, *Bacillus subtilis: A Model System for Heterologous Gene Expression*, 20, J. W. Kelly ve T. O. Baldwin editors, Springer, Boston, MA, Boston, 261–272.
- Ellaiah, P., Srinivasulu, B. ve Kunamneni, A., 2002. A review on microbial alkaline proteases, Journal of Scientific and Industrial Research, 61, 690–704.
- Farhadian, S., 2015. Purification, biochemical characterization and structural modeling of a potential htrA-like serine protease from *Bacillus subtilis* DR8806 B Enzymatic, Journal of molecular catalysis, 115, 8-58.
- Farhadian, S., Asoodeh, A. ve Lagzian, M., 2015. Purification, biochemical characterization and structural modeling of a potential htrA-like serine protease from *Bacillus subtilis* DR8806, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 115, 51–58.

- Ferrero, M. A., Castro, G. R., Abate, C. M., Baigorí, M. D. ve Siñeriz, F., 1996. Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization, Applied Microbiology and Biotechnology, 45, 3, 327–332.
- Garske, A. L., Kapp, G. ve McAuliffe, J. C., 2017. Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology, Industrial Enzymes and Biocatalysis, 5, J. A. Kent, T. V. Bommaraju ve S. D. Barnicki editors, 2, Springer, 1571–1638.
- Gessesse, A., Hatti-Kaul, R., Gashe, B. A. ve Mattiasson, B., 2003. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather, Enzyme and Microbial Technology, 32, 5, 519–524.
- Gomaa, E. Z., 2013. Optimization and characterization of alkaline protease and carboxymethyl-cellulase produced by *Bacillus pumillus* grown on Ficus nitida wastes, Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 44, 2, 529–537.
- Guangrong, H., Tiejing, Y., Po, H. ve Jiaying, J., 2006. Purification and characterization of a protease from Thermophilic bacillus strain HS08 African Journal of Biotechnology, 5, 2433–2438.
- Gupta, A., Roy, I., Khare, S. K. ve Gupta, M. N., 2005a. Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA, Journal of Chromatography A, 1069, 2, 155–161.
- Gupta, A., Roy, I., Patel, R. K., Singh, S. P., Khare, S. K. ve Gupta, M. N., 2005b. One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp., Journal of Chromatography A, 1075, 1, 103–108.
- Gupta, R., Beg, Q. K., Khan, S. ve Chauhan, B., 2002a. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases, Appl Microbiol Biotechnol, 60,4, 381–395.
- Gupta, R., Beg, Q. ve Lorenz, P., 2002b. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and Industrial Applications, Applied microbiology and biotechnology, 59, 15–32.
- Gupta, R., Gupta, K., Saxena, R. K. ve Khan, S., 1999. Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp., Biotechnology Letters, 21, 2, 135–138.
- Haddar, A., Bougatef, A., Agrebi, R., Sellami-Kamoun, A. ve Nasri, M., 2009. A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization, Process Biochemistry, 44, 1, 29–35.
- Hamza, T. A., 2017. Bacterial Protease Enzyme: Safe and Good Alternative for Industrial and Commercial Use, International Journal of Chemical and Biomolecular Science, 3, 1, 1–10.
- Hedstrom, L., 2002. Serine Protease Mechanism and Specificity, Chemical Reviews, 102, 12, 4501–4524.

