

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***BACILLUS CIRCULANS* M34'TEN PROTEAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Esmâ SARI

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2011**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Esma SARİ tarafından hazırlanan “*Bacillus circulans* M34’ten Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” adlı tez çalışması 15/06/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Atilla ÖKTEMER

Jüri Üyeleri :

Başkan: Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI,
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya A.B.D.

Üye : Prof. Dr. Atilla ÖKTEMER,
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya A.B.D.

Üye : Doç. Dr. Elif LOĞOĞLU,
Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya A.B.D.

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof.Dr.Özer KOLSARICI
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BACILLUS CIRCULANS M34'TEN PROTEAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Esmâ SARİ

Ankara Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Atilla ÖKTEMER

Bu çalışmada topraktan izole edilen *Bacillus circulans* M34'ten proteaz enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Proteaz enzimi; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesinden sonra Q-Sepharose anyon değişim kromatografisi ve Sepharose 4B-bacitracin afinite kromatografisiyle, sırasıyla %47,29 ve %41,05 verimle saflaştırılmıştır. Saflaştırma katsayısı ise her bir kromatografi için sırasıyla 9,48 ve 102,88 olarak tespit edilmiştir. Enzimin molekül kütlesi; SDS-PAGE ve Jel filtrasyon kromatografisi ile 27,5 kDa olarak bulunmuştur. Enzimin optimum sıcaklığının ve pH'nın sırasıyla 50°C ve 11 olduğu tespit edilmiştir. Enzim; 8'den 11'ye kadar olan geniş bir pH aralığında 40°C'de bir saatlik inkübasyon sonrasında aktivitesinin %97'sini koruyarak büyük ölçüde kararlı kalmıştır. pH 6-7, pH 4-5 ve pH 12'de ise enzim aktivitesinin sırasıyla %85, %75 ve %60'ı korunmuştur. Enzimin; 40 °C ve 50 °C sıcaklıklarda 1 saat kararlılığını koruduğu ancak 60 °C ve 70 °C sıcaklıkta aktivitesini çok çabuk kaybettiği görülmüştür. Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi incelendiğinde Zn^{2+} , Cu^{2+} ve Co^{2+} enzim aktivitesini artırırken Sn^{2+} , Fe^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} ve Mg^{2+} varlığında aktivitede kayıp gözlenmiştir. K^{1+} , Ca^{2+} ve Na^{1+} iyonlarının ise enzim aktivitesi üzerine bir etkisi olmamıştır. Etanol çözeltisi ile enzim aktivitesinde artış gözlenirken ksilen varlığında enzim aktivitesinde düşüş gözlemlenmiştir. DMSO, toluen, butanol ve benzen varlığında enzim aktivitesinde sırasıyla %6, %6, %14 ve %22'lik bir düşüş gözlenmiştir. Enzimin yüzey aktif maddelere ve yükseltgenlere karşı kararlılığını koruduğu ancak yüzey aktif bir madde olan SDS varlığında aktivitesinin %80'ini kaybettiği görülmüştür. Enziminin; kazein, jelatin, keratin, ovalbumin ve BSA gibi doğal substratlar karşısında en yüksek aktiviteyi kazein substratına karşı gösterdiği görülmüştür. Enzimin serin spesifik inhibitörü olan PMSF ile neredeyse tamamen inhibe edilmiştir. EDTA varlığında aktivitede görülen %27'lik kayıpta enzimin metal bağlama bölgesine sahip olduğunu göstermiştir. Bu inhibisyon profili, bu proteazın serin proteaz sınıflandırılması ile tutarlı olduğunu göstermiştir. Enzimin Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak tespit edilen K_m ve V_m değerleri sırasıyla 0,96 mg/ml ve 9,548 $\mu\text{mol ml}^{-1} \text{dk}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Haziran 2011, 103 sayfa

Anahtar Kelimeler: Serin alkalın proteaz, Q-Sepharose anyon değişim kromatografisi, Sepharose-bacitracin afinite kromatografisi, Karakterizasyon

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEASE FROM *BACILLUS CIRCULANS* M34

Esma SARİ

Ankara University

Graduate School of Naturel and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor : Prof. Dr. Atilla ÖKTEMER

In this work, purification and characterization of a protease produced by *Bacillus circulans* M34 isolated from a soil sample. The protease was purified by Q-Sepharose anion exchange chromatography and Sepharose–bacitracin affinity chromatography followed by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation with a yield of 47,29% and 41,05%, respectively. Purification fold obtained by using Q-Sepharose anion exchange chromatography and Sepharose–bacitracin affinity chromatography were 9,48 and 102,88, respectively. The molecular mass of the purified enzyme determined by using SDS–PAGE and gel filtration chromatography were approximately 27,5 kDa. The optimum pH and temperature of protease was 11 and 50 °C, respectively. The purified enzyme was stable temperatures of 40 °C and 50 °C after incubation for one hour but rapidly deactivated at temperatures of 60 °C and 70 °C. The purified protease was stable over a wide pH range, maintaining 97% of its original activity at pH 8.0–11.0 after incubation at 40 °C for 60 min. The enzyme retained 85%, 75% and 60% of its original activity at pH 6-7, pH 4-5 and pH 12, respectively. The effect of various metal ions on protease activity was tested. While Zn^{2+} , Cu^{2+} and Co^{2+} increased protease activity, some other metals such as Sn^{2+} , Fe^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} ve Mg^{2+} inactivated enzyme activity. K^{1+} , Ca^{2+} and Na^{1+} showed no effect on protease activity. Xylene were inhibitory to the protease activity whereas ethanol were stimulatory. DMSO, toluene, butanol and benzene had fewer inhibitory effects, bringing about 6%, 6%, 14% and 22% decreases in activity, respectively. The purified protease was found to be stable in the surfactants and oxidizing agent, but more than 80% inactivation was observed in the presence of SDS. The proteases showed highest activity towards casein relative to other native proteins such as gelatin, ceratin, egg albumin and BSA. The protease was almost completely inhibited by the serine protease inhibitor PMSF (up to 95%). The enzyme has metals binding site since 27% of the activity was retained in the presence of EDTA. This inhibition profile is consistent with the classification of this protease as serine proteases. The kinetic parameters, V_{max} and K_m , of the purified protease were determined by using Lineweaver-Burk plot 0,96 mg/ml and 9,548 $\mu\text{mol ml}^{-1} \text{ dk}^{-1}$, respectively.

June 2011, 103 pages

Key Words: Serine alkaline protease, Q-Sepharose anion exchange chromatography, Sepharose–bacitracin affinity chromatography, Characterization

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım esnasında ve tüm yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen, bana her konuda yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. Atilla ÖKTEMER'e (Ankara Üniversitesi) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamı okuyarak çok değerli yorumlar yapan ve çalışmamın son halini almasında büyük emeği geçen Doç. Dr. Elif LOĞOĞLU'na (Gazi Üniversitesi) teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu çalışmayı yürütürken bilgisini benimle paylaşan ve çalışmamın her aşamasında tartışma olanağı bulduğum arkadaşlarım Refiye TEKİNER ve Münteha Nur SONUÇ'a teşekkür ederim. Eğitimimin her aşamasında emeği geçen tüm hocalarıma çok teşekkür ederim.

Çalışmalarıma değerli fikirleri, bilgi birikimi ve uygulamalardaki yardımlarıyla katkıda bulunan Mustafa HACİÖMEROĞLU'na (Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi) çok teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, maddi ve manevi desteklerini her an arkamda hissettiğim aileme sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Esmâ SARİ

Ankara, Haziran 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI VE KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Kuramsal Temeller	19
2.2 Proteazların Adlandırılması ve Sınıflandırılması	20
2.2.1 Omega-peptidazlar.....	22
2.2.2 Ekzopeptidazlar	22
2.2.3 Endopeptidazlar	23
2.2.3.1 Serin proteaz.....	24
2.2.3.2 Sistein proteaz	31
2.2.3.3 Aspartik proteaz.....	34
2.2.3.4 Metallo proteaz.....	35
2.2.3.5 Treonin proteaz	36
2.2.3.6 Glutamik proteaz	36
2.3 Proteazların Katalitik Etki Mekanizması.....	37
2.3.1 Serin proteazın katalitik mekanizması	38
2.3.2 Aspartik proteazın katalitik mekanizması	40
2.3.3 Sistein proteazın katalitik mekanizması	41
2.3.4 Metallo proteazın katalitik mekanizması.....	42
2.4 Proteaz Enziminin Kullanım Alanları	43
2.5 Proteaz Kaynakları	47
2.5.1 Bitkilerden elde edilen proteazlar.....	48
2.5.2 Hayvanlardan elde edilen proteazlar	50
2.5.3 Mikrobiyal kaynaklı proteazlar.....	51
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	54

3.1 Materyal	54
3.1.1 Laboratuvar ekipmanları	54
3.1.2 Kullanılan kimyasallar	54
3.1.3 Mikroorganizma	55
3.2 Yöntem	55
3.2.1 <i>Bacillus circulans</i> M34'den proteaz enziminin üretimi ve kısmi saflaştırılması	55
3.2.1.1 <i>Bacillus circulans</i> M34'den kısmi saflaştırılan proteaz enziminin Q Sepharose anyon değiştirici kolona yüklenmesi	56
3.2.1.2 Afinite Kromatografisi için kolon dolgu maddesinin hazırlanması ve ligandın bağlanması	56
3.2.1.3 <i>Bacillus circulans</i> M34'den kısmi saflaştırılan proteaz enziminin CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B- bacitracin afinite kolonuna yüklenmesi	57
3.2.1.4 Proteaz aktivitesinin belirlenmesi	58
3.2.1.5 Tirozin standart grafiğinin hazırlanması	58
3.2.1.6 Protein miktarının belirlenmesi	59
3.2.1.7 Protein standart grafiğinin hazırlanması	60
3.2.2 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enziminin karakterizasyonu	60
3.2.2.1 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enziminin molekül kütlesinin SDS-PAGE ile belirlenmesi	60
3.2.2.2 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enziminin molekül kütlesinin Jel filtrasyon kromatografisi ile belirlenmesi	61
3.2.2.3 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığının ve sıcaklık kararlılığının belirlenmesi	61
3.2.2.4 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH değerinin ve pH kararlılığının belirlenmesi	62
3.2.2.5 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi	63
3.2.2.6 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisinin belirlenmesi	63
3.2.2.7 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerin ve yükseltgenlerin etkisinin belirlenmesi	64
3.2.2.8 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara karşı spesifitesinin belirlenmesi	64

3.2.2.9 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine amino asit inhibitörlerinin etkisinin belirlenmesi	65
3.2.2.10 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enziminin Michaelis Menten Kinetik sabitlerinin belirlenmesi	65
4. BULGULAR	67
4.1 <i>Bacillus circulans</i> M34'ten Proteaz Üretimi	67
4.2 Proteaz Enziminin Saflaştırılması	67
4.3 <i>Bacillus circulans</i> M34'den Saflaştırılan Proteaz Enziminin Karakterizasyonu	71
4.3.1 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enziminin SDS-PAGE ile belirlenen molekül kütlesi	71
4.3.2 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile belirlenen molekül kütlesi	72
4.3.3 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık profili ve kararlılığı	72
4.3.4 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enziminin pH profili ve kararlılığı	74
4.3.5 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisi	75
4.3.6 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisi	76
4.3.7 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerin ve yükseltgenlerin etkisi	76
4.3.8 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara karşı spesifitesi	77
4.3.9 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine amino asit inhibitörlerinin etkisi	78
4.3.10 <i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enziminin Michaelis Menten Kinetik sabitleri	78
5. TARTIşMA VE SONUÇ	80
KAYNAKLAR	94
EK 1 Tirozin ve Protein Standart Grafiği	101
EK 2 Jel Filtrasyon Kromatografisi Standart Grafiği	102
ÖZGEÇMİş	103

KISALTMALAR

BSA	Sığır serum albumini
CM	Karboksimetil
DCI	Dikloro izoproterenol
DEAE	Dietil amino etil
DMSO	Dimetil sülfoksit
DTT	Ditiyo treitol
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
kDa	Kilo dalton
Km, Vm	Michaels Menten kinetik sabitleri
PMSF	Fenil metil sülfonil florür
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TCA	Trikloroasetik asit
TİK	Türkiye İstatistik Kurumu
TLCK	Tosil-L-lizin klorometil keton
Tris	2-Amino-2-hiroksimetil-propan-1,3-diol
U	Ünite
UV	Ultraviole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Proteolitik enzimlerin kataliz reaksiyonu çeşidine göre sınıflandırılması.....	21
Şekil 2.2	Tripsin, Kimotripsin ve elastazın substrat bağlayıcı cepleri.....	30
Şekil 2.3	Kimotripsinojen, tripsinojen ve elastazın karşılaştırılması.....	31
Şekil 2.4	Treonin proteazın aktif bölgesi ve oksianyon boşluğu.....	36
Şekil 2.5	Proteazların etki mekanizmalarına genel bir bakış.....	37
Şekil 2.6	Kimotripsinin katalitik etki mekanizması.....	38
Şekil 2.7	Serin proteazın inhibisyon reaksiyonu.....	39
Şekil 2.8	Aspartik Proteaz için önerilen en yaygın katalitik mekanizma.....	40
Şekil 2.9	Papainin katalitik etki mekanizması.....	41
Şekil 2.10	Metallo proteaz enzimlerden biri olan TLN'nin katalitik etki mekanizması.....	42
Şekil 2.11	Dünya çapındaki toplam endsütriyel enzim satışlarının yüzdesel dağılımı.....	43
Şekil 2.12	Ülkemiz 2010 yılı bazı enzim ithalat değerlerinin yüzdesel dağılımı	44
Şekil 2.13	Proteazın biyolojik kaynaklarda dağılımı.....	48
Şekil 2.14	Proteaz saflaştırılması ve karakterizasyonu için kullanılan bitki bölümlerinin dağılımı.....	48
Şekil 2.15	Bitkilerden elde edilen proteazların dağılımı.....	49
Şekil 2.16	Hayvanlardan elde edilen proteazların dağılımı.....	50
Şekil 2.17	Mikrobiyal kaynaklı proteazların dağılımı.....	52
Şekil 4.1	<i>Bacillus circulans</i> M34'ten saflaştırılan proteaz enziminin Q Sepharose anyon değiştirme kromatografisi sonucu elde edilen ürünlerinin protein miktarları ve aktiviteleri.....	68
Şekil 4.2	<i>Bacillus circulans</i> M34'ten saflaştırılan proteaz enziminin Q Sepharose anyon değiştirme kromatogramı.....	68
Şekil 4.3	<i>Bacillus circulans</i> M34'ten saflaştırılan proteaz enziminin Sepharose-bacitracin afinite kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonlarının protein miktarları ve aktiviteleri.....	70
Şekil 4.4	<i>Bacillus circulans</i> M34'ten saflaştırılan proteaz enziminin Sepharose-bacitracin afinite kromatogramı.....	70
Şekil 4.5	<i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü.....	71
Şekil 4.6	<i>Bacillus Circulans</i> M34'ten saflaştırılan proteaz enziminin Superdex 75 Jel filitrasyon kromatogramı.....	72
Şekil 4.7	<i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık profili.....	73
Şekil 4.8	<i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık kararlılığı.....	73
Şekil 4.9	<i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enziminin pH profili ve kararlılığı.....	74
Şekil 4.10	<i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği.....	79

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Bazı proteaz sınıflarının örnekleri ve özellikleri	24
Çizelge 2.2	Serin proteazların genel özellikleri	25
Çizelge 2.3	Aspartik proteazlara bazı örnekler	34
Çizelge 2.4	Ülkemiz 2010 yılı bazı enzim ithalat değerleri	44
Çizelge 2.5	Endüstride proteaz	45
Çizelge 3.1	Tirozin standart grafiğinin hazırlanması	59
Çizelge 3.2	Protein standart grafiğinin hazırlanması	60
Çizelge 3.3	Enzimin farklı sıcaklıklara karşı kararlılığının belirlenmesi.....	62
Çizelge 4.1	Proteaz enziminin <i>Bacillus circulans</i> M34'ten iyon değişim kromatografisi ile saflaştırması.....	67
Çizelge 4.2	Proteaz enziminin <i>Bacillus circulans</i> M34'ten afinite kromatografisi ile saflaştırması.....	69
Çizelge 4.3	<i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisi	75
Çizelge 4.4	<i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisi.....	76
Çizelge 4.5	Proteaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerin ve yükseltgenlerin etkisi.....	77
Çizelge 4.6	<i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara karşı spesifitesi	77
Çizelge 4.6	<i>Bacillus circulans</i> M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine amino asit inhibitörlerinin etkisi	78

1. GİRİŞ

Hücrenin elektriksel ve biyokimyasal aktivitelerini analiz ettiğimizde, gerçekte proteinlerini analiz ettiğimizi görürüz. Hücrenin kuru kütlesini en çok proteinler oluşturmaktadır. Proteinler hücrenin sadece yapı taşları değildir aynı zamanda hücrenin hemen hemen tüm fonksiyonlarını da yürütürler. Bizim; genlerin nasıl çalıştığı, kasların nasıl kasıldığını, sinirlerin elektriği nasıl naklettiği, embriyonun nasıl geliştiği ya da vücudumuzun nasıl işlediği öğrenmeden önce derin bir protein anlayışına ulaşmamız gereklidir.

Proteinler tarafından gerçekleştirilen önemli işlevlerden biri de kimyasal reaksiyonları katalizleme yeteneğidir. Eduard Buchner ve Emil Fischer'in çalışmaları sayesinde katalitik fonksiyon proteinlerde tanınan ilk biyolojik işlevler arasında yerini almıştır. Eduard Buchner ve Emil Fischer substratları ürüne dönüştürme yeteneği olan bazı proteinleri tanımlamış ve karakterize etmişlerdir. Kimyasal katalizörlere benzeyen bu proteinlerin reaksiyonun hızını arttırdığı ancak ürünlerle substratlar arasında oluşan dengeyi bozmadığı gözlemlenmiştir. Bu biyolojik katalizörler Yunancada "in yeast" ("maya içinde") anlamında olan 'en' 'zyme' isminden türetilerek enzim adını almıştır.

Hücrelerde meydana gelen tüm reaksiyonlar enzim aktivitesi ile düzenlenmektedir. Enzimler metabolik reaksiyonları katalizler ve ortamda bulunmamaları durumunda reaksiyonların kinetik olarak önemsiz bir hızda canlı, dinamik sistemlerle uyumlu bir şekilde devam etmesini sağlarlar. Enzim varlığı reaksiyonun hızının daha çok 10^3 – 10^9 aralığında arttırsa da 10^{15} kata kadar arttırabildiği (katalizleyebildiği) görülmüştür. Enzimler; karbohidrat, amino asit, lipid sentezi ve bunların bozulması ya da katabolik reaksiyonlarından, DNA'nın tamiri ve sentezi, nöronlar aracılığıyla uyarıların iletimi, programlı hücre ölümü ya da apoptosis, kan pıhtılaşması kaskad reaksiyonu, proteinlerin bozulması, proteinlerin membranlar arasında alınması ve verilmesine kadar bir çok hücresel sürecin katalizinde bulunmaktadır. Bu liste çok kapsamlıdır ve her reaksiyon için hücre eşsiz özgüllük ile reaksiyonu katalize eden benzersiz bir enzim kullanır (Whitford 2005).

Proteinler yapıları nedeniyle çeşitli dış etkilere karşı hassastır. Yüksek sıcaklık, kimyasal değişiklikler, proteinlerin yapılarında hasara neden olup üç boyutlu ve katlı yapılarını bozabilmektedir. Böyle bir durumda işlevlerini kaybederek zararlı hale gelen proteinlerin yok edilmeleri gerekmektedir. Hücreler proteinlerini iki adımda yıkar. Birinci adımda hücre, hedef proteinin yararlı mı yararsız mı olduğuna yani yıkılmasına ya da yıkılmamasına karar verir. Karar, bir çeşit ölüm işaretleyicisi olan ubikuitin denilen küçük bir proteinin, yıkılacak proteinle kovalent bağ yapmasıyla ilan edilir. Temelde ubikuitin yıkım için bir köprü görevi görmektedir. Proteaz için bir tanıma elementi olan ubikuitin, hedef proteini proteaza bağlayan bir yapıştırıcı, iki ortağı bir araya getiren çok yararlı bir köprüdür. Proteazlar hücrenin infaz bölümü olarak çalışır. Sürecin sonunda da hedef protein proteaz enzimi tarafından yıkılır ve vücut ihtiyacı olmayan bir molekülden kurtulur (Ciechanover 2010).

Bu tez çalışmasında topraktan izole edilen *Bacillus circulans* M34'den proteaz enzimi saflaştırılması ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Saflaştırılan bu enzimi karakterize etmek için; optimum sıcaklık ve pH, sıcaklık ve pH kararlılığı gibi parametrelerin yanı sıra enzim aktivitesi üzerine; metal iyonlarının etkisi, organik çözücülerin etkisi, yüzey aktif maddelerin etkisi, yükseltgenlerin etkisi ve amino asit inhibitörlerinin etkisi incelenmiştir. Aynı zamanda karakterizasyon çalışmalarında enzimin; doğal substratlara karşı spesifitesi ve kinetik parametreleri de tespit edilmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI VE KURAMSAL TEMELLER

Kumar vd. (1998), alkalofilik *Bacillus* tarafından üretilen iki hücre dışı proteazı; aseton çöktürmesi, DEAE-Sepharose ve CM-Sepharose CL-6B iyon değişim kromatografisi ve Sephacryl S-200 jel filtrasyon kromatografisi tekniği ile saflaştırmış ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Saflaştırılmış proteazların SDS-PAGE ile yapılan analizleri her iki proteazın da (AP1 ve AP2) homojen olduğunu ve molekül kütlelerinin sırasıyla 28 ve 29 kDa olduğunu meydana çıkarmıştır. AP1 ve AP2 enzimleri optimum aktiviteyi sırasıyla 50-55 °C sıcaklıkta ve 11-12 pH'da göstermiştir. Enzimler pH 6-12 aralığında ve 50 °C'ye varan sıcaklıklarda dört saatlik bir periyotta Ca^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda stabilitesini korumuştur. 50 °C'de enzimlerin kaydedilen yarı ömrü AP-1 ve AP-2 proteazları için sırasıyla 50 ve 40 dakika olarak bulunmuştur. PMSF tarafından enzimlerin inhibisyon profili, bu enzimlerin alkalın serin proteaz olduğunu doğrulamıştır. Saflaştırılmış proteazlar kazein, elastin, keratin, albümin gibi doğal protein substratlarını ve Glu-Gly-Ala-Phe-PNA ve Glu-Ala-Ala-Ala-PNA gibi sentetik kromojenik peptid substratlarını hidrolize etmiştir. Saflaştırılmış proteazlar için K_m değerleri substrat olarak Glu-Gly-Ala-Phe-Pna için sırasıyla 1,05Mm ve 1,29 Mm; substrat olarak Glu-Ala-Ala-Ala-Pna için sırasıyla 3,81Mm ve 4,79Mm olarak hesaplanmıştır. Kinetik verileri de P1 pozisyonunda küçük alifatik ve aromatik amino asit kalıntılarını tercih ettiğini göstermiştir (Kumar vd. 1998).

Singh vd. (1999), Himalaya'daki alkalın topraklardan izole edilen zorunlu alkalofilik *Bacillus sphaericus* suşundan hücre dışı proteaz üretmişlerdir ve çalışmalara ham örnek üzerinden devam etmişlerdir. Enzimin 50–55 °C'de ve pH 10,5'de optimum aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Enzim 500 mg/L klor varlığında kararlılığını korumuş ve bir deterjan katkı maddesi gibi çalışmıştır. Çamaşır deterjanları varlığında, ticari proteazlarla benzer şekilde kararlılığını korumuştur. Proteaz enzimi (25 U/ml) pH 11'de ve 50 °C, kullanılmış X-ray filimlerinin 25 gramındaki gümüş tabakasını on iki dakikada etkili bir şekilde hidrolize etmiştir (Singh vd. 1999).

Towatana vd. (1999), alkalın proteaz enzimini; bir kaplıca toprağı numunesinde izole edilen alkalifilik ve termofilik *Bacillus* sp. PS719'nin süpernatant kültüründen amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından DEAE-Selüloz ve α -kazein agaroz kolon

kromatografisi ile homojen bir şekilde saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin jel elektroforezinde hem denatüre olan kısmı hem de denatüre olmayan kısmı içerecek şekilde 42 kDa'luk yalnızca bir protein bandı gözlenmiştir, bundan yola çıkarak enzimin tek bir polipeptid zincirinden oluştuğu düşünülmüştür. Enzimin izoelektrik noktası yaklaşık 4,8 olarak tespit edilmiştir. Proteaz enzimi, pH 9'da ve 75 °C'de azokazeine karşı maksimum aktivite sergilemiştir. Enzimin aktivitesi Ca^{2+} tarafından arttırılmıştır ancak Fe^{2+} veya Cu^{2+} varlığında enzim inhibe olmuştur. Enzim, Ca^{2+} ortamda olmadığında pH 8 ila 10 arasında, 80 °C'ye kadar kararlılığını korumuştur. PMSF ve DCI'nın yanı sıra TLCK'nın da enzimi tamamen inhibe ettiği görülmüştür ve bu sonuçtan yola çıkarak enzimin tripsin benzeri serin proteaz olduğu bildirilmiştir. Çeşitli oligopeptidyl-p-nitroanilides testleri; proteaz enziminin, substratın karboksil ucundaki arginin kalıntılarından bölme tercihi olduğunu göstermiştir. N-carbobenzoxyl-L-arginine-p-nitroanilide'nin enzimle muamelesinden sonra p-nitroaniline serbest kalmıştır. Enzimin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.6 Mm ve $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir (Towatana vd. 1999).

Kim vd. (2001), *Bacillus cereus* KCTC 3674'ün büyüme ortamına birkaç tür ekstraselüler proteaz salgıladığını bildirmişlerdir. Kültürün sıvı besi yerinden saflaştırılan iki proteazın SDS-PAGE ile görüntülenen yaklaşık molekül kütlelerinin sırasıyla 36 kDa ve 38 kDa olduğu gösterilmiştir. 38 kDa'luk proteaz 37 °C'deki *B. Cereus* kültüründen saflaştırılmıştır, 36 kDa'luk proteaz ise 20 °C'deki *B. Cereus* kültüründen elde edilmiştir. 38 kDa'luk proteaz karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır ve hücre dışı bir nötral proteaz olduğu tespit edilmiştir. 36 kDa'luk proteazın ise N-terminal amino asit dizilimine dayanılarak yeni bir enzim olduğu düşünülmüştür. Bu enzim EDTA ve o-phenanthroline ile güçlü bir şekilde inhibe olmuştur bundan dolayı metallo proteaz olarak tanımlanmıştır. Enzimin optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 8,0 ve 70 °C olarak bulunmuştur (Kim vd. 2001).

Oberoi vd. (2001), soya unu, nişasta ve sodyum karbonatın bulunduğu kültür ortamındaki *Bacillus sp.* RGR-14'ten alkalın ve SDS dayanıklı alkalın bir proteaz saflaştırmışlardır. Optimum pH' 11 olan bu enzimin 20 °C'den 80 °C'ye kadar olan geniş bir sıcaklık aralığında kararlılığını korumasının yanı sıra en yüksek aktiviteyi 45 °C ve 70 °C arasında göstermiştir. Enzim %0,1'lik SDS ile 1 saatlik inkübasyondan

sonra aktivitesinin tamamını korumuştur. Ancak %0,5'lik SDS ile 1 saat inkübasyona bırakıldığında aktivitesinin %30'unu kaybetmiştir. Enzim yüzey aktif maddeler (iyonik ve iyonik olamayan) ve yükseltgenler varlığında stabilitesini korumuştur. Enzim aktivitesi Tween-85 ile %29 artış göstermiştir. Enzim %1'lik sodyum perborat ve %1'lik H₂O₂ varlığında aktivitesinin sırasıyla %100'nü ve %60'ını korumuştur. Enzimin; Surf, Ariel, Wheel, Fena ve Nirma gibi ticari deterjanlarla 1 saatlik inkübasyondan sonra aktivitesinin % 70'inden fazlasını koruması bu deterjanlarla uyumlu olduğunu göstermiştir. Enzimin pamuklu kumaştaki kan ve çimen lekelerine karşı yıkama performansı analizi çalışması sonucundaki artış (çimen lekeleri ve kan lekeleri için sırasıyla % 14 ve %25) enzimin deterjan endüstrisinde uygulama potansiyeli olduğunu göstermiştir (Oberoi vd. 2001).

Singh vd. (2001), hücre dışı serin alkalın proteazı *Bacillus sp.* SSR1'den Sephadex A-50 ve Sepharose 6B kolon kromatografi ile homojen bir şekilde saflaştırmışlardır. Enzim; molekül kütlesi SDS-PAGE ve native PAGE ile sırasıyla 29 kDa ve 35 kDa olarak tespit edilmiş monomerik bir proteindir. Saflaştırılan enzim alkalın pH aralıklarında (8,0 – 11,0) kararlılığını koruduğunu ve optimum sıcaklığı olan 40 °C'de 300 dakika inkübasyon süresi sonunda bile aktivitesini %100 koruduğunu bildirmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığı CaCl₂ varlığında 45 °C olarak değiştiğini ve aktivitesinde 1,3 kat artış gözlemlendiğini ifade etmişlerdir. Enzimin çeşitli deterjanlarda aktivitesini ve kararlılığını koruduğunu ve metal iyonlarıyla (Fe³⁺, Ca²⁺, Na⁺) aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir (Singh vd. 2001).

Studdert vd. (2001), *Natronococcus occultus*'dan serin proteaz saflaştırmış (328 saflaştırma katsayısı ve %19 verimle) ve biyokimyasal karakterizasyonunu yapmışlardır. Enzimin nativ jel elektroforezinde molekül kütlesi 130 kDa olarak bulunmuştur (kimotripsin benzeri enzim). Enzim geniş bir pH aralığında stabil ve aktif olmasının yanı sıra oldukça termofilik (optimum aktivite 60 °C'de 1-2 M NaCl varlığında sergilenmiştir) olduğu bildirilmiştir. Enzim aktivite ve stabilite için yüksek tuz konsantrasyonlarına (1–2 M NaCl veya KCl) ihtiyaç duymaktadır. *Natronococcus occultus*'ın proteazından elde edilen üç tripsin türevi peptidin amino asit dizilimi bilinen diğer proteolitik enzimlerden önemli ölçüde farklıdır. Yüksek molekül kütlesine sahip

olması ve amino asit dizilimindeki bu farklılık *Natronococcus occultus*'dan saflaştırılan hücre dışı proteazın yeni bir enzim olabileceğini düşündürmektedir (Studdert vd. 2001).

Yang vd. (2001), *B. Subtilis* Y-108'den proteaz enzimi saflaştırmışlardır. Proteaz enzimini; Amonyum Sülfat çöktürmesi, DEAE-Sepharose CL-6B iyon değişim ve Sephacryl S-200 jel geçirim kromatografisi ile üç basamakta saflaştırmışlardır. SDS-PAGE ile enzimin molekül kütlesinin 44 kDa olduğu görülmüştür. Enzim substrat olarak kazein kullanımında pH 8'de ve 50 °C'de çok etkilidir. Enzimin aktivitesi Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} iyonları ile artış gösterirken Hg^{2+} ile tamamen inhibe olmuştur. Enzim; EDTA gibi metal şelatlayıcı reaktifler, β -mercaptoethanol gibi sülfidril reaktifler, sistein hidroklorür, histidin ve gliserol tarafından tamamen inhibe edilmiştir. EDTA proteaz aktivitesini tamamen inhibe etmekte en etkili inhibitördür. Bundan dolayı enzimin metal iyonlarını bağlayan moleküllere karşı duyarlı bir nötral proteaz olduğu kanısına varılmıştır (Yang vd. 2001).

Beg ve Gupta (2003), *Bacillus mojavensis*'tan tiyol-bağımlı, yükseltgenlere karşı kararlılığını koruyan hücre dışı bir serin alkalın proteaz enzimi (enzimin molekül kütlesi SDS-PAGE ile 30 kDa olarak görülmüştür) saflaştırmışlardır. Enzim önceden pH 10,5 ile dengelenmiş Q-sepharose kolonla (anyon değişim kromatografisi) homojen bir şekilde 17 kat tek adımda saflaştırılmıştır. Enzimin N-terminal amino asit dizilimi diğer subtilisinler ve alkalın proteazlarla %91 benzerlik göstermiştir. Enzimin optimum sıcaklık ve pH'nın sırasıyla 60 °C ve 10,5 olduğu tespit edilmiştir. Saflaştırılan bu proteaz 7,0'dan 11,5'e kadar olan geniş bir pH aralığında 48 saat aktivitesini korumuştur. Enzim; PMSF, bestatin, kimostatin, iyodoasetik asit ve *N*-bromosuccinimide gibi spesifik proteaz inhibitörleriyle tamamen inhibe olmasının yanında 2-merkaptoetanol, glutatyon ve ditiyothreitol ile aktivitesinde neredeyse iki kattan daha fazla bir artış gözlenmiştir. Bundan yola çıkarak enzimin tiyol bağımlı bir serin proteaz olduğuna karar verilmiştir. Enzim aktivitesi Cu^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarıyla %36'ya kadar artış göstermiştir. Enzim; laboratuarlarda bulunabilen çeşitli ticari açıcılara (H_2O_2 , sodyum perborat), çamaşırhanelerde kullanılan çeşitli deterjanlara ve yüzey aktif maddelere (tweens, Triton X-100, sodyum kolat) karşı kararlılığını korumuştur. Saflaştırılan proteazın; jelatin, elastin, albumin, hemogloblin ve yağsız süt gibi çeşitli doğal proteinli substratları hidrolize etmesi etkili bir deterjan katkı maddesi

olarak kullanım için uygun olduğu sonucunu doğurmuştur. Enzimin yıkama performansının analiz edilmesi; kan, böcek ve çimen gibi çeşitli lekelerin 60 °C’de temizlenmesinde oldukça etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır (Beg ve Gupta 2003).

Gessesse vd. (2003), doğal oluşumlu bir alkalın habitattan izole edilen *Nesternkonio* sp. ve *Bacillus pseudofirmus* alkalifilik bakteri suşlarından iki alkalın proteaz enzimi üretmişlerdir. Enzim; ham ekstraktın amonyum sülfat çöktürmesi ile konsantre edilmesinden sonra iyon değişim, hidrofobik etkileşim ve jel filitasyon kromatografisi ile elektroforetik homojenlikte saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimlerin moleküler kütleleri SDS-PAGE ile sırasıyla 23 kDa ve 24 kDa olarak bulunmuştur. *Nesternkonio* sp.’den saflaştırılan proteaz enzimi pH 7,5’den 11,5’e kadar olan geniş bir aralıkta %90 aktivite göstermiştir ancak en yüksek aktiviteyi pH 10’da göstermiştir. Bu enzim bilinen diğer mikrobiyal kaynaklı serin proteazların aksine termal kararlılık ve aktivite için Ca^{2+} iyonlarına ihtiyaç duymamıştır. Enzimin optimum sıcaklığının 70 °C olmasının yanında 65 °C’de bir saatlik inkübasyonda Ca^{2+} varlığında ve yokluğunda kararlılığını korumuştur. Enzimin bu özellikleri deterjan uygulamaları için ideal bir aday olabileceğini göstermiştir. Diğer yandan *Bacillus pseudofirmus*’tan elde edilen proteaz ise 50 °C’nin üzerindeki sıcaklıklarda aktivite ve kararlılık için Ca^{2+} iyonlarına ihtiyaç duyduğu bulunmuştur. Enzimin optimum sıcaklığının Ca^{2+} varlığında ve yokluğunda sırasıyla 70 °C ve 60 °C olduğu bildirilmiştir. Optimum pH’nın 11 olduğu bulunan bu enzimin pH 6,5’le 11,0 arasında aktivitesinin %70’ini koruduğu görülmüştür. *B. Pseudofirmus* ve ondan üretilen proteaz enzimi; tüylerin enzimatik ve/veya mikrobiyolojik hidroliziyle hayvan yemi katkı maddesi olarak kullanılması gibi ilginç bir potansiyel uygulama alanına sunulmaktadır (Gessesse vd. 2003).

Ghorbel vd. (2003), balık sanayi bölgesindeki kirli sulardan izole ettikleri organik çözücülere karşı dayanıklı bir bakteri olan *B. Cereus* suşundan organik çözücülere karşı dayanıklı bir proteaz saflaştırmışlardır. Enzimin; 30 °C’de %25 metanol, DMSO, asetonitril ve DMF varlığında 24 saatlik inkübasyonu sonrasında başlangıç aktivitesinin %95’inden fazlasını koruduğu görülmüştür. Enzimin 37 °C’nin yukarısındaki sıcaklıklarda aktivitesini korumak için Ca^{2+} iyonlarına ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir. Enzimin optimum sıcaklığı 2Mm Ca^{2+} varlığında ve yokluğunda sırasıyla 60 °C ve 50 °C olarak bulunmuştur. 60 °C’de Ca^{2+} iyonları aktiviteyi %500 arttırmıştır. Mg^{2+} ve Mn^{2+}

gibi diğer çift değerlikli iyonlar aktiviteyi sırasıyla %285 ve %157 arttırırken Zn^{2+} ve Cu^{2+} güçlü bir inhibitör etkisi göstermiştir. Enzimin 40 °C'nin yukarısındaki sıcaklıklardaki kararlılığı Ca^{2+} ile arttırılmıştır. 10 Mm Ca^{2+} varlığında enzim 55 °C, 60°C ve 70 °C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra sırasıyla %100, %93 ve %26 aktivitesi korumuştur. Ancak Ca^{2+} iyonları ortamda bulunmadığında enzim 55 °C 15 dakika inkübe edildikten sonra aktivitesini tamamen kaybetmiştir. Enzimin optimum pH'ı 8 olduğu bulunmuştur. Bunun yanı sıra enzimin 6'dan 9'a kadar olan farklı pH'lı tamponlarda 50 °C'de 1 saat ve 3 saat inkübe edildikten sonra kararlılığını büyük ölçüde koruduğu bildirilmiştir. Enzim EDTA tarafından tamamen inhibe edilmiştir bu bilgidten yola çıkılarak enzimin bir metallo proteaz olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Ghorbel vd. 2003).

Huang vd. (2003), *Bacillus pumilus* suşundan tüylerin uzaklaştırılmasında önemli bir fonksiyon gösteren hücre dışı bir serin alkalın proteaz saflaştırmışlardır. DHAP olarak adlandırdıkları bu proteazı iyon değişim, hidrofobik etkileşim ve jel filitrasyon kromatografisi ile saflaştırmışlardır. Saflaştırılmış enzimin yaklaşık molekül kütlesi 32 kDa olarak tespit edilmiştir. Enzimin; pI, optimum sıcaklık ve pH'ının sırasıyla 9, 55 °C ve 10 olduğu tespit edilmiştir. Enzim PMSF ve DFP tarafından tamamen inhibe edilmiştir. Saf DHAP'ın ilk 20 amino asit kalıntısının dizilimi AQTVPYGIPIKAPAVHAQG olarak tespit edilmiştir. Enzimin amino asit dizilimi *B. Pumilus* suşundan elde edilen diğer proteazlarla büyük oranda homojenlik gösterdiği görülmüştür (Huang vd. 2003).