- Homaei, A., Lavajoo, F. ve Sariri, R., 2016. Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology, Int J Biol Macromol, 88, 542-552.
- Hsia, C. H., Shen, M. C., Lin, J. S., Wen, Y. K., Hwang, K. L., Cham, T. M. ve Yang, N. C., 2009. Nattokinase decreases plasma levels of fibrinogen, factor VII, and factor VIII in human subjects, Nutr Res, 29, 3, 190–196.
- Hutadilok-Towatana, N., Painupong, A. ve Suntainalert, P., 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. PS719, Journal of Bioscience and Bioengineering, 87, 5, 581–587.
- Jain, D., Pancha, I., Mishra, S. K., Shrivastav, A. ve Mishra, S., 2012. Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from *Bacillus* sp.: A potential additive for laundry detergents, Bioresource Technology, 115, 228–236.
- Jaouadi, B., Badis, A., Jaouadi, N. ve Bejar, S., 2011. The Bioengineering and Industrial Applications of Bacterial Alkaline Proteases: the Case of SAPB and KERAB.
- Jaouadi, B., Ellouz-Chaabouni, S., Rhimi, M. ve Bejar, S., 2008. Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency, Biochimie, 90, 9, 1291–1305.
- Jisha, V. N., Smitha, R. B., Pradeep, S., Sreedevi, S., Unni, K. N., Sajith, S., Priji, P., Josh, M. S. ve Benjamin, S., 2013. Versatility of microbial proteases, Advances in Enzyme Research 1, 39–51.
- Johnvesly, B. ve Naik, G. R., 2001. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium, Process Biochemistry, 37, 2, 139–144.
- Joshi, S. ve Satyanarayana, T., 2013. Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium *Bacillus lehensis*, Bioresour Technol, 131, 76–85.
- Kato, T., Yamagata, Y., Arai, T. ve Ichishima, E., 1992. 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 Biotechnol Biochem, 56, 7, 1166–1168.
- Kaur, S., Vohra, R. M., Kapoor, M., Beg, Q. K. ve Hoondal, G. S., 2001. Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 17, 2, 125-129.
- Kazan, D., Denizci, A. A., Öner, M. N. K. ve Erarslan, A., 2005. Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 32, 8, 335–344.

- Krishna, S. ve Devi, K., 2005. Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran, African Journal of Biotechnology, 4, 724–726.
- Kumar, C. G., 2002. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*, Lett Appl Microbiol, 34, 1, 13–17.
- Kumar, C. G., Joo, H.-S., Koo, Y.-M., Paik, S. R. ve Chang, C.-S., 2004. Thermostable Alkaline Protease from a Novel Marine Haloalkalophilic *Bacillus clausii* Isolate, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 20, 4, 351–357.
- Kumar, C. G., Tiwari, M. P. ve Jany, K. D., 1999. Novel alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus* spp.: purification and some properties, Process Biochemistry, 34, 5, 441–449.
- Li, Y., Hu, Z. X., Jordan, F. ve Inouye, M., 1995. Functional analysis of the propeptide of subtilisin E as an intramolecular chaperone for protein folding. Refolding and inhibitory abilities of propeptide mutants, Journal of Biological Chemistry, 270, 25127–25132.
- Mahajan, R. T. ve Badgujar, S. B., 2010. Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review, Journal of Pharmacy Research 3, 9, 2048–2068.
- Marathe, S. K., Vashistht, M. A., Prashanth, A., Parveen, N., Chakraborty, S. ve Nair, S. S., 2018. Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from sea water samples, Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 16,1, 39-46.
- Matta, H. ve Punj, V., 1998. Isolation and partial characterization of a thermostable extracellular protease of *Bacillus polymyxa* B-17, Int J Food Microbiol, 42, 3, 139–145.
- Mehtani, P., Sharma, C. ve Bhatnagar, P., 2013. Proteases: The Industrial Biocatalyst, IIS University of Science and Technology, 2, 1–12.
- Mukhtar, H., 2016. Industrial Applications and Production Sources of Serine Alkaline Proteases: A Review, Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access, 3.
- Nascimento, W. C. A. d. ve Martins, M. L. L., 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp., Brazilian Journal of Microbiology, 35, 91–96.
- Nguyen, H. D., Nguyen, Q. A., Ferreira, R. C., Ferreira, L. C., Tran, L. T. ve Schumann, W., 2005. Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability, Plasmid, 54, 3, 241–248.
- Niu, Q., Huang, X., Zhang, L., Li, Y., Li, J., Yang, J. ve Zhang, K., 2006. A neutral protease from *Bacillus nematocida*, another potential virulence factor in the infection against nematodes, Arch Microbiol, 185, 6, 439–448.