Khan vd. (2003), bir filamentöz mantarı olan *Paecilomyces lilacinus*; bitki paraziti nematodlarına karşı biyolojik mücadele reaktifi olarak geliştirilmiştir. Nematod yumurtaları ve kutikülleri, lıktik enzim ürünlerinin nüfuz ettiği biyolojik mücadele ajanları için enfeksiyon bölgesidir. *P. Lilacinus*'un sıvı kültür ortamında yumurta yolku ve kitin oluşturularak bu bölgelerden sırasıyla proteaz ve kitinaz oluşturulmuştur. Serin proteaz kültür ortamından Sepharose-bacitracin afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Proteaz üç formda oluşmuştur ve bunların ikisinde C-teminalin kesik olduğu bildirilmiştir. Saflaştırılmış olan proteaz SDS-PAGE ile yaklaşık 37 kDa olarak görüntülenmiştir. Çalışmada proteazın bir serin proteaz olduğu bildirilmiştir. Proteaz en yüksek aktiviteyi pH 10,2'de gösterirken pH 5 ila 12 arasında aktivitesini büyük ölçüde

(%76 oranında) korumuştur. Enzim 20 °C'den 60 °C'ye kadar olan geniş bir sıcaklık aralığında aktivite vermesinin yanında en yüksek aktiviteyi 45 °C ila 60 °C arasında vermiştir. Aktivite pH 12 ve 60 °C'de büyük ölçüde düşmüştür (Khan vd. 2003).

Joo ve Chang (2005), gelgitlerin oluşturduğu çamurlarla aşırı derecede kirlenmiş Batı denizinden alınan örneklerden izole edilen *Bacillus clausii* I-52 suşundan proteaz saflaştırmışlardır. Kültür ortamına yapılan %0,4 NaCl ve %0,05 FeSO₄.7H₂O ilavesi ile proteaz üretimini arttırmışlardır. Ham ekstraktı Diaion Hp A 75, Fenil- Sefaroz ve DEAE-Sepharose anyon değişim kromatografisi ile muamele ederek enzim 10 kat saflaştırılmış ve %79 verimle elde edilmiştir. Proteaz enziminin 28 kDa molekül kütleinde ve yüksek tuz konsantrasyonlarına dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Substrat olarak N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-Pna kullanıldığında pH 11,0'de ve 45°C'de Km ve kcat değerleri sırasıyla 83,9 µmol l⁻¹ ve 238,6 s⁻¹ olarak bulunmuştur. Enzimin SDS ve H₂O₂'ye karşı kararlılığı enzim çözeltisini NaCl yada propilen glikol ilavesiyle artmıştır. *Bacillus clausii* I-52 suşundan saflaştırılan bu alkalın proteazın; yüzey aktif maddelere, yükseltgenlere ve yüksek tuz konsantrasyonlarına karşı gösterdiği kararlılıktan dolayı endüstriyel açıdan önemli olduğunu bildirmişlerdir. Enzimin özellikleri; endüstriyel amaçlı kullanım için uygun olduğunu göstermiştir (Joo ve Chang 2005).

Kazan vd. (2005), *Bacillus clausii* GMBAE 42 suşundan hücre dışı serin alkalın proteaz üretimi için proteince zengin ortamda 10,5 başlangıç pH'ında 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisi ile 16 kat saflaştırılan enzimi %58 verimle elde etmişlerdir. Saflaştırılmış enzimin moleküler kütlesi SDS-PAGE ile 26,5 kDa olarak bulunmuştur. Enzimin optimum sıcaklığının 60 °C olmasına karşın 5 Mm Ca²⁺ ilavesi ile bu sıcaklığın 70 °C kaydığı bildirilmiştir. Enzim pH 10,5'de 30 °C ve 40 °C'de 2 saat kararlılığını korumuştur, 50 °C ise aktivitede %14'lük bir kayıp gözlenmiştir. Enzim pH 9,0'dan 12,2'ye kadar 30 °C'de 24 saat kararlılığını korumuştur. Enzim; %1 (w/v) Tween-20, Tween-40, Tween-60, Tween-80, ve %0.2 (w/v) SDS varlığında pH 10,5 ve 30 °C'de 1 saat kararlılığını korumuştur. Ancak aynı şartlar altında %1 sodyum perborat ile %10 aktivite kaybetmiştir. Enzim PMSF ile tamamen inhibe olmuştur ve N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-Pna hidrolizi için nispeten yüksek bir k_{cat} değeri vermiştir. Bundan yola

ıkararak enzimnin kimotripsin benzeri serin proteaz olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Kazan vd. 2005).

Genckal ve Tari (2006), aşırı alkalın şartlarda altında bulunan *Bacillus* suşları izole edilmiş ve en yüksek proteaz aktivitesi için görüntülenmiş ve taranmıştır. Yüksek proteaz verimli suşlar; inokulum konsantrasyonu, sıcaklık, karıştırma hızı, başlangıç ortamının pH'ı ve inkübasyon süresi açısından optimize edilmiştir. I18, L18 ve L21 olarak kodlanan  *Bacillus* suşu 85 izolat arasında alkalın proteaz aktivitesi bakımından en yüksek potansiyeli göstermiştir (160–222 U/ml). I18, L18 ve L21 suşları için optimum sıcaklıklar ve karıştırma hızları sırasıyla 30  C, 37  C, 37  C ve 100rpm, 180rpm, 180 rpm olarak bulunmuştur. Her üç suş içinde optimum inokulum oranı ve inkübasyon süresi sırasıyla %5 (v/v) ve 96 saat olarak tespit edilmiştir. L18 ve L21 için başlangıç ortamının optimum pH'ı 10 olarak bulunmuştur. *Bacillus* sp. L21'i; en yüksek spesifik proteaz aktivitesini (60 U/mg protein) göstermesi ve geniş bir pH aralığında aktif olması nedeniyle çalışmanın devamı için tercih etmişlerdir. Bu suşun ham ekstraktı karakterize edilmiş ve ağatıcılara karşı kararlı olduğu tespit edilmiştir. Serin alkalın proteaz için optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 60  C ve 11 olarak bulunmuştur. Bu karakterizasyon sonuçlarından yola çıkararak enzimin deterjan endüstrisindeki potansiyel uygulamalar için bir aday olabileceğine karar vermişlerdir (Genckal ve Tari 2006).

Nilegaonkar vd. (2006), manda derisinden izole edilen *Bacillus cereus* MCM B-326'dan hücre dışı proteaz saflaştırmışlardır. Maksimun proteaz üretimini; soya fasülyesi unu ve nişastalı ortamda pH 9,0'da 30  C'de kültür ortamının karıştırılmasıyla 36 saatte oluşturmuşlardır. Amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırılan enzim 25'den 65'e kadar olan sıcaklık aralığında ve pH 6'dan 12'ye kadar kararlılığını korumuştur. Ancak maksimum aktiviteyi 55  C'de pH 9,0'da göstermiştir. Enzimin retilmesi için Ca²⁺'ye ihtiyaç duyulduğunu ancak kararlılık ve aktivite için ihtiyaç duyulmadığını bildirmişlerdir. Kısmen saflaştırılmış enzim 45 kDa ve 36 kDa molekl kütlesinde çoklu proteaz sergilemiştir. Araştırmacılar enzimin deri işleme sektöründe uygulama alanına sahip olabileceğini ve manda derisinden kılların uzaklaştırılmasında etkili bir şekilde kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Nilegaonkar vd. 2006).

Rahman vd. (2006), organik çözücülere karşı dayanıklı bir tür olan K proteazı; bir ahşap fabrikasının kontamine olmuş toprak örneklerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinden saflaştırmışlardır. Amonyum sülfat çöktürmesi ve anyon değişim kromatografisi ile homojen bir şekilde saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesinde ham örneğe göre 124 kat artış gözlenmiştir. Saflaştırılmış enzimin moleküler kütlesi SDS-PAGE ile 51 kDa olarak bulunmuştur. K proteazı türünün bir alkalın metalloproteaz olduğu ve optimum sıcaklık ve pH'ının sırasıyla 70 °C ve 10 olduğu tespit edilmiştir. Enzim aktivitesi 5Mm Sr^{2+} iyonu ile %55 artış göstermiştir. Enzim organik çözücüler varlığında log *Pa/w* değerinin $\geq 4,0$ olmasıyla iyi bir kararlılık ve aktive göstermiştir. Saflaştırılmış proteazın; 1-dekanol, izooktan, dekan, dodekan ve heksadekan ile 14 günlük inkübasyonundan sonra aktivitesi sırasıyla 1.11, 1.82, 1.50, 1.75 ve 1.80 kat artmıştır (Rahman vd. 2006).

Jaswal ve Kocher (2007), hücre dışı alkalın proteaz enzimini *Bacillus circulans* MTCC7906'den 96 saatlik bir inkübasyonla elde etmişlerdir. Ortamın pH 10,5 ve sıcaklığı 25 °C olarak ayarlanmıştır. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürülen enzim pH 9,0'da diyaliz ile saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ile saflaştırılan enzimin 24,5 kDa olduğu bulunmuştur. Enzim oda sıcaklığında 20 gün kararlılığını korumuştur ve enzim Hg^{2+} , Cu^{2+} , NH_4OH ve EDTA ile inhibe olurken Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} ve Ba^{2+} ile aktivitesi artmıştır. Burdan yola çıkarak enzimin metal bağımlı bir serin proteaz olduğu düşünülmektedir. Alkalın proteazın aktivitesini, altı tane yerel toz deterjan markası ile %90'dan fazla koruduğu bildirilmiştir (Jaswal ve Kocher 2007).

Rao ve Narasu (2007), sanayi bölgesindeki deri fabrikalarından alınan toprak örneklerinden izole ettikleri *Bacillus firmus* MTCC 7728'den hücre dışı alkalın proteaz üretmişlerdir. Maksimun aktivite 48 saatlik bir fermantasyon sonrası bulunmuştur. Maksimun enzim aktivitesi için ortamın optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 9 ve 40 °C bulunmuştur. *Bacillus firmus* MTCC 7728'dan üretilen mezofilik alkalın proteazın çeşitli endüstri dallarında potansiyel kullanım alanına sahiptir. *B. firmus* MTCC 7728'den üretilen hücre dışı alkalın proteaz; deterjan, zamklama ve gümüşün kurtarılması gibi birkaç proses ve kazein, jelatin ve nişasta hidrolizinde çeşitli fonksiyon kapasitesine sahip protein hidrolizatlarının üretilmesi gibi çeşitli endüstri dallarında büyük bir potansiyele sahiptir (Rao ve Narasu 2007).

Sharmin ve Rahman (2007), bakteriyi köpek gübresinden izole etmişlerdir. Burgey kılavuzuna göre organizmanın ön karakterizasyonu yapmış ve organizmanın *Bacillus* türüne ait olabileceğini düşünmüşlerdir. Bakteriyi geçici olarak *Bacillus* FS-1 olarak adlandırmışlardır. Bakteriyi yüksek sıcaklıklarda ve pH'larda geliştirmişlerdir. Bakterinin besi yerinde bir ekzoproteaz salgıladığını bildirmişlerdir. Bakterinin, besi ortamındaki olumsuz koşullar sırasında sporlar oluşturduğunu ifade etmişlerdir. Bakteriden enzimin saflaştırılması için Amonyum Sülfat çöktürmesi ve ultrafiltrasyon tekniklerine başvurmuşlardır. Enzimin 60 °C'de maksimum aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Enzimin optimum pH'nı 8,5 olarak belirlenmişler ve enzimin EDTA tarafından inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Enzimin; alkalın metallo proteaz olduğuna karar vermişlerdir. Enzimin, cilt ve derideki kılların uzaklaştırılması özelliğine sahip olduğunu belirlemişler. Bu nedenle enzimin ticari öneme sahip olduğunu bildirmişlerdir (Sharmin ve Rahman 2007).

Venugopal ve Saramma (2007), Mangrov (tropikal kuşaktaki kıyı ve bataklıklarda yetişen bir bitki cinsi) bitkisinin posasından izole edilen *Bacillus circulans* BM15 suşu tarafından üretilen alkalın proteaz enziminin özelliklerini karakterize etmiş ve bir deterjan katkı maddesi olarak etkisini test etmişlerdir. Proteaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırmışlardır, SDS-PAGE ile 30 kDa olduğu bildirmişlerdir ve proteolitik aktivitesini kazein zimogramı ile tespit etmişlerdir. Alkalın pH aralıklarında kararlılığını koruyan bu enzimin pH7'de optimum aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. 55 °C'nin üzerinde bir saatlik bir inkübe süresinin sonrasında kararlılığını koruyan bu enzimin aktivitesinin 40 °C'de optimum değerlere ulaştığını göstermişlerdir. Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} ve Fe^{3+} enzim aktivitesini attırarak yönde etki ederken; Hg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} ve Cu^{2+} enzim aktivitesini bütünü ile inhibe ettiği bildirilmiştir. Klasik metalloproteaz inhibitörü olan 1, 10 phenanthroline inhibisyon etkisi göstermemişken serin proteaz inhibitörü olan PMSF ve metal şelatlayıcı reaktif olan EDTA proteaz enziminin aktivitesini inhibe etmiştir. Enzimin; SDS, Triton-X-100 ve H_2O_2 yanı sıra bir saatlik inkübasyon sonrasında çeşitli ticari deterjanlarda da kararlılığını koruduğu görülmüştür. Hücre dışı olarak üretilen bu enzimin, pH ve sıcaklık stabilitesinin ve oksidantların, yüzey aktif maddelerin ve ticari deterjanlarda varlığında stabilitesinin

yatkınlığı deterjan katkı maddesi olarak kullanılmasının mümkün olduğunu göstermiştir (Venugopal ve Saramma 2007).

Kocher ve Virk (2008), alkalın proteaz üreticisi olan *Bacillus Circulans*'ı sebze atıklarından izole etmişlerdir. Proteaz üretimi için optimum fiziksel şartların 200 rpm karıştırma hızı, 25-30 °C arasında sıcaklık ve pH 10,5 olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Tasarladıkları faktöryel deneyler sonucunda en iyi karbon-azot kombinasyonunun; 461,65 U/ml ile maksimum alkalın proteazın üretildiği glikoz ve soya unu olduğunu tespit etmişlerdir. En iyi alkalın proteaz üretiminin yapıldığı enzim üretim ortamında soya unu, yağsız pamuk unu ile değiştirildiğinde proteaz aktivitesi 589 U/ml'ye yükselmiştir. Yağsız pamuk ununun değişik konsantrasyonlarına bağlı regresyon denklemiyle proteaz değerleri; *B. circulans*'ın 100,9 saatte % 0,5789 yağsız pamuk unu kullanılarak, 808,68 U/ml alkalın proteaz üretimiyle maksimum seviyeye ulaştığını göstermiştir (Kocher ve Virk 2008).

Reddy vd. (2008), topraktan izole edilen *Bacillus* sp. RKY3'ten proteaz enzimini saflaştırmışlardır. Enzim; ham ekstraktın amonyum sülfat çöktürmesi ile konsantre edilmesinden sonra anyon değişim kromatografisi ile iki basamakta saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış enzimin yaklaşık molekül kütlesi 38 kDa olarak tespit edilmiştir. Enzimin 7'den 9'a kadar olan pH aralığında oldukça aktif olmasının yanı sıra 5'ten 11'e kadar olan geniş bir pH aralığında kararlılığını koruduğu saptanmıştır. Enzimin optimum sıcaklığının 60 °C olmasının yanında 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hızla aktivitesini kaybettiği tespit edilmiştir. Diğer yandan enzim 50 °C'de 70 dakikalık yarı ömrü ile iyi bir kararlılık göstermiştir. Enzim PMSF (1mmol L⁻¹) ile tamamen inhibe olmuştur ve buradan yola çıkarak enzimin bir serin proteaz olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Saflaştırılmış enzim; yükseltgenlere (H₂O₂, %2), indirgeyici reaktiflere (sodium dodecyl sulfate, % 2) ve benzen, hekzan, toluen gibi organik çözücülere karşı kararlılığını korumuştur. Saflaştırılmış proteaz enziminin; proteaz bazlı deterjan ve beyazlatma sanayisinde potansiyel uygulama alanına sahip olduğu görülmüştür. Enzim geniş bir substart çeşitliliğine karşı aktivite göstermesi saflaştırılmış bu enzimin; özellikle gıda işleme sanayisinde soya proteini ve jelatin hidrolizi için bir dizi ticari uygulamada kullanılabilirliğinin araştırılması gerektiğini düşündürmüştür (Reddy vd. 2008).

Sareen ve Mishra (2008), bir termofilik bakteri suşu olan *B. Licheniformis* RSP-09'un mutanti olan *Bacillus licheniformis* RSP-09-37'nin hücreleri uzaklaştırılmış süpernatantına, α -casein agaroz reçinesiyle afinite kromatografisi uygulayarak bir proteaz saflaştırmışlardır. Proteaz elektroforetik homojenliğine göre 85 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan proteazın belirgin moleköl kütlesi yüksek performanslı sıvı kromatografisinde 55 kDa olarak bulunmuştur ve sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde elde edilen sonuçlar ile uyum içinde olduğu görülmüştür. Jel elektroforez görüntüsünden hareketle enzimin monomerik yapıda olduğu düşünülmüştür. Saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık ve pH'ı sırasıyla 50 °C ve 10,0 olarak tespit edilmiştir. Enzimin PMSF ile inhibe olmasına dayanılarak serin proteazlar sınıfına dahil olduğu bildirilmiştir. Proteazın sentetik faaliyeti; organik çözücülerde N-asetil-L-fenilalanin-etil ve n-propanol arasında trans esterleşme reaksiyonu kullanılarak log P değerlerinin değişimiyle test edildi ve bu organik çözücülerde enzimin kinetik parametreleri çalışıldı. Enzim; sentetik reaksiyonlar ve deterjan formülasyonları için uygulama potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (Sareen ve Mishra 2008).

Doddapaneni vd. (2009), mezbaha atıkları örneklerinden izole edilen bir bakteriden proteaz enzimi üretmişlerdir. Biyokimyasal özelliklerine ve 16S Rna gen dizilimine dayanılarak bakteriyi *Bacillus cereus* olarak tanımlamışlardır. Proteaz, amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisiyle 1.8 kat ve %49 verimle homojen bir şekilde saflaştırılmıştır. Enzim 28 kDa moleköl kütlesine sahiptir ve pH 10'da ve 60 °C'de optimum aktivite göstermektedir. Enzimin pH 7'den 12'ye kadar aktivitesini koruduğu bildirilmiştir. Enzim aktivitesi; EDTA tarafından inhibe edilmiştir ve Cu^{2+} iyonları varlığında 4 kat artmıştır. Bundan yola çıkılarak enzimin bir metalloproteaz olduğuna karar verilmiştir. Enzim, deterjanlar ve anyonik yüzey aktif maddeler varlığında çok iyi bir kararlılık ve aktivite göstermiştir. Bunun yanı sıra organik çözücüler varlığında da kararlılığını korumuştur (Doddapaneni vd. 2009).

Haddar vd. (2009), iki adet deterjan stabil alkalın-serin proteazı (BM1 ve BM2) *Bacillus mojavensis* A21'den saflaştırmışlardır. Saflaştırma için aseton çöktürmesi, DEAE-Selüloz iyon değişim kromatografisi, ultrafiltrasyon ve Sephadex 75 jel filtrasyon kromatografisini kullanmışlardır. SDS-PAGE ile belirlenen BM1 ve BM2 enzimlerin moleköl kütleleri sırasıyla yaklaşık 29.000 Da ve 15.500 Da olarak

bulmuşlardır. BM1 ve BM2 proteazlarının optimum pH değerlerinin sırasıyla 8,0-10,0 ve 10,0 olduğu ortaya koymuşlardır. Her iki enziminde substrat olarak kazein kullanıldığında 60 °C’de maksimum aktivite sergilediğini bildirmişlerdir. BM1 ve BM2 proteazların N-terminal amino asit dizileri sırasıyla AQSVPYGISQIKA ve AIPDQAATTLL olarak bulmuşlardır. Her iki proteazında iyonik olmayan yüzey aktif maddelere karşı yüksek stabilite gösterdiğini ifade etmişlerdir. Enzimlerin yükseltgenlere karşı oldukça stabil olduğunu bulmuşlardır. Bunlara ek olarak, her iki enzimde ticari olarak kullanılan sıvı ve katı olmak üzere geniş bir yelpazeyi oluşturan deterjanlara karşı da mükemmel stabilite ve uyumluluk gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu özellikleri ve yüksek alkalın pH’lar da yüksek aktivite göstermeleri uygulamalarda deterjan katkı maddesi olarak ideal bir seçim olacağı sonucuna varmalarına neden olmuştur (Haddar vd. 2009).

Haddar vd. (2009), hücre dışı ve çamaşır suyuna karşı kararlılığını koruyan proteaz üreten suşu deniz suyu örneğinden saflaştırmışlar ve biyokimyasal özellikleri tanımlamışlardır. A21 alkalın proteaz aseton çöktürmesi, Sephadex G-75 jel filtrasyon ve CM-Sepharose iyon değişim kromatografisi kullanılarak süpernatant kültüründen, spesifik aktivitesinde 6,43 kat artış ve %16,56 verimle, homojen bir şekilde saflaştırmışlardır. Saflaştırılmış enzimin moleküler kütleleri SDS-PAGE ve jel filtrasyon ile 20 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzim optimum aktiviteyi pH 8,5’de göstermekle birlikte 7’den 13’e kadar geniş bir pH aralığında yüksek bir aktivite sergilemiştir. pH 11-12’de ve pH 8,5’daki aktivitenin sırasıyla yaklaşık %80 ve %71,7’si korunmuştur. Enzim pH 7 ila 12 aralığında büyük ölçüde kararlılığını korumuştur. Maksimum aktiviteyi 60 °C’de sergilemiştir. Enzimin termostabilitesi CaCl₂ ilavesi ile önemli ölçüde artmıştır. Enzim PMSF varlığında aktivitesini tamamıyla kaybetmiştir, bu saflaştırılmış enzimin bir serin proteaz olduğunu düşündürmektedir. Saflaştırılmış proteazın N-ucu amino asit dizilimindeki ilk 20 amino asit DINGGGATLPQKLYQTSGVL’dir. B. Mojavensis A21 proteaz diğer bakteriyel peptidazlarla düşük bir türdeşlik göstermiştir ve bu saflaştırılan enzimin yeni bir proteaz olduğunu düşündürmüştür. Alkalın proteaz enzimi anyonik (% 0.1 SDS) ve iyonik olmayan (%1’lik ve % 5’lik Tween 80 ve %1’lik Triton X-100) yüzey aktif maddelere karşı yüksek bir kararlılık göstermiştir. Bunun yanı sıra, enzim yükselgen reaktifler

karşısında kararlılığını korumuştur. Enzim, %1H₂O₂ ve %0.1NaBO₃ varlığında bir saatlik inkübasyon sonrasında başlangıç aktivitesini sırasıyla %79 ve %70 oranında korumuştur. Enzim ticari olarak kullanılan geniş bir aralıktaki sıvı ve katı deterjanlara karşı 30 ve 40 °C’de mükemmel bir kararlılık göstermiştir. Enzimin gelecek vaat eden bu özellikleri dikkate alarak, *B. Mojavensis* A21 çamaşır deterjanlarında potansiyel uygulama alanına sahip olabileceği görüşüne varmışlardır (Haddar vd. 2009).

Rao vd. (2009), *Bacillus circulans*’tan alkalın proteaz saflaştırmış ve detaylı karakterizasyonu yapmışlardır. Deri işleme ve deterjan sanayinde çevre dostu uygulama potansiyelinin olup olmadığı karakterizasyon çalışmaları içerisinde incelenmiştir. Saflaştırılan enzimin moleköl kütlesi SDS-PAGE ile 39,5 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzim, yüzey aktif maddeler ve yükseltgenler varlığında geniş bir sıcaklık aralığında optimum aktivite sergilemiştir ancak maksimum aktiviteyi alkalın pH’lar da ve 70 °C civarında göstermiştir. Enzimin leke çıkarma özelliğine sahip olmasının yanında lifli proteinleri hidrolize etmeden ve kimyasal yardımı olmadan hayvan derisinden kılların uzaklaştırılması işleminde de kullanılabileceği görülmüştür. Enzimin; deri işleme sanayinde daha kaliteli ürün üretimi için çevre dostu süreçlerde uygulama potansiyelinin olduğu görülmüştür. Buna ek olarak; pH, sıcaklık ve yüzey aktif maddeler varlığında stabilitesi ve aynı zamanda kan lekesinin hidrolizinde gösterdiği başarı deterjan endüstrisinde uygulama alanı olduğunu ortaya çıkarmıştır (Rao vd. 2009).

Deng vd. (2010), üretim ortamında yüksek proteolitik aktivite sergileyen yeni izole edilmiş alkalofilik *Bacillus sp.* B001’den 28 kDa’luk bir proteaz bir proteaz saflaştırmışlardır. Kısmi amino asit dizilimi tandem kütle spektrometresi ile belirlenmiştir. Gözlenen ve tahmin edilen amino asit diziliminin; *Bacillus clausii*, *Bacillus alcalophilus* ve *Bacillus lentus*’dan elde edilen yüksek-alkali proteazlarla benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. Yüzey aktif maddelere ve yükseltgenlere karşı oldukça stabil olan bu enzimin optimum pH’ı 10,00 ve optimum sıcaklığını 60 °C olarak tespit edilmiştir. Bu özelliklerine dayanarak bu alkalın proteazın çeşitli endüstriyel proseslerde kullanım potansiyelinin olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Deng vd. 2010).

Ghafoor ve Hasnain (2010), süs bitkisi fidanlığından izole edilen *Bacillus subtilis* EAG-2 suşundan yüksek aktiviteli hücre dışı proteaz üretmişlerdir. Proteaz enzimi birbirini izleyen saflaştırma adımları ile görünür bir homojenlikte saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış enzim SDS jel elektroforezinde 27 kDa'da tek bir bant vermiştir. Proteolitik aktivite iki farklı zimogram metodu ile belirlenmiştir. Enzimin pH 8,5'de ve 65 °C'de en yüksek proteoliz aktivitesini gösterdiği bildirilmiştir. Enzim 30-50 °C'de 60 dakikadan sonra %80'e kadar kararlılığını korumuştur. Bunun yanı sıra enzim pH 6,5-9,0'da 37°C'de dört saat inkübasyon sonrasında stabil kalmıştır. Enzim aktivitesi PMSF ve APMSF tarafından sırasıyla %16'ya ve %25'e düşürülmüştür ve bu sonuçlar enzimin bir serin proteaz olduğunu kanıtlamaktadır. Enzim aktivitesi Ca^{2+} , Zn^{2+} ve Ba^{2+} varlığında önemli ölçüde artmıştır. Diğer açıdan, enzim farklı doğal substratlarla etkili bir şekilde çalışmıştır (Ghafoor ve Hasnain 2010).

Ramakrishna vd. (2010), mezbağa toprak numunesinden izole edilen *Bacillus subtilis* (KHS-1) (MTTC No-10110)'dan proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu bildirilmişlerdir. Alkalın proteaz *Bacillus subtilis*'den amonyum sülfat çöktürmesi ve sephadex G- 200 kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Enzimin proteolitik aktivitesi kazein zimografisi ile tespit edilmiştir ve enzimin molekül kütlesi SDS-PAGE ile yaklaşık 20,5 kDa olarak bulunmuştur. Proteaz enzimi kazein substratına karşı 60 °C ve pH 10,5'de maksimum aktivite göstermiştir. Saflaştırılmış enzimin aktivitesi Ca^{2+} (%42) ve β -Mercapto ethanol (%28) ile artmıştır. Bunu yanı sıra Mg^{2+} ve Mn^{2+} de aktiviteyi azda olsa arttırmıştır. Saflaştırılan proteaz enzimi PMSF tarafından büyük oranda inhibe edilmiştir. Bunun yanı sıra Hg^{2+} , Zn^{2+} ve Al^{3+} de enzim aktivitesinde azda olsa bir inhibe etkisi göstermiştir. Saflaştırılan enzim 55 °C'de uzun inkübasyon süresinde kararlılığını korumuştur. Saflaştırılan enzimin; kan lekelerinin temizlenmesinde, x-ray filimlerindeki jelatin kaplamasının bozulmasında ve keçi derisindeki kılların uzaklaştırılmasında potansiyel uygulama alanına sahip olduğu bildirilmiştir (Ramakrishna vd. 2010).

Shah vd. (2010), ham petrolün kontamine olmuş örneklerinden yirmi sekiz organik çözücüye karşı dirençli bir bakteri izole etmişlerdir ve bunun haricinde izole edilen bu AK1871 bakterisinden; çözücü, deterjan ve yükseltgenlere karşı dayanıklı serin alkalın proteaz saflaştırmışlardır. Morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine dayanılarak, FAME

analizleri yanı sıra 16SrRNA gen dizilimindende yola çıkarak izole edilen bu bakteri *Bacillus cereus* olarak tanımlanmıştır. Proteaz enzimi üç basamaklı bir saflaştırma işlemi ile 58 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan bu proteaz geniş bir pH aralığında (6.0 – 9.0, optimum pH: 8.0) ve 40 °C'den 70 °C'ye kadar olan geniş bir sıcaklık aralığında (optimum sıcaklık: 60 °C) aktivitesini korumuştur. Enzim; Cr^{3+} , Hg^{2+} ve Cu^{2+} gibi ağır metallerle inaktive olurken Li^+ , Ba^{2+} , K^+ , Mg^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarından etkilenmemiştir. Enzim; iyonik olmayan deterjanlar (Triton X-100 ve Tween 80), oksitleyici ve ağartıcı ajanlar (hidrojen peroksit) varlığında kararlılığını korumuştur. Proteazın organik çözücüler varlığında log P değerinin $\geq 2,0$ olmasıyla sergilediği kararlılık ve aktivasyon dikkat çekicidir. Bu proteazın; deterjan formülasyonlarında, enzimatik peptid sentezinde, biyotransformasyon reaksiyonlarında ve çürümeyi önleyici kimyasalların formülasyonunda kullanılabileceği bildirilmiştir (Shah vd. 2010).

Uyar vd. (2011), topraktan izole edilen *Bacillus sp.* CA15 suşundan alkalın proteaz enzimi saflaştırmışlardır. İzole edilen mikroorganizma 16S rDNA dizilimine dayanılarak *Bacillus cereus* ile yakından ilişkili olduğu bulunmuştur. En yüksek proteaz üretimi için kültür şartları; karbon ve azot kaynakları, metal iyonları, pH ve sıcaklıkla ilişkili olarak optimize edilmiştir. Maksimun proteaz üretimi; 35 °C'de 8.0 başlangıç pH'ında %1 yağsız süt, %1 nişasta ve %0,6 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ile desteklenmiş ortamda elde edilmiştir. En iyi enzim üretimi, sabit faz sırasında hücre yoğunluğu 1.8×10^8 hücre / ml'ye ulaşıldığında elde edilmiştir. Proteaz seviyesinin inorganik azot kaynakları varlığında düşük olduğu bulunmuştur. Proteaz üretiminin sukroz ve laktoz varlığında azaldığı gözlenmiştir. *Bacillus sp.* CA15 alkalın proteazın; Triton X-100, Tween 20 ve SDS'e karşı çok kararlı olduğu gözlenmiştir. Enzim PMSF tarafından inhibe edilmiştir. Bundan yola çıkarak enzimin aktif bölgesinde bir serin kalıntısının olduğu bildirilmiştir (Uyar vd. 2011).

2.1 Kuramsal Temeller

Peptidazlar ve proteazlar, proteoliz olarak adlandırılan bir süreçte, peptid ve proteinlerin amino asitlerinin arasındaki amid bağlarının hidrolizini katalizlerler ve bu enzimler biyolojide çeşitli fonksiyonlara yardımcı olurlar (Wolfe 2009).

Moleküler bıçaklar gibi işleyen proteazlar; tüm proteinlerin; sentezi, büyüklüklerinin kontrolü, kompozisyonları, biçimleri, döngüleri ve en son yok edilmeleri için gerekli olan bir süreçte uzun amino asit dizilerini parçalarına ayırırlar. Proteinlerin dönüşümünü, sentezini ve aktivasyonunu kontrol ederek fizyolojik süreçlerin en önemli düzenleyicisi olan proteazlar; gebeliğin başlaması, doğum, sindirim, gelişme, olgunlaşma, yaşlanma ve hatta tüm organizmaların ölümünde çok önemli düzenleyici rol oynarlar (Shen ve Chou 2009).

Peptid hidrolazları olarak bilinen proteazlara lizozomlarda protein yıkımından hücre bölünmesine kadar çeşitli biyolojik sistemlerde rastlanmıştır. Ayrıca proteazlar virüsler ve omurgalılar gibi çeşitli organizmalarda bulunmaktadır. Proteaz mekanizmaları, 10 kDa'luk monomerlerden multimerik komplekslere kadar olan peptidlerin ve proteinlerin amid bağlarının kırılmasını katalizlemektedir. Bu özellikleri proteazların biyolojik katalizörler olarak önemini zaten açıklamaktadır (Castro vd.2010).

Bu enzimler bütün canlıların yaşaması için gereklidir ve organizmadaki genlerin yaklaşık %2'si tarafından kodlanır. İnsanlarda bulunan beş yüz peptidaz çeşidinin %14'ünün ilaç hedefleri için araştırma konusu haline geldiği tahmin edilmektedir (Polaina ve MacCabe 2007). Proteazların çok geniş karmaşık fizyolojik fonksiyonları bulunmaktadır. Proteazların canlı organizmaların bütün formlarında bulunması, temel metabolik ve düzenleyici işlevlerin yürütülmesindeki önemini açıkça göstermektedir. Proteazlar; protein katabolizması, kanın pıhtılaşması, hücre büyümesi ve göçü, doku düzenlenmesi ve zimojenlerin aktivasyonu, öncül proteinlerden hormonların ve farmakolojik olarak aktif peptidlerin ayrılması, proteinlerin membranlardan geçişini sağlanması gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçte çok önemli rol oynamaktadır. Proteazlar için öngörülen işlevlerin çok sayıda olmasının yanı sıra bu işlevleri hangi mekanizmalarla yerine getirdiği konusundaki bilgimiz çok sınırlıdır (Rao vd.1998).

2.2 Proteazların Adlandırılması ve Sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya Birliği (International Union of Biochemistry) tarafından yapılan enzim sınıflandırılmasında tüm enzimler katalizledikleri reaksiyon tipine göre 6 sınıfa ayrılmışlar ve proteazlar 3. sırada yer alan hidrolazlar sınıfına dahil edilmişlerdir. Proteazların alt sınıfı peptid bağlarını parçalamadan dolayı 3.4 olarak belirlenmiştir. Buna rağmen, yapısındaki ve etkilerindeki büyük çeşitlilikler nedeniyle genel enzim adlandırma sistemi ile kolayca adlandırılmazlar (Rao vd.1998).

Proteazlar kataliz reaksiyonuna bağlı olarak, peptid zincirinin iç bölgelerindeki peptid bağlarını seçimli hidrolize eden, endopeptidazlar (genellikle proteinaz olarak adlandırılırlar) ve proteinlerin karboksil veya amino uçlarında aktivite gösteren, ekzopeptidazlar olmak üzere ikiye ayrılmışlardır. Proteazlar katalitik mekanizmalarına bağlı olarak ise yedi gruba ayrılmışlardır; aspartik asit proteaz, sistein proteaz, glutamik asit proteaz, metalloproteaz, serin proteaz, treonin proteaz ve henüz herhangi bir katalitik türe atanamayan peptidazların bir dizisini oluşturan yedinci grup. Prokaryotik organizmalar arasında, proteazın katalitik mekanizmalarının 6 tanesi (glutamik asit proteaz haricinde) yaygındır. Enzim spesifikliği açısından proteazlar tarafından peptid bağlarının ayrılması; hidroliz alanının çevresindeki amino asit dizilimine bağlı olarak spesifik (örneğin: sınırlı proteoliz) veya proteinlerin oligo-peptid ve/veya amino asitlere kadar parçalanmasının tamamlanmasındaki sonuçlara göre genel olabilir (Władyska ve Pustelny 2008).

Peptidazların gruplandırılmasında kullanılmakta olan üç kullanışlı metot vardır. Bunlar;

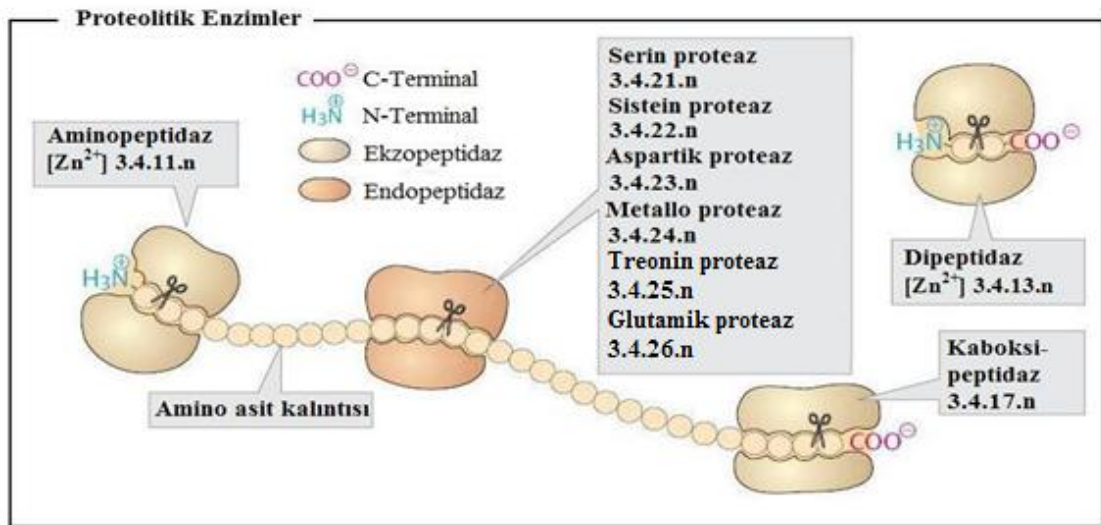
- I. Kataliz reaksiyonun kimyasal mekanizmasına göre;
- II. Kataliz reaksiyonunun çeşidine göre;
- III. Moleküler yapısına ve homolojisine göre oluşturulmuş olan metotlardır (Polaina ve MacCabe 2007).

I. Kataliz reaksiyonun kimyasal mekanizmasına göre peptidazların gruplandırılması

1960'da Hartley makalesinde; peptidazların, katalitik tipine göre çok kullanışlı bir kavramla toplanmasını sağlayarak bir dizi gelişmeyi başlatmıştır. Hartley'in (1960) sınıflandırma için geliştirdiği bu katalitik tip sistemi çok güçlü yönleri sahiptir ancak bunun yanı sıra enzimin tanımlanması ihtiyacı gibi bir sınırlandırma mevcuttur. Bütün serin peptidazların, katalitik bölgelerinin temelinde nükleofil gibi davranan bir serin kalıntısı içermeleri ve sonuç olarak birçok serin peptidaz inhibitöründen etkilenmesi güçlü yönlerinden biridir. Fakat serin peptidazlar birçok katalitik mekanizma ve çok farklı moleküler yapılar içermektedir. Dahası, serin proteazlar birbirleriyle hiçbir suretle tümüyle homolog değildir, bu yüzden "Serin peptidaz ailesi" gibi bir ifade çok az anlam içermektedir (Polaina ve MacCabe 2007).

II. Kataliz reaksiyonunun çeşidine göre peptidazların gruplandırılması

Bir bakıma bütün peptidazlar aynı reaksiyonu katalizler: peptid bağlarının hidrolizi. Fakat peptidazlar; substratdaki peptid bağlarının konumu, kesilecek olan bağın yakınındaki amino asit kalıntıları ve substratın halen bilinmeyen diğer karakteristik özellikleri için seçicidir. Farklı spesifiklikleri tanımlamak için farklı terimler kullanılmıştır (Şekil 2.1) (Polaina ve MacCabe 2007).