- Ohta, Y., Ogura, Y. ve Wada, A., 1966. Thermostable protease from thermophilic bacteria. I. Thermostability, physicochemical properties, and amino acid composition, J Biol Chem, 241, 24, 5919–5925.
- Pulido, M., Saito, K., Tanaka, S.-I., Koga, Y., Morikawa, M. M., Takano, T. K. ve Kanaya, S., 2006. Ca²⁺-dependent maturation of subtilisin from a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis*: the propeptide is a potent inhibitor of the mature domain but is not required for its folding, Applied and Environmental Microbiology, 72, 6, 4154–4162.
- Rai, S. K. ve Mukherjee, A. K., 2010. 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, 2, 173–180.
- Rajkumar, R., Jayappriyan, K. R. ve Rengasamy, R., 2011. Purification and characterization of a protease produced by *Bacillus megaterium* RRM2: application in detergent and dehairing industries, J Basic Microbiol, 51, 6, 614–624.
- Rani, K., Rana, R. ve Datt, S., 2012. Review on Latest Overview of Proteases, International Journal of Current Life Sciences 2, 1, 12 – 18.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. ve Deshpande, V. V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, Microbiol Mol Biol Rev, 62, 3, 597–635.
- Rawlings, N. D., 2013. Proteases: Structure and Function, Protease Families, Evolution and Mechanism of Action 1, K. Brix ve W. Stöcker editors, Springer, 1-36.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A. ve Finn, R. D., 2018. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database, 46.
- Rawlings, N. D., Morton, F. R. ve Barrett, A. J., 2007. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications, An Introduction to Peptidase and the MEROPS Database, 10, Julio Polaina ve A. P. MacCabe editors, Springer, 161-181.
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A. ve Ashraf, M., 2019. Microbial Proteases Applications, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 7, 110.
- Robinson, P. K., 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications, Essays in biochemistry, 59, 1–41.
- Roskoski, R., 2015. Reference Module in Biomedical Sciences, Principles of Enzymes, Elsevier.
- Saeki, K., Hitomi, J., Okuda, M., Hatada, Y., Kageyama, Y., Takaiwa, M., Kubota, H., Hagihara, H., Kobayashi, T., Kawai, S. ve Ito, S., 2002. A novel species of alkaliphilic *Bacillus* that produces an oxidatively stable alkaline serine protease, Extremophiles, 6, 1, 65–72.

- Sari, E., Loğoğlu, E. ve Öktemer, A., 2015. Purification and characterization of organic solvent stable serine alkaline protease from newly isolated *Bacillus circulans* M34, Biomedical Chromatography, 29, 9, 1356–1363.
- Sathishkumar, R., Ananthan, G. ve Arun, J., 2015. Production, purification and characterization of alkaline protease by ascidian associated *Bacillus subtilis* GA CAS8 using agricultural wastes, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 4, 2, 214–220.
- Sellami-Kamoun, A., Haddar, A., Ali, N. E.-H., Ghorbel-Frikha, B., Kanoun, S. ve Nasri, M., 2008. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations, Microbiological Research, 163, 3, 299–306.
- Sharma, K. M., Kumar, R., Panwar, S. ve Kumar, A., 2017. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties, Journal, genetic engineering & biotechnology, 15, 1, 115–126..
- Shimogaki, H., Takeuchi, K., Nishino, T., Ohdera, M., Kudo, T., Ohba, K., Iwama, M. ve Irie, M., 1991. Purification and properties of a novel surface-active agent- and alkaline-resistant protease from *Bacillus* sp. Y, Agric Biol Chem, 55, 9, 2251 –2258.
- Silva, C. R. d., Delatorre, A. B. ve Martins, M. L. L., 2007. Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzymatic activity, Brazilian Journal of Microbiology, 38, 253–258.
- Singh, J., Batra, N. ve Sobti, R. C., 2001. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1, Process Biochemistry, 36, 8, 781–785.
- Singh, R., Mittal, A., Kumar, M. ve Mehta, P. K., 2016. Microbial Proteases in Commercial Applications, Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences, 4, 3, 365–374.
- Spizizen, J., 1958. Transformation Of Biochemically Deficient Strains Of *Bacillus Subtilis* By Deoxyribonucleate, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 44,10, 1072-1078.
- Steele, D. B., Fiske, M. J., Steele, B. P. ve Kelley, V. C., 1992. Production of a low-molecular-weight, alkaline-active, thermostable protease by a novel, spiral-shaped bacterium, *Kurthia spiroforme*, sp. nov, Enzyme and Microbial Technology, 14, 5, 358–360.
- Subba Rao, C., Sathish, T., Ravichandra, P. ve Prakasham, R. S., 2009. Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications, Process Biochemistry, 44, 3, 262–268.
- Takami, H., 1999. Genome Analysis of Facultatively Alkaliphilic *Bacillus halodurans* C – 125, 249–284.
- Takami, H. ve Horikoshi, K., 1999. Reidentification of Facultatively Alkaliphilic *Bacillus* sp. C – 125 to *Bacillus halodurans*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 63, 5, 94 –945.