Şekil 2.1 Proteolitik Enzimlerin Kataliz Reaksiyonu Çeşidine göre Sınıflandırılması

2.2.1 Omega-peptidazlar

Omega-peptidaz yapısı, substratta serbest bir N-terminal ya da C-terminal ucuna ihtiyaç duymamaktadır. Omega-peptidazlar yüklü bir terminal gruba ihtiyaç duymamalarına rağmen, genellikle terminallerin yakınında aktivite sergilerler ve bu nedenle serbest bir N-terminal ya da C-terminal ucuna ihtiyaç duymayan endopeptidazlardan tamamıyla farklıdır. Bazı hidrolize peptid bağları alfa-bağları değil, izopeptid bağlarıdır. İzopeptid bağları amino veya karboksil gruplarından birinin veya her ikisinin de doğrudan ana amino asidin alfa-karbonuna atak yapmadığı yerlerde bulunur. Omega-peptidaz enzimleri; gamma-glutamil hidrolazlar, proglutamil peptidazlar ve ubikuitin şeklinde hidrolazlarda dâhil olmak üzere çok çeşitlidir. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nin Adlandırma Komitesi tarafından EC. 3.4.19 alt-alt sınıfına yerleştirilmişlerdir (Polaina ve MacCabe 2007).

2.2.2 Ekzo-peptidazlar

Ekzo-peptidazlar; polipeptid substratlarının C-terminal veya N-terminal uçlarında küçük peptidlerin ya da serbest amino asitlerin oluşumunu katalizler. Hâlihazırda enzim komisyonunun listesinde 74 farklı ekzo-peptidaz bulunmaktadır. Ekzo-peptidazlar aminopeptidazlar (AP) ve karboksipeptidazlar (CP) olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır.

Aminopeptidazlar polipeptid zincirinin serbest amino ucundaki amino asitlerin ayrılmasını katalizlerken, karboksipeptidazlar polipeptid zincirini serbest karboksil ucundan hidrolizler. Ekzo-peptidazların aktivitesini; polipeptid uçları üzerindeki spesifik amino asitler, ayrılacak olan peptid bağının yakınındaki doğal birkaç amino asit kalıntısı, polipeptid zincirinin konformasyonu ve peptidin uzunluğu belirlemektedir. AP'ler serbest amino asitlerin oluşumunu katalizlemelerine ek olarak polipeptid zincirinden dipeptidleri ayıran dipeptidil-peptidazları ve tripeptidleri ayıran tripeptidil-peptidazları içermektedir. Ayrıca tetrapeptid dipeptidazlar sadece tetrapeptidleri hidrolizlerken, dipeptidazlar substratların dipeptidleri üzerinde aktivite gösterir. AP'ler aktif bölgelerinin inhibitörlere duyarlılığına göre üç ana gruba ayrılabilirler. Bunlar;

metallo AP, sistein AP ve serin AP'dir. Aktif bölgelerine göre metallo AP'ler en büyük grubu oluşturmaktadır.

Karboksipeptidazlar C-terminalde serbest bir α -karboksi gruba ihtiyaç duyarlar. CP'lerin spesifikliğı aslında C-terminaldeki amino asitler tarafından belirlenmektedir. CP'ler de aktif bölgelerine göre üç gruba ayrılırlar. Bunlar; metallo CP, sistein CP ve serin CP'dir. Serin CP ve AP aktif bölgelerinde tüm serin proteazlar için karakteristik olan; Ser, Asp ve His amino asitlerinden oluşan bir katalitik üçlü içermektedir. Bunun yanı sıra; metallo CP ve AP, bir kofaktör olarak, sıkıca bağılı çinko atomu içermektedir. Metallo CP'ler tüm CP'lerin üçte ikisini oluşturmaktadır ve amino asit diziliminin homojenliğine göre iki alt gruba ayrılabilir. Bunlar CP- A, -B, -U ve CP- H, -M, -N'dir. Her alt sınıfın kendi içinde CP diziliminin homojenliği % 40 ila 58 aralığındadır. Buna rağmen alt grupların birbirleri arasındaki homojenliği sadece %14 ila 20 aralığındadır (Raksakulthai ve Haard 2003).

2.2.3 Endopeptidazlar

Endopeptidazlar; polipeptid zincirinin N ve C uçlarının iç bölgelerindeki peptid bağlarında sergiledikleri seçimli reaksiyonlar ile karakterize edilmektedirler. Serbest amino veya karboksi gruplarının enzim aktivitesi üzerine olumsuz bir etkisi bulunmaktadır. Endopeptidazlar katalitik mekanizmalarına göre altı alt gruba ayrılırlar. Bunlar;

i. Serin Proteaz

ii. Sistein Proteaz

iii. Aspartik Proteaz

iv. Metallo Proteaz

v. Treonin Proteaz

vi. Glutamik Proteaz (Turk 2006).

Toplamda tanımlanmış 1238 proteaz dizisi bulunmaktadır ve bu dizinin; 79 aspartik proteaz, 237 sistein proteaz, 3 glutamik proteaz, 421 metallo proteaz, 31 treonin proteaz ve 467 serin proteaz içerdiği bildirilmiştir (Chou ve Cai 2006). En çok çalışılmış olan dört proteaz sınıfına ait örnekler ve bazı özellikleri çizelge 2.1’de gösterilmiştir (Mahajan ve Badgujar 2010).

Çizelge 2.1 Bazı proteaz sınıflarının örnekleri ve özellikleri

Özellik	Serin Proteaz	Sistein Proteaz	Aspartik Proteaz	Metallo Proteaz
Eski İsmi	Serin	Tiyol	Karboksil	Metallo
Enzim Sınıfı	3.4.21	3.4.22	3.4.23	3.4.24
Katalitik bölgedeki bileşen	Serin	Sistein	Aspartik Asit	Zn ⁺⁺
pH aralığı	7-9	3-7	2-6	5-9
Sıcaklık aralığı (°C)	20-80	25-70	40-70	40-60
Molekül kütlesi (kDa)	20-135	20-65	30-60	20-60
İnhibitörleri (in vitro)	PMSF, DIFP	E-64, Iyodoasetat	Pepsitatin	EDTA
İnhibitörleri (in vivo)	a ₁ , a ₂ ve a ₃ Proteinaz inhibitör	Cystatinler	Bilinmiyor	TIMP-1, TIMP-2
Konumu	Hücre içi ve hücre dışı	Lizozomlarda	Lizozomlarda	Hücre içi ve hücre dışı
Örnek	Elastin, Plasmin	Kathepsin B ve L	Kathepsin D	Gelatinaz

2.2.3.1 Serin proteaz

Serin proteazlar, bugüne dek çalışılmış en geniş çaplı proteolitik enzimlerdir (Castroa vd.2010). Bilinen tüm proteolitik enzimlerin üçte birinden fazlasını 40 aile ve 13 klan halinde gruplandırılmış serin proteazlar oluşturmaktadır. Bu aile ismi enzimin aktif bölgesindeki nükleofilik Serin’den kaynaklanmaktadır (Cera 2009). Tüm serin proteaz ailelerinde katalitik birimlerin bir özeti çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2 Serin proteazların genel özellikleri (Cera 2009)

Klan	Aileler	Temsilci Üyeler	Katalitik bölgedeki kalıntılar	Nükleofil olarak hareket eden kalıntı
PA	12*	Tripsin	His, Asp, Ser	195
SB	2	Subtilisin	Asp, His, Ser	221
SC	2	Prolil oligopeptidaz	Ser, Asp, His	554
SE	6	D-Ala-D-Ala Karboksipeptidaz	Ser, Lys	62
SF	3	Lex A peptidaz	Ser, Lys/His	119
SH	2	Sitomegalovirüs assembili	His, Ser, His	132
SJ	1	Lon-peptidaz	Ser, Lys	697
SK	2	Clp peptidaz	Ser, His, Asp	97
SP	3	Nükleoporin	His, Ser	yok
SQ	1	Aminopeptidaz DmpA	Ser	250
SR	1	Laktoferrin	Lys, Ser	259
SS	14	L,D-Karboksipeptidaz	Ser, Glu,His	115
ST	5	Romboid	His, Ser	201
Katalitik birimlerin çeşitliliği nükleofilik Ser'e yardımcı olmak için ortaya çıkmıştır.				
* PA klanındaki viral kökenli yedi aile; bağ hidolizi için nükleofilik bir Cys kullanır.				

SB Peptidaz Klanı

Klan SB peptidazlar; bitki genomu, bakteri genomu ve hayvan genomundaki belli birkaç temsilcisi ile yaygındır. Ancak bu proprotein konvertazlar (inaktif olarak bulunan öncül protein formlarını aktif formlara çeviren enzimler) tüm metazoalarda protein işlenmesi için hayati öneme sahiptir. Klan SB'nin ilk örneği subtilisindir. Subtilisin ilk olarak gram pozitif bir bakteri olan *Bacillus subtilis*'te keşfedilmiştir ve protein kristal yapısı ilk belirlenmiş enzimlerden biridir. Önemli biçimde, katalitik bölgede bulunan Asp, His, Ser üçlüsünün tam geometrik düzenlenmesi, klan PA peptidazda gözlenmiştir; ama çevrelerindeki proteinlerin katlanması benzer değildir. Klan SB ayrıca S53 peptidazların ikinci bir ailesini içerir, sedolisinler (serin karboksil peptidaz). Bu peptidazlarda, bir Glu kalıntısıyla His genel bir baz yerine geçer ve tetrahedral ara ürün Asp kalıntısından kaynaklanan negatif yüklü bir karboksil grubundan ziyade kısmi

pozitif yük aracılığıyla stabilize edilir. Sedolisinler; düşük pH'larda aktivite gösterebilirler. Subtilisinlerin protein mühendisliği çalışmaları için son derece yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Subtilisinlerde tüm rasyonel mutagenizelerde ve yönlendirilmiş evrim yaklaşımlarında; substrat seçiciliği, termal kararlılığı, soğuğa uyum sağlaması, susuz çözeltilerdeki kararlılığı, florür aktivasyonu ve bir peptid ligand olarak hareket yeteneği tanımlanmıştır. Subtilisinler üzerindeki mühendislik çalışmalarının çoğu çamaşır deterjanlarında kullanılan temizlik maddelerinin büyük ölçüde geliştirilmesini sağlamıştır. SB klanının fizyolojik fonksiyonu; protein işlenmesinde seçimli rollerle beslenmeye yönelik olma eğilimindedir. Klan SB peptidazların büyük çoğunluğu; büyük hidrofobik kalıntıların C-terminal ucundaki substratları hidrolizlemeyi tercih ederler. Ancak, kexin ve furin gibi proprotein-işleme peptidazları bir çift dibazik kalıntının ardından ayırır. Subtilisinin substrat-bağlayıcı cebi; protein mühendisliği için, klan PA peptidazların sınırlı seçimliliğinin zıttına yeni ve yüksek substrat seçimli profillere uygundur. Klan SB peptidazların büyük çoğunluğu; hücrenin dışından yada hücre membranından lokalize halde salgılanır. Hücre içi protein dönüşümünden sorumlu tripeptidil-peptidazlar bir istisnadır (Page ve Cera 2008).

SC Peptidaz Klanı

Klan SC peptidazlar; paralel β -iplikçiklerinin α -helikslerle çevrelenerek oluşturulduğu α/β katlanması gösteren enzimlerdir. α/β hidrolaz katlanması klan SC peptidazlara; proteolitik aktiviteye ek olarak esteraz, lipaz, dehalojenaz, haloperoksidaz, liyaz veya epoksit hidrolaz gibi etki edebileceği çok yönlü katalitik bir düzlem sağlar. α/β hidrolaz katlanmasının katalitik yükümlülükleri; klan SC peptidazların insan genomunda en büyük ikinci serin peptidaz ailesi olmasının asıl nedenini açıklayabilir. Diğer mekanistik sınıflar, katalitik Ser kullanımı yerine Cys ya da Glu kullanımına ihtiyaç duymazlar. Klan SC peptidazların katalitik üçlüsünün geometrisi, polipeptid sıralaması farklı bir şekilde dizilen klan PA ve SC peptidazlarda gözlenenle benzerdir. Substrat seçiciliği; kıvrımları enzim-substrat ilişkilerini etkileyebilecek β -yaprak çekirdeğinin merkezini çevreleyen α -helikslerden doğmaktadır. Klan SC peptidazlar içinde; S10 ailesinden gelen karboksipeptidazlar, asidik ortamlarda katalitik aktivitelerini sürdürme yetenekleri ile benzersizdirler. Neredeyse tüm serin peptidazların aksine nötralden baziğe kadar olan pH aralığında sınırlı aktiviteye sahiptirler. Birçok klan SC peptidaz, bir kaç istisna

dışında substratları C-ucu tarafındaki bir Pro kalıntısından hidrolizler. Üyeleri ağırlıklı olarak endo veya ekzo proteolitik aktiviteden birini gösteren diğer serin peptidaz ailelerinin aksine klan SC'de hem endoproteolitik hem de ekzoproteolitik aktivite mevcuttur. Klan SC peptidazların farklı seçiciliklerine bir örnek olarak; S9 ailesinden prolil oligopeptidaz peptidlerin iç bölgelerindeki peptid bağlarını parçalarken, S33 ailesinden prolil aminopeptidaz N-terminal ucundaki Pro ve hidroksiprolin kalıntılarını peptidlerden uzaklaştırır. Küçük peptidler ve kısa proteinler yönünden seçiciliği temel alınarak; klan SC peptidazların özellikle hücre sinyal mekanizmalarında önemli olduğu düşünülmektedir (Page ve Cera 2008).

SE Peptidaz Klanı

Klan SE peptidazlar, yüksek organizmalarda minimal bir dağılımla bakteriyel hücre duvarı metabolizmasında önemli rol oynarlar. Birçok serin peptidazın katalitik kalıntılarının kombinasyonu polipeptid diziliminde ciddi bir uzaklıkla ayrılmış durumda olmasına rağmen, SE klan peptidazlar sadece iki kalıntıyla ayrılmış Ser ve Lys ikilisinden oluşan bir mekanizma kullanır. Üçüncü bir Ser veya Tyr kalıntısı da nükleofilik Ser'den gelen protonun alınmasına yardımcı olabilir. Birçok klan SE peptidaz karboksipeptidazdır ve endopeptidaz ailesinde olanlar çoğunlukla; polipeptidlerde bulunmayan, bakteriyel hücre duvarıyla bağlantılı D-Ala–D-Ala peptid bağını hidrolizleyen transpeptidazlardır. Bu enzim aynı zamanda penisilin bağlama özelliğiyle de bilinmektedir, ancak bu bileşiğin antibiyotik özelliği D-Ala–D-Ala karboksipeptidazlar ile doğrudan alakalı değildir. Bu peptidazlarla, C sınıfı β -laktamazlar arasında yapısal bir benzerlik bulunmaktadır. Sadece bir klan SE peptidaz insan genomunda bulunmaktadır; 15 kromozomu üzerindeki LACT-1 peptidaz. LACT-1 omurgalılarda muhafaza edilmektedir ve henüz biyolojik işlevleri bilinmemektedir (Page ve Cera 2008).

SF Peptidaz Klanı

SF klanından gelen peptidazlar prokaryotlarda Ser ve Lys ikilisini ya da ökaryotlarda Ser ve His ikilisini kullanırlar. Bu enzimlerin endoproteolitik katalitik düzenekleri bir bütün halindeki β -ipliksi yapılar tarafından desteklenmektedir. Klan SF peptidazların

çoğu kendi kendine işler ve önemli konformasyonel değişimleri izleyen bağ hidrolizlerine yol açarlar. SF klanının ikinci ailesi S24 'tür ve organizmalardaki bütün canlı âlemlerden sinyal peptidazının taşınmasından sorumludur. İnsan genomunda S24 ailesinin beş temsilcisi bulunmaktadır. Bu sinyal peptidazlarının diizopropilflorofosfat gibi genel serin peptidaz inhibitörleri ile inhibe olmaması benzersizdir ancak birkaç lipoprotein ve substitue β -laktamlar tarafından inhibe edilebilirler. Sinyal peptidazlar; sinyallerin ya da translokasyon için membranlarda açığa çıkan polipeptidlerin yönlendirilmesinden sorumlu proproteinlerin uç dizilimlerinin taşınmasında hayati önem taşırlar. Neredeyse bütün klan SF peptidazlar; özellikle büyük bir hidrofobik amino asit olan Xaa'da bulunan Ala-Xaa-Ala motifinden sonra gelen, Ala gibi alifatik yan zincirlere karşı güçlü seçicilik sergilemektedir (Page ve Cera 2008).

SJ ve SK Peptidaz Klanları

Klan SJ peptidazlar kataliz için Ser ve Lys katalitik ikilisinden faydalanmaktadırlar. Gerçekleştirdikleri proteolizinin ATP-bağımlı olması ve ATPazlar gibi hareket edebilme yeteneğine sahip olmaları SJ klan peptidazların benzersiz kılar. Bu enzimlerde proteolizin hız kısıtlayıcı basamağı; enzimin aktif bölgesinden ATP-bağımlı ürünün salınımı olduğu düşünülmektedir. *E. coli* gelen Lon peptidaz muhtemelen ailenin en iyi bilinen örneklerindendir. Hücre içinde geçici düzenleyeci proteinlerin ve yanlış katlanmış proteinlerin yıkılması Lon peptidazların fonksiyonları içerisinde. Lon peptidaz; SK ailesinden ClpP ve PA ailesinden HtrA peptidazla birlikte *E.Coli*'de ve diğer bakterilerde hücre içi protein düzeylerinden sorumludur. Bütün SJ klan peptidazlar; hidrofobik yan zincirler için primer substrat-bağlayıcı cepte özellikle Leu kalıntılarından yana ortak bir tercih sergilerler. Klan SK peptidazlar bakterilerde geniş bir dağılıma sahiptir ve hücre içi protein düzeylerinin belirlenmesinde ve protein işlenmesinde rol oynamaktadır. SK klanının katalitik ünitesi çeşitlidir. SK klanının S41 ailesi önemli ölçüde farklı iki alt aile içerir. İnsan genomu iki tane klan SJ peptidaz ve üç tane klan SK peptidaz içerir. Ancak, iki tane klan SJ peptidaz üyesi proteolitik aktivite ile ilişkili değildir (Page ve Cera 2008).

SH, SP, SQ, SR ve SS Peptidaz Klanları

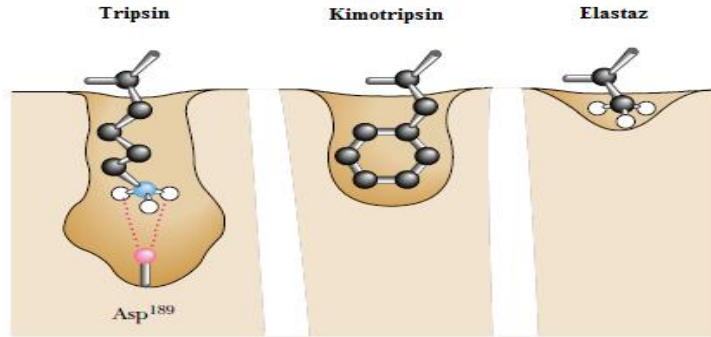
SH, SP, SQ, SR ve SS klanlarında; her bir klan için ilgili enzimlerin bir aile içinde belirtildiği az sayıda peptidaz yer almaktadır. S21 ailesi olan assemblin peptidazlar çeşitli viral genomlarda bulunmaktadır ve katalitik mekanizma için diğer serin peptidaz ailelerinde gözlenmeyen ilginç bir üçlüden faydalanır; His, Ser, His. SP klanının S59 ailesi nükleoporinleri içerir. Nükleoporinler; yalnızca tek bir kalıntı ile ayrılmış Ser ve His ikilisinin benzersiz bir kombinasyonuna sahiptir. SQ klan peptidazın S58 ailesinde, *Ochrobactrum anthropi*'den elde edilen DmpA aminopeptidazda olduğu gibi otolitik bölünme gözlenmektedir. SR klanındaki laktoferrin patojenik organizmalarda bir dizi proteine karşı proteolitik aktivite sergilemektedir. SS klan peptidazlar Ser, Glu ve His katalitik üçlüsüne sahiptir. SS klan peptidazların S66 ailesinde bulunan LD-Karboksipeptidazlar; bakteriyel peptidoglikanlarda D ve L aminoasitleri arasındaki peptid bağlarını hidrolizleme yeteneğine sahiptir bu yüzden peptidoglikanların geri dönüşümünde rol oynadığı düşünülmektedir (Page ve Cera 2008).

ST Peptidaz Klanı

Peptidazların bir kaç ailesi fosfolipid çift tabakasındaki peptid bağlarını hidrolizleme yetenekleriyle tanımlanmıştır. Metallopeptidazların sterol mekanizmasında rol oynadığı ve bir aspartil peptidaz olan γ -sekretazdan salınan β -amiloid peptidlerinin Alzheimer hastalığıyla ilgili olduğu bilinmektedir. Bakteriden insana kadar olan organizmaların tüm âlemlerinde bulunan bir ST klan peptidaz olan romboidler, membran içi proteolizi gerçekleştirebilen serin peptidazlardır. Romboidler; hücre içi sinyallerin ve mitokondriyal morfoloji-dinamiğin algılanmasını içeren çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Romboidler membranın periplazmik kısmına yakın yerlerdeki tek açıklıklı transmembran proteinlerini ayırırlar. Peptidazlarda proteolizin ortaya çıkması için konformasyonel bir değişikliğin oluşması gerekir. Bu tür değişiklikler; substrat seçiciliğinin belirleyici olduğu bilinen enzimlerin çözünebilir kısımlarından kaynaklanabilir. Çözünebilir proteazların çeşitliliği göz önüne alındığında, membran içi peptidazların diğer ailelerinin tanımlanması muhtemeldir (Page ve Cera 2008).

PA Peptidaz Klanı

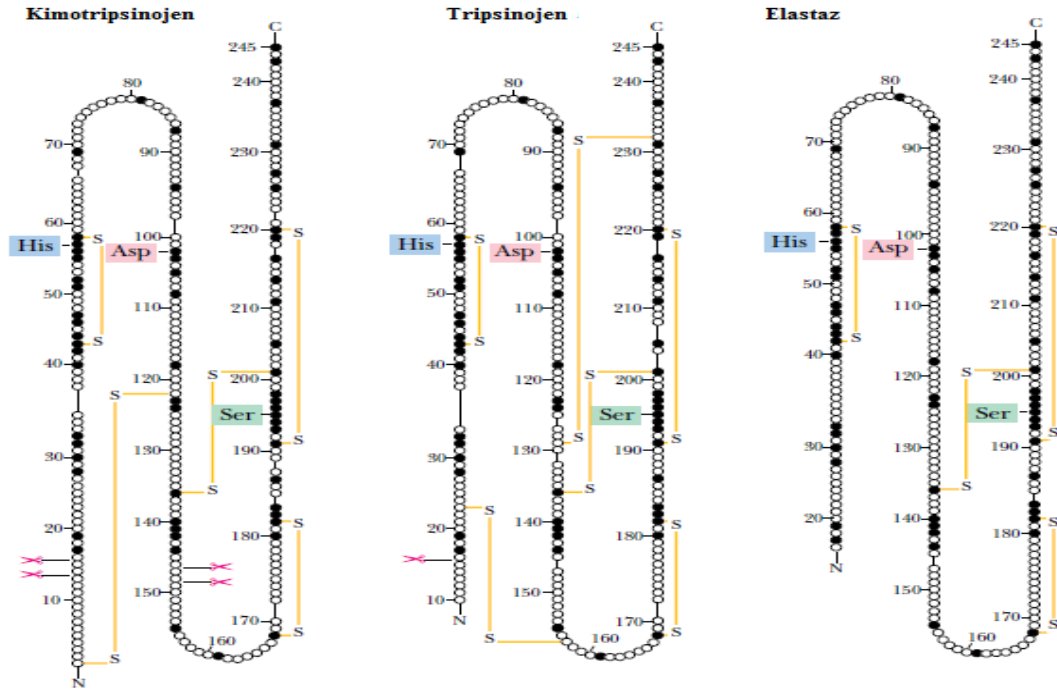
Kimotripsin katlanmasını içeren PA klan peptidazlar; serin peptidazların en büyük ailesidir ve muhtemelen en çok çalışılmış enzim gurubudur. Birçok önemli biyolojik süreçte PA klan peptidazlara güvenilmektedir. Kanın pıhtılaşması ve dizil zimojenlerin aktivasyonunun içeren immün yanıtın oluşturulması en önemlileri arasındadır. Tripsin, kimotripsin ve elastaz enzimlerinin hepsi peptid bağlarının hidrolizinde aynı reaksiyonu gösterirler. Bu enzimlerin yapıları ve mekanizmaları oldukça benzer olmasına rağmen, çok farklı özellikler sergilerler. Kimotripsin ve tripsin gibi sindirim enzimlerini içeren öncü çalışmalar bu enzimlerin C-terminal tarafındaki polipeptid zincirlerini sırasıyla büyük hidrofobik kalıntıların (Phe, Trp, Tyr) ya da pozitif yüklü yan zincirlerin (Arg veya Lys) olduğu yerden parçaladığını göstermiştir. Bunun yanı sıra elastaz enzimi diğer iki enzim kadar spesifik değildir; esas olarak peptid zincirini C-terminal tarafındaki küçük ve nötral kalıntılardan parçalar. Şekil 2.2’de görüldüğü gibi bu enzimlerin aktif bölgelerinde, spesifik kalıntıları tanınmasında kullanılan küçük bir cep vardır (Cera 2009, Garrett ve Grisham 2010).



Şekil 2.2 Tripsin, Kimotripsin ve elastazın substrat bağlayıcı cepleri (Garrett ve Grisham 2010)

PA klan peptidazların birçoğu; Arg yan zinciri açısından tripsin benzeri substrat seçiciliğine sahiptir ancak pek çok viral veya bakteriyel aile üyeleri Gln için seçicidir. PA klan peptidazlar; substrat seçiciliklerine göre mekanizmalarında çarpıcı farklılıklar bulunan iki altfamilyaya ayrılmıştır (S1A ve S1B). S1B peptidazlar tüm canlı hücrelerde bulunmaktadır ve hücre içi protein dönüşümünden sorumludur. Aksine, S1A

peptidazlar çeşitli hücre dışı işlemlerde aracılık yapan tripsinlerdir. S1A peptidazlar; bitkilerde, prokaryotlarda ve arkelerde sınırlı bir dağılıma sahiptir. Neredeyse tüm PA klan peptidazlar standart bir katalitik üçlüden faydalanmaktadır ama viral kökenli bir kaç aile üyesi Cys kalıntısından gelen bir tiyol aktif bölgesini kullanmaktadır. PA klan peptidazlar ailesine dâhil olan tripsin, kimotripsin ve elastaz gibi sindirim enzimleri pankreasta sentezlenir ve sindirim sistemine inaktif proenzimler ya da zimojenleri şeklinde salınır (Şekil 2.3). Sindirim sistemi içerisinde; zimojenler, peptid zincirinin parçalanmayacak bir kısmı tarafından aktif enzim formlarına dönüştürülür (Cera 2009, Garrett ve Grisham 2010).



Şekil 2.3 Kimotripsinojen, tripsinojen ve elastazın karşılaştırılması (Garrett ve Grisham 2010)

Her daire bir amino asidi göstermektedir. Siyah daireler her üç proteinde aynı kalıntıları göstermektedir. Disülfid bağları sarıyla gösterilmiştir.

2.2.3.2 Sistein proteaz

Sistein proteazlar tüm canlı organizmalarda bulunmaktadır. Sistein proteazların yirmiden fazla ailesi tanımlanmıştır ve bunların birçoğu (papain, bromelain, fisin ve hayvansal katepsinler gibi) endüstriyel öneme sahiptir. Son zamanlarda sistein proteazlar, özellikle lizozomal katepsinler, ilaç endüstrisinin ilgisini çekmektedir.

Lizozomal proteinazlar olan katepsinler, endopeptidazların ve/veya ekzopeptidazların bir ailesi olarak belirtilmektedir. Bazı katepsinler asidik pH ortamında aktifken, bazıları da nötral pH ortamında aktiftirler. Katepsinler; osteoporoz, romatoid artrit, damar sertliği, kanser, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar gibi pek çok hastalık için ilaç hedeflerinde umut vericidir. Kaspazlar, diğer bir sistein proteaz grubu, programlı hücre ölümünü düzenleyen apoptotik düzeneklerin önemli bir unsurudur. Sistein proteazlar (EC. 3.4.22) 21-30 kDa civarında molekül kütleli proteinlerdir. Bu proteazlar; peptid, amid, ester, tiyol ester ve tiyono ester bağlarının hidrolizini katalizler. Sistein proteazlar beş klana ayrılır. Bunlar;

i. CA (Papain benzeri enzimler)

ii. CB (Viral kimotripsin benzeri sistein proteazlar)

iii. CC (RNA virüslerinin papain benzeri endopeptidazları)

iv. CD (Legumin tipi kaspazlar)

v. CE (Katalitik bölgelerinde His, Glu/Asp, Gln, Cys kalıntıları içerenler)

Karakterize edilmiş sistein proteazların çoğunluğu gelişimsel açıdan papainle ilişkilidir ve ortak bir katlanmayı paylaşırlar. Bir sinyal peptidi ve bir N-terminal propeptidiyle birlikte inaktif öncüller şeklinde sentezlenirler. C1 ailesinin bazı peptidazları C-terminal uzantılarına sahiptir. Proteolitik parçalama için N-terminalin öncü-bölgelerinin aktivasyonu gereklidir bu bölgeler enzimin inhibitörü gibide fonksiyon gösterir. Sistein proteazların birçoğu; E-64, sistatinler ve birçok sentetik inhibitör tarafından inhibe edilir.

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

birleşmesiyle oluşur ve 23,4 kDa moleköl kütlesine sahiptir. 8,75 izoelektronik noktasıyla nispeten basit bir proteindir.

En çok bilinen sistein proteazlardan biride bromelaindir. Aslında bromelain ismi ananasın kökünün ve meyvesinin sularında bulunan bir proteaz karışımına verilmiştir. Şimdi bile, *Bromeliaceae* ailesinin çeşitli üyelerinde bulunan enzimleri için bromelain genel adı kullanılmaktadır. Bitki köklerinde ekstrakte edilen endopeptidazların büyük çoğunluğu "kök bromelaini" diye adlandırılırken ananas meyvesinin suyunda bulunan enzim fraksiyonlarının önemli bir çoğunluğu "meyve bromelaini" olarak adlandırılır. Ananas kökünde, diğer bazı ikincil sistein endopeptidazlarda (ananain, komosain) bulunmaktadır. Kök bromelaini (EC. 3.4.22.32) papain ailesine aittir. 24,5 kDa moleköl kütlesinde glikolize tek zincirli bir proteindir. Yedi sisteinin dahil olduğu 212 amino asit kalıntısı içerir ve bu sisteinlerden biri katalizde yer alır. Diğer altı sisteinin her bir çifti ise üç disülfid bağının oluşumuyla ilişkilendirilir.

Ficain, İncir enzimi, (EC. 3.4.22.3; Eş anlamlısı: Ficin) *Ficus glabrata* 'nın kurutulmuş lateksinden izole edilen sistein proteaz için kullanılan bir isimdir. Aynı zamanda, *F. carica*, *F. elastica* gibi *Ficus*'un diğer türlerinde de mevcuttur. Ficin aktivasyon için sistein veya diğer indirgeyici ajanlara ihtiyaç duyar. Bu enzim; S2 cebinde hidrofobik amino asit kalıntılarını (Phe, Leu, Val) kabullenmesiyle geniş bir spesifikliğe sahiptir. Ficinde papain gibi tavuk sistatini tarafından inhibe edilir (Polaina ve MacCabe 2007).

Lizozomal katepsinler, hücrel protein yıkımının dâhil olduğu bir kaç fizyolojik süreçten sorumlu olan önemli bir grup enzimlerdir. Katepsin D, bir aspartik proteazken kasta bulunan diğer katepsinler serin veya sistein proteazlardır (Çaklı 1999). Katepsinler, farklı dokularda spesifik fonksiyonlarıyla ilişkili farklı özgüllüklere sahiptir. Katepsin S dışında, insan katepsinleri lizozomal bölümlerde asidik pH'larda optimum aktivite gösterirler ve nötral pH'larda hızla inaktif hale gelirler (Polaina ve MacCabe 2007).

2.2.3.3 Aspartik proteaz

Memeliler, mantarlar ve yüksek bitkiler aspartik proteaz olarak bilinen bir proteolitik enzim ailesini üretirler. Bu enzimler asidik (ya da bazen nötral) pH'larda aktivite gösterirler ve hepsi aktif bölgelerinde iki aspartik asit kalıntısı bulundurur. Aspartik proteazlar; sindirim (pepsin ve kimozin), lizozomal protein yıkımı (kathepsin D ve E) ve kan basıncının düzenlenmesini (renin, anjiyotesinin üretiminde görev alan bir aspartik proteazdır; anjiyotesin düz kasların kasılmasını uyaran ve tuz-sıvı atımını azaltan bir hormondur.) içeren çeşitli fonksiyonları yürütürler (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3 Aspartik proteazlara bazı örnekler

İsim	Kaynak	Fonksiyonları
Pepsin *	Hayvan Midesi	Besinsel Proteinlerin Sindirilmesi
Kimozin ^{'''}	Hayvan Midesi	Besinsel Proteinlerin Sindirilmesi
Kathepsin D	Dalak, Karaciğer ve diğer bir çok hayvan dokusunda	Proteinlerin Lizozomal Sindirimi
Rennin [§]	Böbrek	Anjiyotesinojenin Anjiyotesine Dönüştürülmesi; Kan Basıncının Düzenlenmesi.
HIV Proteaz [#]	AIDS Virüsü	AIDS Virüs Proteinlerinin İşlenmesi
* Kristalleştirilen ikinci enzimdir (1930 yılında John Northrup tarafından). Northrup pepsinle yaptığı çalışmalarda, enzim aktivitesinin proteinlerden geldiğini belirledi.		
^{'''} Rennin olarak bilinen bu enzim aslında yeni doğan ve fetal hayvanların mide suyunda bulunan pepsin benzeri bir enzimdir.		
[§] Kan basıncının düşmesi durumunda daha fazla anjiyotensinojenin anjiyotensin dönüştürülmesi için böbreklerden rennin salınımı olur.		
[#] Aynı monomerlerin bir dimeri, homolog pepsin.		

Aspartik proteazlar çeşitli substrat spesifikliğı sergilerler fakat çoğunlukla iki hidrofobik amino asit kalıntısı arasındaki peptid bağlarının parçalanmasında en yüksek aktiviteyi gösterirler. Örneğin pepsin, parçalanacak olan peptid bağının her iki tarafında da aromatik kalıntılar içeren substratları tercih eder. Bir çok aspartik proteaz, molekül kütlesi yaklaşık 35 kDa olan 323-340 amino asit kalıntısından oluşur. Aspartik proteaz polipeptidleri; yaklaşık iki kat simetriyle iki benzer lobun birleşmesiyle üçüncül bir yapı üretmek için katlanan iki homolog etki alanından oluşur. Bu loblardan ya da etki alanlarından her biri iki β -yapraktan ve iki kısa α -heliksten oluşur. Altı sarmallı,

antiparalel bir β -yaprağı tarafından iki etki bölgesine bir köprü kurularak birleştirilir. Aktif bölge; yan yana iki etki bölgesi tarafından oluşturulmuş ve yaklaşık yedi aminoasit kalıntısını içine alabilecek büyüklükte derin ve geniş bir çukurdur. Örneğin domuzlarda bulunan pepsinde iki katalitik aspartat kalıntısı, 32 ve 215 kalıntısı, aktif bölgedeki çukurun merkezinde bulunmaktadır. N-terminal etki alanında; aktif bölgeye kadar uzanan ve aktif bölgede substratın immobilize edilmesine yardımcı olabilecek bir "flap" oluşturur. Kimotripsin, tripsin ve diğer serin proteazlarla karşılaştırılmasına dayanarak; aspartik proteazların, aktif bölgede aspartat kalıntıları içeren kovalent enzim-substrat araürününün oluşmasıyla fonksiyon gösterebileceği varsayılmaktadır (Garett ve Grisham 2010).

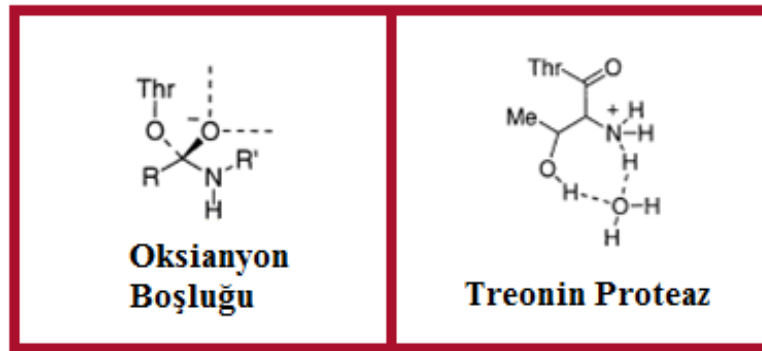
2.2.3.4 Metallo proteaz

Metalloproteazlar (Metallopeptidazlar ya da metalloproteinazlar), iki değerlikli metal iyonları kompleksi tarafından aktifleştirilmiş bir su molekülünün saldırısıyla peptid bağı parçalayan geniş bir hidrolaz sınıfını temsil eder. Birçok metalloproteaz, katalitik çinko iyonları tarafından karakterize edilir. Ancak, bazı enzimlerde bu fonksiyon manganez, kobalt, nikel veya bakır iyonları tarafından yürütülür. Bazı metalloproteazlarda iki metal iyonu katalitik olarak birlikte hareket eder. Metal iyonları; His, Asp, Glu veya Lys amino asidi kalıntılarının üçü tarafından çevrelenerek kompleks oluşturur. Protein yapılarına ve MEROPS veri tabanında uygulanan homolojilerine dayanılarak yapılan proteaz sınıflandırılmasına göre metalloproteazlarda 14 farklı klan bulunmaktadır. Buna ek olarak, M- klanı henüz hiç bir klana yerleştirilemeyen metalloproteazları içerir. MA, MC, MD, ME, MJ, MK, MM, MO ve MP klan proteazları sadece bir katalitik metal iyonuna, çoğunlukla çinko iyonu, ihtiyaç duyarlarken MF, MG, MH, MN ve MQ klanları substrat üzerinde katalitik olarak birlikte hareket eden iki metal iyonu içerirler (Polaina ve MacCabe 2007). Yaklaşık otuz sınıfı tanımlanmıştır. Bunların onyedisi yalnızca endopeptidaz, onikisi yalnızca exopeptidaz, biri hem endo hem de exopeptidaz içerirler. Metalloproteazlar işlevsel spesifikliklerine beş gruba ayrılır. Bunlar ; asit proteazlar, nötral proteazlar, alkalın proteazlar, myxobacter proteazlar I ve myxobacter proteazlar II 'dır. Alkalın olanlar geniş bir spesifiklik gösterirken nötral olanlar hidrofobik amino asitler için spesifiktir. *Myxobacter* I, ayrılan bağı her iki tarafındaki küçük amino asit kalıntılarına spesifik

iken, *myxobacter* II peptid bağının amino tarafındaki lizin kalıntılarına spesifiktir. Matriks metalloproteazlar, doku morfogenezi sırasında hücre dışı matriks degradasyonunda önemli bir rol oynarlar ve kanser ve eklem iltihabı gibi hastalıkların tedavisinde yararlı olabilirler (Rao 1998). Bunun yanı sıra endüstriyel uygulamalarda kullanılan tek metalloproteaz termolisine ve termolisine benzeri proteazdır (Polaina ve MacCabe 2007).

2.2.3.5 Treonin proteaz

Treonin proteazlar (EC. 3.4.25), 1995 yılına kadar tanımlanamamıştır. Bu proteazlar beş aile içinde sınıflandırılmışlardır (Yike 2010, Martins vd. 2009). Treonin proteazların aktif bölgeleri; treonin, metionin ve bir amid omurgasından oluşmaktadır (Şekil 2.4) (Dubey vd. 2007).