- Takami, H., Nakasone, K., Takaki, Y., Maeno, G., Sasaki, R., Masui, N., Fuji, F., HIRAMA, C., Nakamura, Y., Ogasawara, N., Kuhara, S. ve Horikoshi, K., 2000. Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*, Nucleic acids research, 28, 21, 4317–4331.
- Takii, Y., Urata, Y. ve Ueno, N., 1998. Thermostable neutral protease resembling thermolysin derived from *Bacillus brevis* MIB001, Biosci Biotechnol Biochem, 62, 5, 1028–1030.
- Trono, D., 2019. Advances in Enzyme Technology, Chapter 13 - Recombinant Enzymes in the Food and Pharmaceutical Industries, R. S. Singh, R. R. Singhanian, A. Pandey ve C. Larroche editors, Elsevier, 349–387.
- Venugopal, M. ve Saramma, A. V., 2007. An alkaline protease from *Bacillus circulans* BM15, newly isolated from a mangrove station: characterization and application in laundry detergent formulations, Indian journal of microbiology, 47, 4, 298–303.
- Wang, J., Xu, A., Wan, Y. ve Li, Q., 2013. Purification and characterization of a new metallo-neutral protease for beer brewing from *Bacillus amyloliquefaciens* SYB-001, Appl Biochem Biotechnol, 170, 8, 2021–2033.
- Westers, L., Westers, H. ve Quax, W. J., 2004. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism, Biochim Biophys Acta, 1694, 1 – 3, 299 – 310.
- Wieczorek, R., Adamala, K., Gasperi, T., Polticelli, F. ve Stano, P., 2017. Small and Random Peptides: An Unexplored Reservoir of Potentially Functional Primitive Organocatalysts. The Case of Seryl-Histidine, Life, 7.
- Xiang Qia, Yiwei Ren ve Wang, X., 2017. New advances in the biodegradation of Poly(lactic) acid, International Biodeterioration & Biodegradation, 117, 215–223.
- Yimer, D., 2014. Production and Characterization of Bacterial Protease from Isolates of soil and Agro-Industrial Wastes Haramaya University.
- Zhao, L., Ye, B., Zhang, Q., Cheng, D., Zhou, C., Cheng, S. ve Yan, X., 2019. Construction of second generation protease-deficient hosts of *Bacillus subtilis* for secretion of foreign proteins, Biotechnology and Bioengineering, 116, 8, 2052–2060.