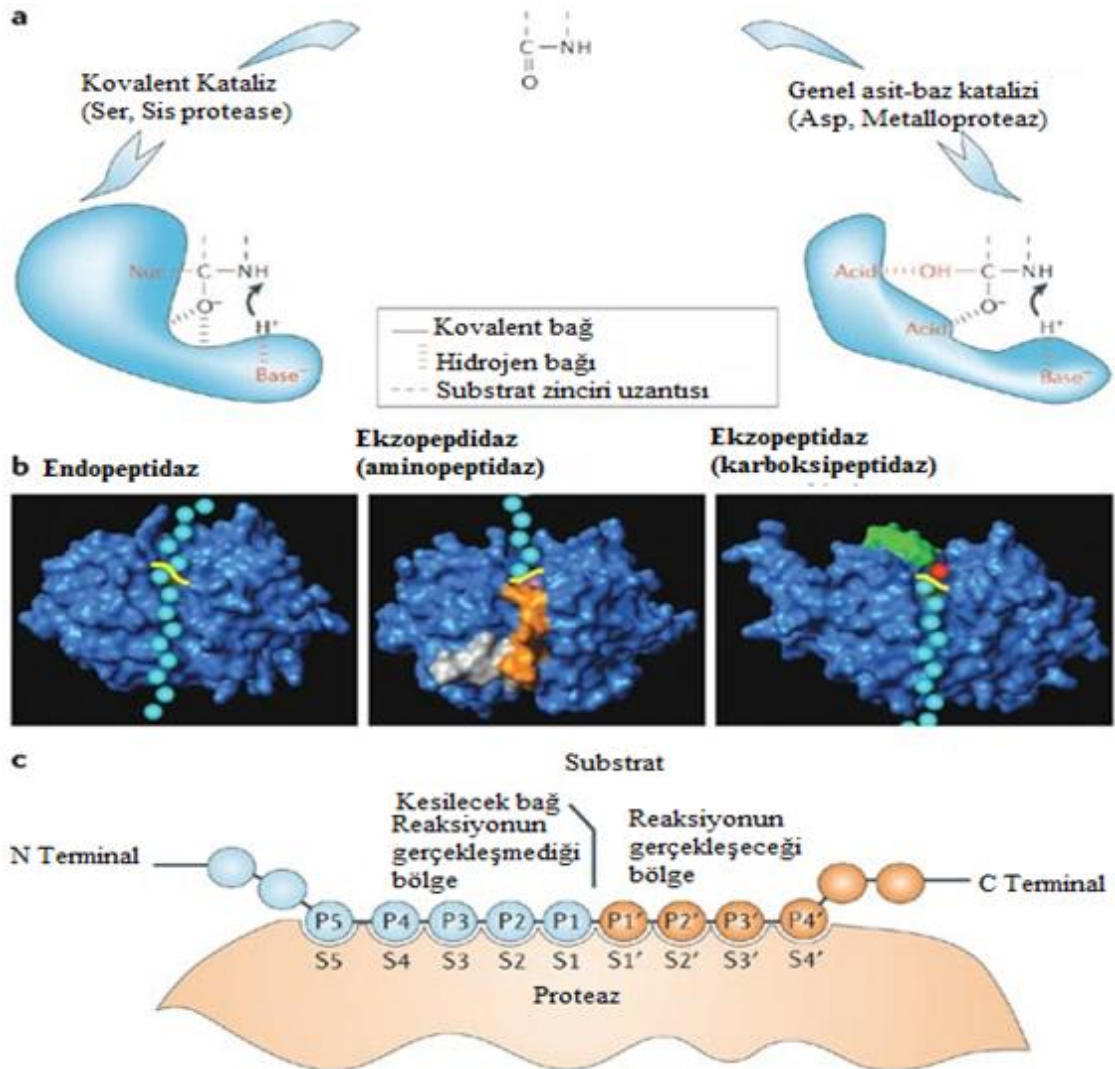
Şekil 2.4 Treonin proteazın aktif bölgesi ve oksianyon boşluğu (Powers vd. 2002)

2.2.3.6 Glutamik proteaz

Glutamik proteazlar, çok kısa bir süredir proteazların altıncı ailesi olarak tanımlanmaktadır. Bu proteazlar eskiden pepsitazin-duyarsız karboksil peptidazlar olarak tanımlanmıştır. Glutamik proteazlar, MEROPS veri tabanı G1 ailesinden, bir glutamat ve bir glutamin kalıntısından oluşan katalitik ikilisi, asidik pH'larda optimum aktivite göstermesi ve pepstatin gibi mikrobiyal kaynaklı proteaz inhibitörlerine karşı dayanıklılığı ile karakterize edilmiş farklı bir peptidaz grubudur. Bu proteazlar şimdiye kadar memelilerde bulunamamıştır.

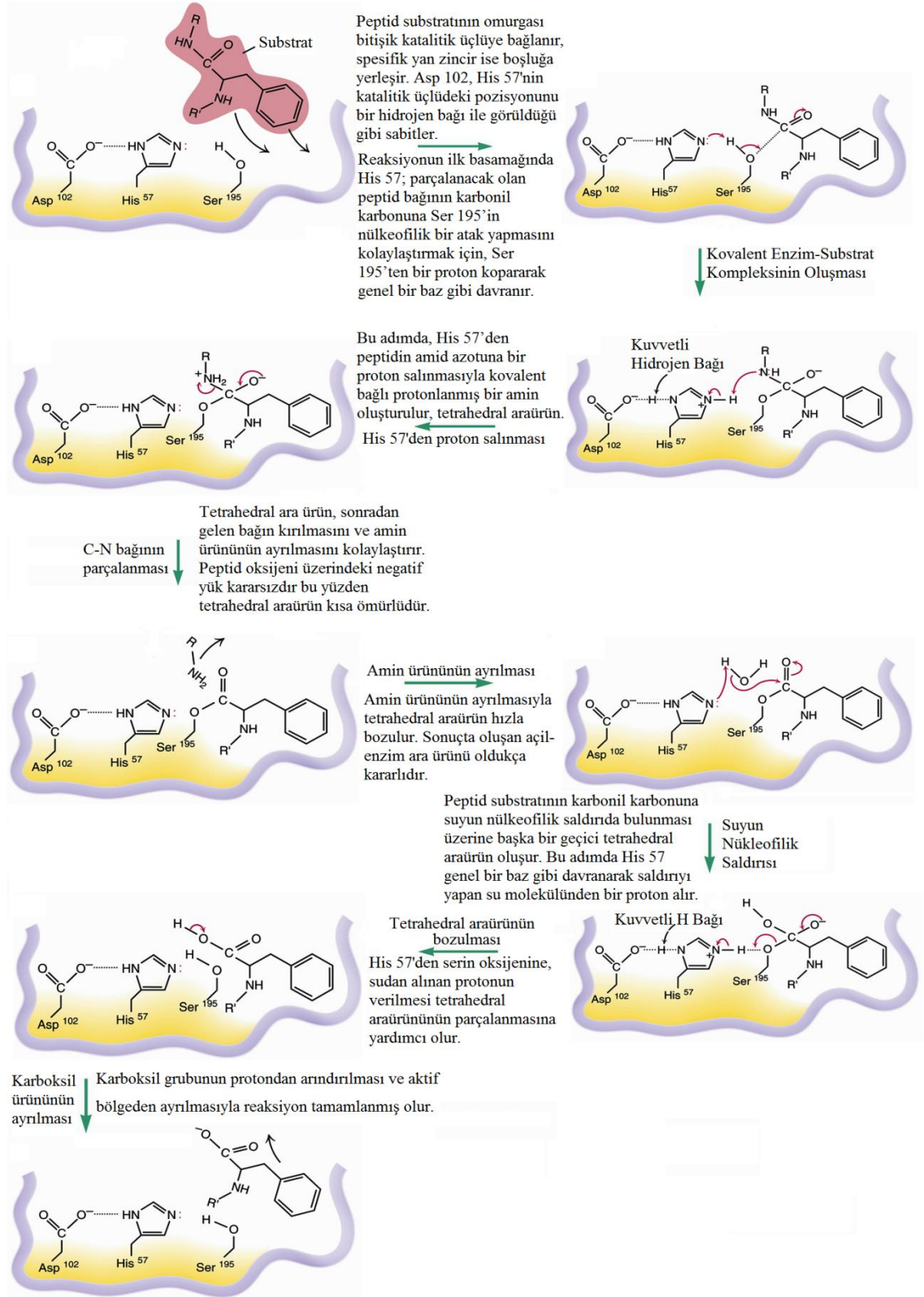
2.3 Proteazların Katalitik Etki Mekanizması

Proteaz enziminin beş önemli sınıfı tetrahedral ara ürünün stabilizesi için aslında iki farklı katalitik mekanizma kullanırlar. Serin, sistein ve treonin proteazda katalitik bölgenin nükleofilliği amino asitlerden kaynaklanırken (kovalent kataliz); metallo ve aspartik proteazda nükleofilik aktifleştirilmiş su molekülünde kaynaklanmaktadır (kovalent olmayan kataliz). Kovalent katalizde histidin normal olarak bir baz gibi fonksiyon gösterirken; kovalent olmayan katalizde Asp veya Glu kalıntıları ve çinko (metalloproteazlarda), asitler ve bazlar gibi hizmet eder (Şekil 2.5) (Türk 2006).



Şekil 2.5 Proteazların etki mekanizmalarına genel bir bakış (Türk 2006)

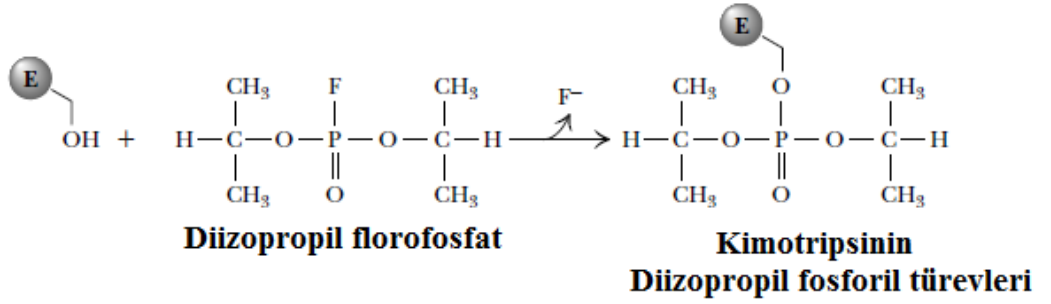
2.3.1 Serin proteazın katalitik mekanizması



Şekil 2.6 Kimotripsinin katalitik etki mekanizması (Garett ve Grisham 2010)

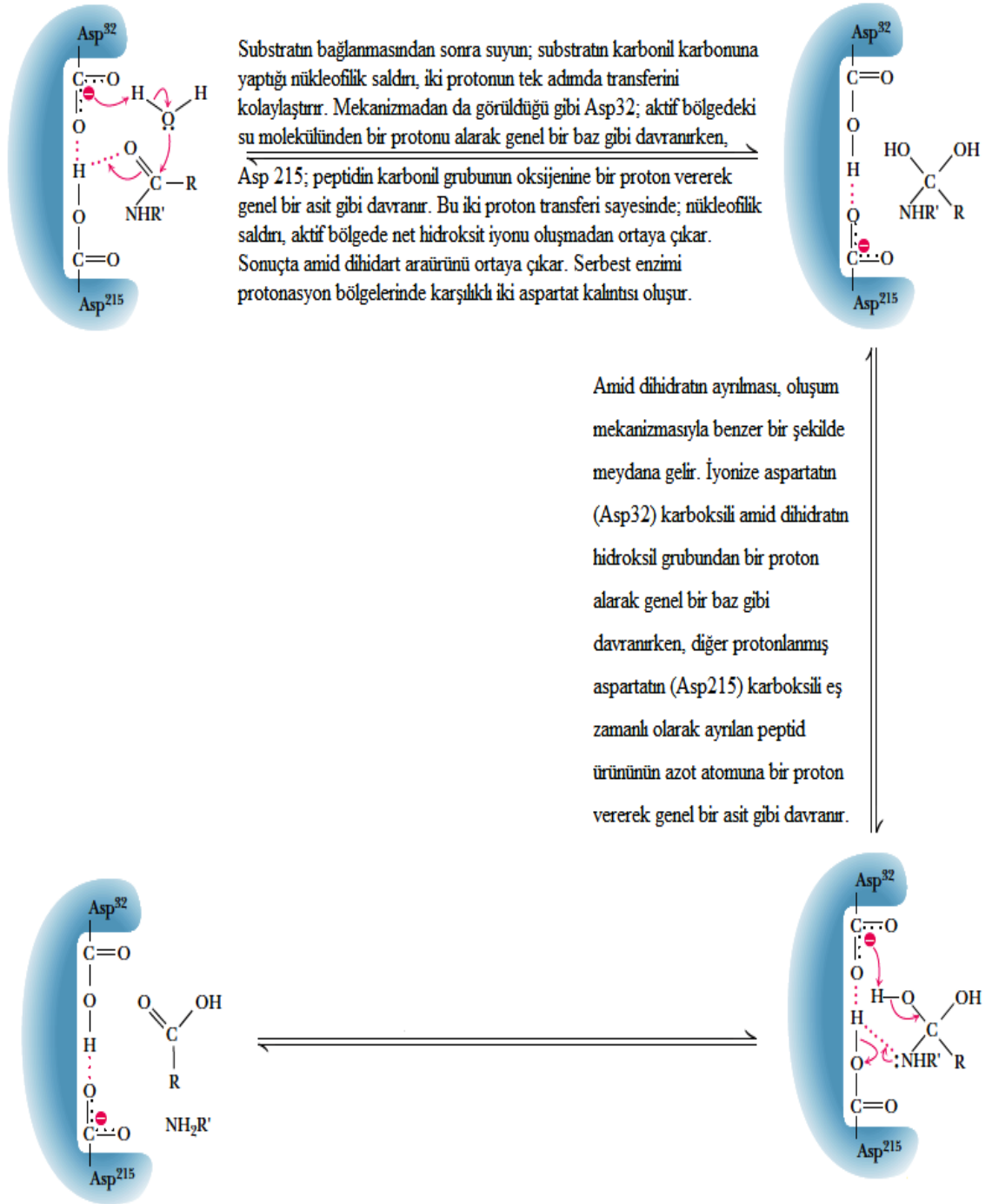
Serin proteazların inhibisyon reaksiyonu;

Kimotripsin gibi serin proteazlar, diizopropil florofosfat gibi organik florofosfatlar tarafından inhibe edilirler. DIFP; kimotripsinde ve diğer serin proteazlarda bulunan Ser195 (bu proteinlerdeki diğer serinlerden herhangi biriyle değil sadece Ser 195'le) gibi aktif bölgedeki serin kalıntılarıyla, bir DIP-enzim yapısını oluşturmak için hızla reaksiyona girer. Bu kovalent enzim-inhibitör kompleksi son derece kararlıdır ve kimotripsin böylece DIFP tarafından kalıcı bir şekilde inaktifleştirilir (Şekil 2.7) (Garett ve Grisham 2010).



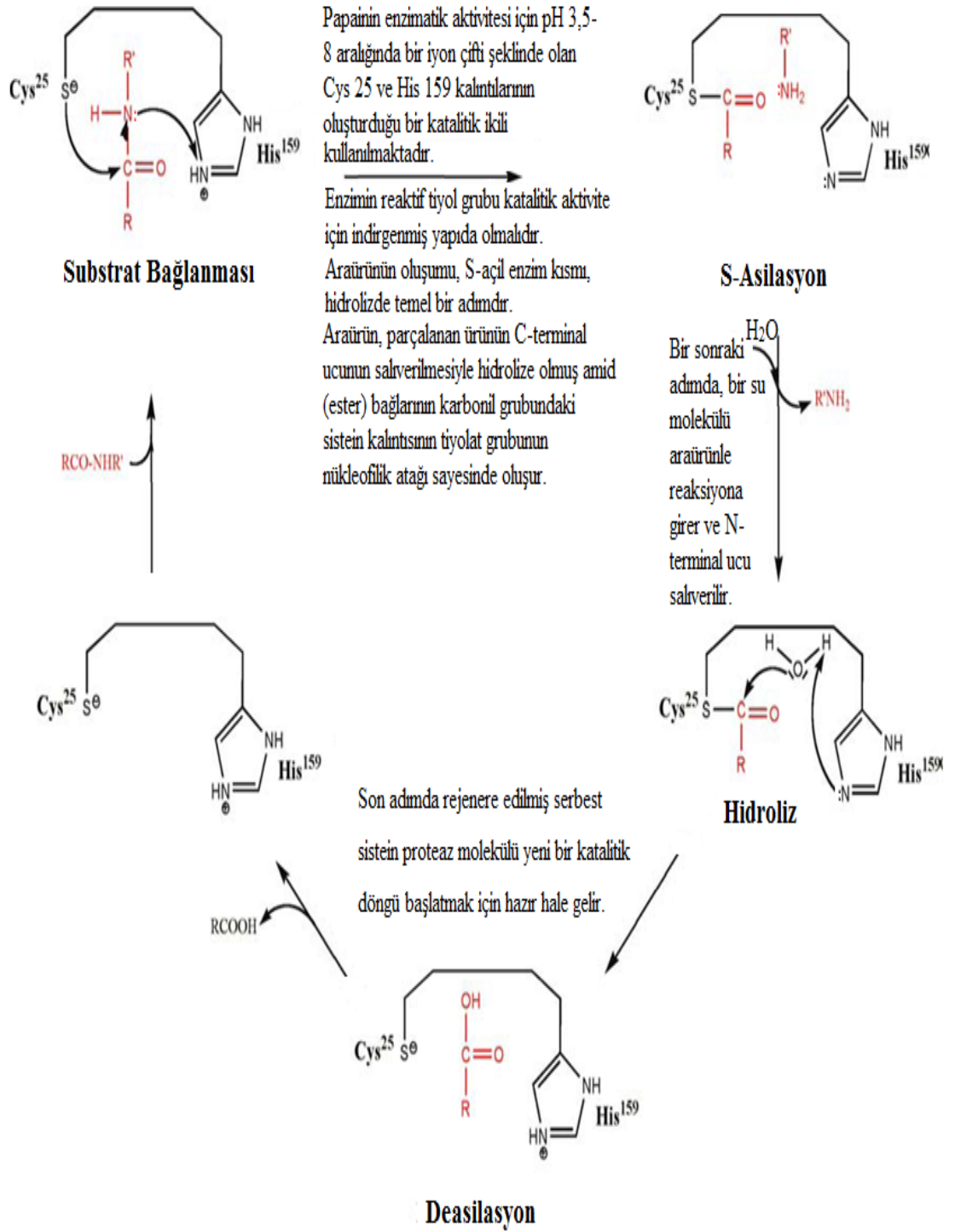
Şekil 2.7 Serin proteazın inhibisyon reaksiyonu (Garett ve Grisham 2010)