8. EKLER

Ek 1. *Bacillus halodurans* C-125 BH0855 geni

ATGAGACAAAGTCTAAAAGTTATGGTTTTGTCAACAGTGGCATTGCTTTTCATGG
CAAACCCAGCAGCAGCAAGCGAGGAGAAAAAGGAATATTTGATTGTCGTCGAAC
CTGAAGAAGTTTCTGCTCAGAGTGTGAAGAAAGTTATGATGTGGACGTCATCCA
TGAATTTGAAGAGATTCCAGTCATTCATGCAGAATACTAAAAAAGAATTGAAA
AAATTAAGAAAGATCCGAACGTAAAAGCCATCGAAAAGAATGCAGAAGTAACC
ATCAGTCAAACGGTTCCTTGGGGAATTTCAATTCATTAATACGCAGCAAGCGCACA
ACCGCGGTATTTTTGGTAACGGTGCTCGAGTCGCTGTCCTTGATACAGGAATTGC
TTCACACCCAGACTTACGAATTGCAGGGGGAGCGAGCTTTATTTCAAGCGAGCCT
TCCTATCATGACAATAACGGACACGGAACTCACGTGGCTGGTACAATCGCTGCGT
TAAACAATTCAATCGGTGTGCTTGGTGTAGCACCATCGGCTGACTTGTACGCTGT
GAAAGTTCTTGATCGGAATGGAAGTGGTTCGCTTGCTTCTGTAGCTCAAGGAATC
GAATGGGCAATTAACAACAACATGCACATTATTAATATGAGCCTTGGAAGCACG
AGTGGTTCTAGCACGTTAGAGTTAGCTGTCAACCGAGCAAACAATGCTGGTATTC
TCTTAGTAGGGGCAGCAGGTAATACGGGTAGACAAGGAGTTAACTATCCTGCTA
GATACTCTGGTGTATGGCGGTTGCAGCAGTTGATCAAAATGGTCAACGCGCAAG
CTTCTCTACGTATGGCCCAGAAATTGAAATTTCTGCACCTGGTGTCAACGTAAAC
AGCACGTACACAGGCAATCGTTACGTATCGCTTTCTGGAACATCTATGGCAACAC
CACACGTTGCTGGAGTTGCTGCACTTGTGAAGAGCAGATATCCTAGCTATACGAA
CAACCAAATTCGCCAGCGTATTAATCAAACAGCAACGTATCTAGGTTCTCCTAGC
CTTTATGGCAATGGATTAGTACATGCTGGACGTGCAACACAATAA

Ek 2. Bhasp protein sekansı

Sinyal sekansı (24 aa):

MRQSLKVMVLSTVALLFMANPAAA

Propeptid (69aa):

SEEKKEYLIVVEPEEVSAQSVEESYDVDVIHEFEEIPVIHAELTKKELKKLKKDPNVKA
IEKNAEVTIS

Matür protein (268 aa):

QTPVWGIFINTQQAHNRGIFGNGARVAVLDTGIASHPDLRIAGGASFISSEPSYHDNN
GHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSADLYAVKVLDRNGSGSLASVAQGIEWAINNN
MHIINMSLGSTSGSSTLELAVNRANNAGILLVGAAGNTGRQGVNYPARYSGVMAVA
AVDQNGQRASFSTYGPEIEISAPGVNVNSTYTGNNRYVSLSGTSMATPHVAGVAALVK
SRYPSTNNQIRQRINQTATYLGSPSLYGNGLVHAGRATQ

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Edirne’de doğdu. İlkokulu Karakasım Köyü İlköğretim Okulu’nda, ortaokulu Atatürk Ortaokulu’nda bitirdi. Lise öğrenimini İlhami Ertem Lisesi’nde tamamladı. 2004 yılında başladığı Dumlupınar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nü 2008 yılında birincilikle bitirdi. Yüksek Lisans öğrenimini Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında 2010 yılında tamamladı. 2012 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Prof. Dr. Kazım SEZEN danışmanlığında doktora öğrenimine başladı. 2014–2015 yılında TÜBİTAK 2214–A Burs Programı ile Valencia Üniversitesi’nde (İspanya) çalışmalar gerçekleştirdi. 2012 yılından beri Giresun Üniversitesi’nde öğretim görevlisi olarak görev yapmaktadır.