2.3.2 Aspartik proteazın katalitik mekanizması



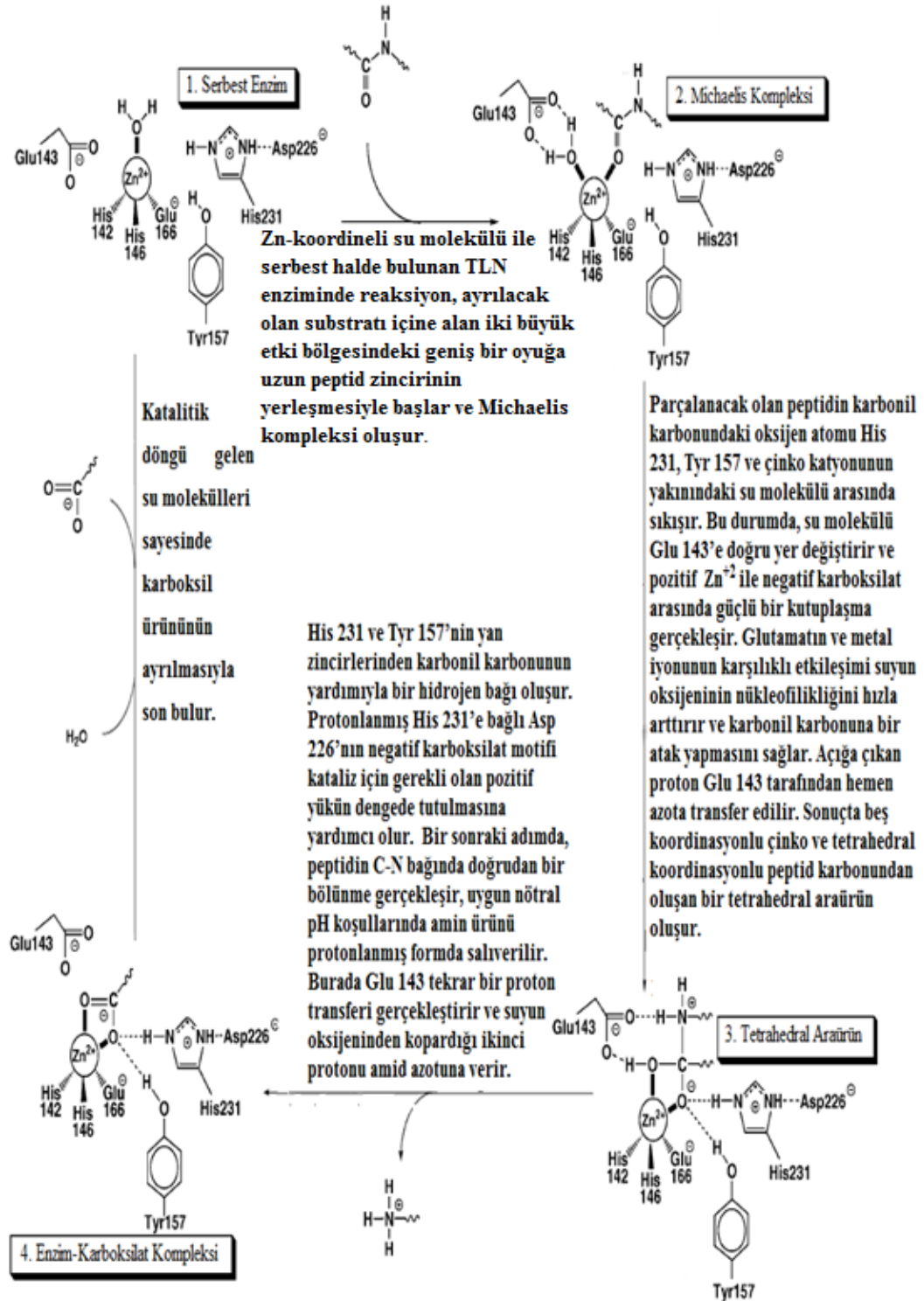
Şekil 2.8 Aspartik Proteaz için önerilen en yaygın katalitik mekanizma (Garett ve Grisham 2010)

2.3.3 Sistein proteazın katalitik mekanizması



Şekil 2.9 Papainin katalitik etki mekanizması (Polaina ve MacCabe 2007)

2.3.4 Metallo proteazın katalitik mekanizması

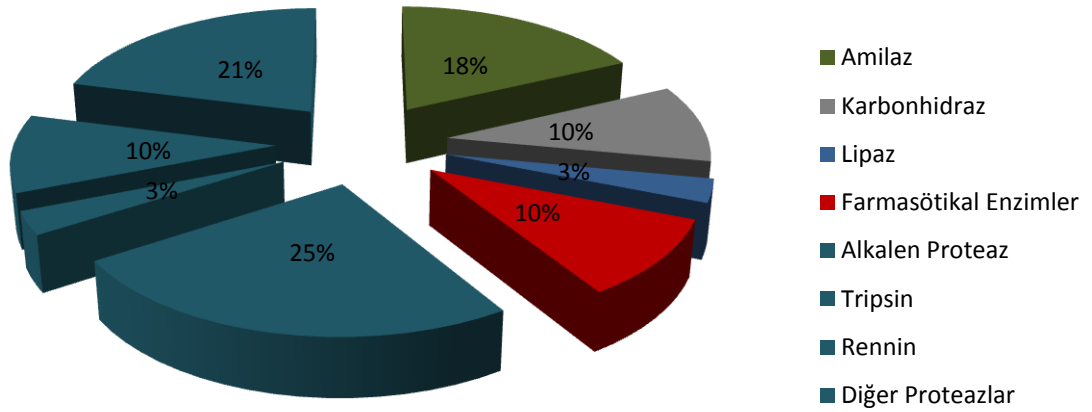


Şekil 2.10 En çok çalışılan metallo proteaz enzimlerden biri olan TLN'nin katalitik etki mekanizması (Pelmenschikov vd. 2001)

2.4 Proteaz Enziminin Kullanım Alanları

Dünya çapında endüstriyel enzimlerin satış değerinin 1 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir. Tüm proteolitik enzimler; sıcaklık, pH, iyon gerekliliği, spesifiklik, aktivite ve stabiliteye göre karakteristik özelliklere sahiptir. Bu biyokimyasal parametreler; üretim, geliştirme, pazarlama ve uygulamanın ekonomik maliyetlerinin dâhil olduğu faktörler haricinde proteazın endüstride kullanımını belirler. Lipaz, karbonhidraz ve proteazlarında içinde bulunduğu hidrolitik enzimler, toplam enzim satışlarının %75'ini oluşturur. Proteazlar en büyük üç endüstriyel enzim grubunda ilk sırada yer alır ve dünya çapındaki toplam enzim satışlarının yaklaşık %59'unu oluşturmaktadır (Şekil 2.11) (Mahajan ve Badgujar 2010).

Endüstriyel enzimlerin satış yüzdeleri



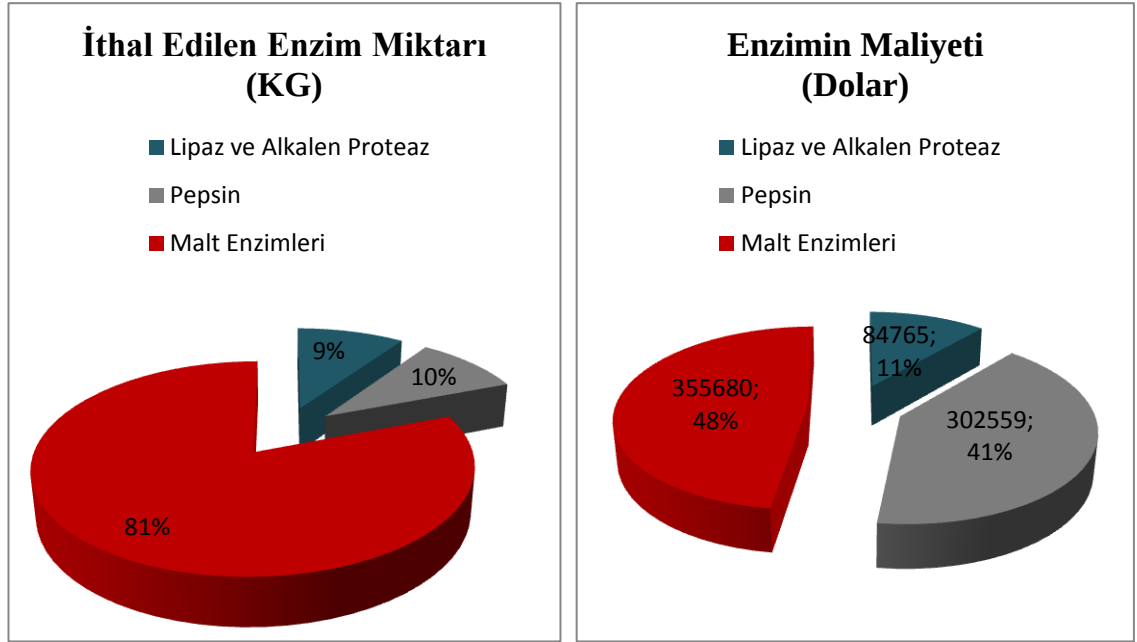
Şekil 2.11 Dünya çapındaki toplam endüstriyel enzim satışlarının yüzdesel dağılımı (Mahajan ve Badgujar 2010)

Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre ülkemizde de 2010 yılında ithal edilen bazı enzimlerin dağılımı çizelge 2.4'te ve şekil 2.12'de verilmiştir. Bu verilerden de görüldüğü gibi proteaz enzimi, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de en önemli endüstriyel enzimlerden biridir

Çizelge 2.4 Ülkemiz 2010 yılı bazı enzim ithalat değerleri

Enzim	İthal Edilen Enzim Miktarı (KG)	Enzimin Maliyeti (Dolar)
Lipaz ve Alkalın Proteaz*	2774	84765
Pepsin*	2775	302559
Malt Enzimleri	23400	355680

*Proteaz enzimleri



Şekil 2.12 Ülkemiz 2010 yılı bazı enzim ithalat değerlerinin yüzdesel dağılımı

Proteaz enziminden endüstride; deterjan, kozmetik, ilaç, çeşitli klinik uygulamalar, D,L amino asitlerin sentezi, gümüş eldesi, atık işleme, yem üretimi, gıda, deri, tekstil gibi bir çok kategoride yararlanılmaktadır (Gupta vd., 2002, Çelik 2006, Öztürk 2007).

Proteazların endüstriyel uygulamaları, hangi proteazın kullanıldığı, ne amaçla kullanıldığı ve bu bilgilerin kaynakları çizelge 2.5’de toplu bir şekilde verilmiştir.

Çizelge 2.5 Endüstride proteaz

Endüstri	Enzim	Kullanılma Nedeni	Kaynak
Deterjan Endüstrisi			
Çamaşır Deterjanları	Subtilisin	Daha düşük sıcaklıklarda ve daha düşük sürelerde temizliğin sağlanmasında	Sevinç 2010
Bulaşık Deterjanları	Subtilisin	Protein bazlı lekelerin çıkarılmasında	Özçömlekçi 2006
Kozmetik Sanayi			
Cilt Bakım Ürünlerinde	Papain Bromelain	Hassas cilt soyma etkisi sağlanmasında	Polaina ve MacCabe 2007
İstenmeyen Tüylerin Uzaklaştırılması	Proteaz	İstenmeyen tüylerin uzaklaştırılmasında	Kasavi 2006
Saç Bakım Ürünlerinde	Proteaz	Saç bakım ürünlerinde kullanılan kolajenoz hidrolizat ve elastin maddeleri sığır tendonlarının proteolitik hidrolizinde	Sevinç 2010
Kontak Lens Solüsyonlarında	Deniz Solucanlarından Elde Edilen Proteazlar	Kontak lenslerin düşük sıcaklıklarda temizlenmesinde	Özçömlekçi 2006
İlaç ve Klinik Sanayi			
Yapay Tatlandırıcılar	Termolisin	Aspartamın enzimatik sentezinde	Kerimak 2008
Sindirime Yardımcı	Proteaz	Sindirim sistemini desteklemek için üretilen ilaçlarda	Kerimak 2008
Şeker Hastalığı	Tripsin	İnsan insülini üretiminde	Mahajan ve Badgujar 2010
Ağrı Tedavisinde	Kimopapain	Belirli ağrı tiplerinin tedavisinde	Mahajan ve Badgujar 2010
Farmasötikal	Tripsin	Kan pıhtılarının çözülmesinde ve ölü dokuların uzaklaştırılmasında	Mahajan ve Badgujar 2010
Yara ve yanık Tedavisinde	Subtilisin Kollegenaz	Yanık ve yara tedavisinde, antibiyotiklerin geniş bir aralıkta kullanımıyla kombine edilerek kullanılmakta	Kerimak 2008

Çizelge 2.5 Endüstride proteaz (devamı)

Adli Tıpta	Proteaz	Uyuşturucu maddelerin ara ürünleri vücuttaki proteinleri bağladıkları için, kan ve doku örneklerine proteaz enzimi uygulanarak proteinlerin yıkılmasını sağlayarak uyuşturucu maddelerin açığa çıkarılmasında	Kasavi 2006
Gıda Sanayi			
Süt Endüstrisinde	Kimozin	Peynir yapımı için sütün pıhtılaştırılmasında	Kerimak 2008
Fırıncılıkta	Mantarlardan elde edilen asidik proteazlar	Bisküvi ve kurabiyelerin gevrekleştirilmesinde ve aroma katmak için	Çelik 2006
Fırıncılıkta	Proteaz	Ürünlerin raf ömrünün uzatılmasında	Çelik 2006
Soya Hidrolizatları	Mantar alkalın ve nötral proteazları	Soya sosu ve soya ürünleri eldesinde	Mahajan ve Badgujar 2010
Etin Yumuşatılması	Papain	Etin gevşekleştirilmesinde	Mahajan ve Badgujar 2010
Etin İşlenmesi	Alkalın Proteazlar	Bağ dokuya ve kemiklere bağlı olarak kalan küçük et parçalarının alınmasında	Mahajan ve Badgujar 2010
Yağ Eldesinde	Proteaz	Nijerya kavun çekirdeğinden yağ eldesinde	Çelik 2006
Deri Sanayi			
Arındırma	Metallo Proteaz	Kıl ve tüylerden derinin arındırılmasında	Polaina ve MacCabe 2007
Tekstil Sanayi			
Yün Esaslı Ürünlerde	Papain, Pronaz Pepsin	Liflerin esnekliğinin sağlanması, doğal kirlerden arındırılması ve daha beyaz bir renk elde edilmesinde	Sevinç 2010
İpek Esaslı Ürünler	Pepsin, Tripsin Papain	İpeğin parlaklığını ve kayganlığını engelleyen “Serisin” maddesinin uzaklaştırılmasında	Duman 2008
Diğer Sanayi Dalları			
Kimya Sanayi	Proteaz	Peptid sentezinde	Bulut 2007

Çizelge 2.5 Endüstride proteaz (devamı)

Atıkların İşlenmesi	Proteaz	Gıda endüstrisinden gelen ve evlerden çıkan atıkların işlenmesinde; ayrıca, doğada atık olarak bulunan boynuz, kıl, tırnak ve saç gibi lifli proteinlerin yararlı biyokütle haline dönüştürülmesinde	Gheorghiu Alpan 2008
Gümüş Eldesi	Alkalın Proteaz	X-ışını filmleri ya da fotoğraf filmlerinden gümüş eldesinde	Taşdelen 2006
Yem Sanayi	<i>B. subtilis</i> 'ten Üretilen Alkalın Proteazların	Kümes hayvanlarının kesim yerlerindeki tüy atıklarının işlenerek kümes hayvanları için yem üretiminde	Öztürk 2004
D,L Amino Asitlerin Sentezi	<i>C. coronatus</i> Kültüründen Saflaştırılan Proteaz	D,L-fenil alanin ve D,L-fenil glisin'i rasemik karışımların çözülmesinde	Özçömlekçi 2006
Bira Yapımı	Alkalın Proteaz	Bira kalitesinin artırılmasında	Taşdelen 2006

2.5 Proteaz Kaynakları

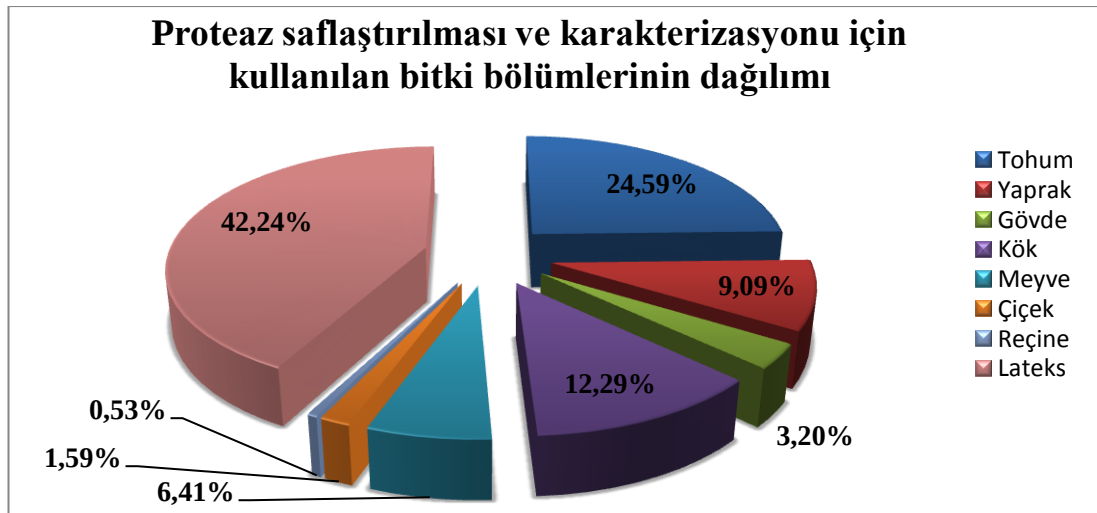
Proteazlar biyolojik kaynakların her bir parçasına dağılmıştır. Bundan dolayı, proteazlar sindirim enzimlerinin bir numaralı alt türüne aittir. Bitki alemi, %43,85 proteaz bulundurmasıyla en yüksek sınıfı oluşturur. Bitkileri; %18,9'la bakteriler, %15,08'le mantarlar, %11,15'le hayvanlar, %7,42'le algler ve %4,41'le virüsler takip eder. Saflaştırılan proteazlar; biyolojik kökeninin hayvan, bitki ya da mikrobiyal olmasına bakılmaksızın sadece %67-27 paya sahipken geri kalan proteazlarla çok çalışılmamıştır. Sistein proteazlar bitkilerde çok miktarda bulunmaktadır (%34,92). Mikrobiyal organizmaların büyük miktarlarda serin (%13,21) ve aspartik (%8,81) proteaz salgılama yeteneği vardır. Son zamanlarda yayınlarda, mikrobiyal kaynakların glutamik asit proteaz salgıladığı bildirilmiştir. Serin, sistein ve aspartik proteazlar hayvanlarda genelde bulunmaktadır. Şekil 2.13'de proteazın biyolojik kaynaklarda dağılımı gösterilmiştir (Mahajan ve Badgujar 2010).



Şekil 2.13 Proteazın biyolojik kaynaklarda dağılımı (Mahajan ve Badgujar 2010)

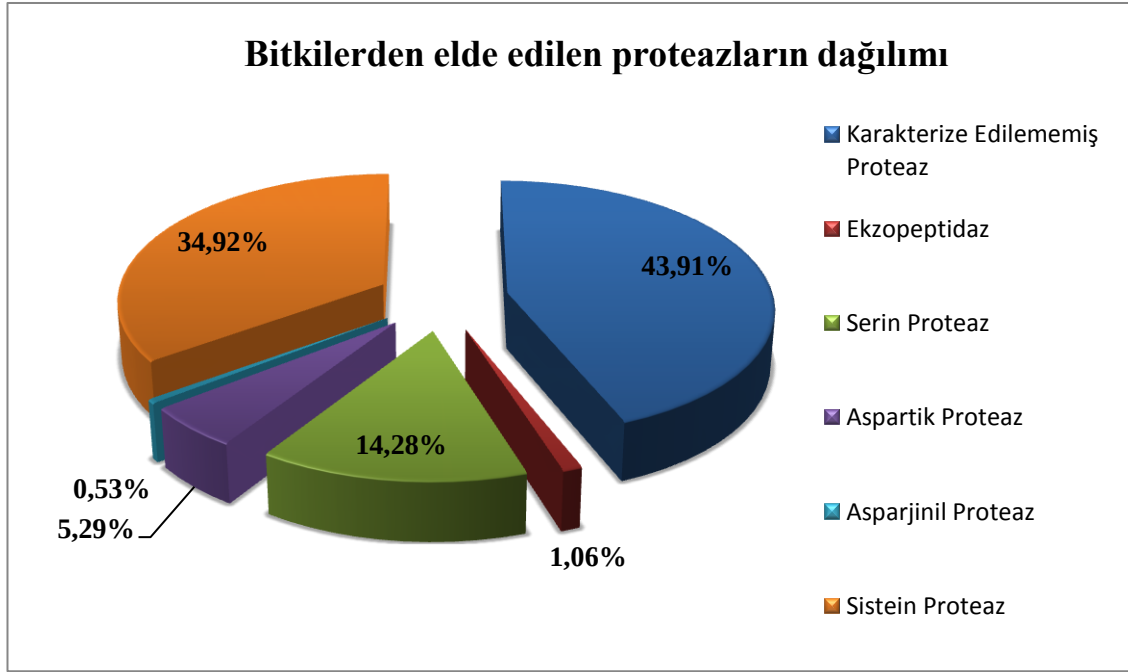
2.5.1 Bitkilerden elde edilen proteazlar

Bitkilerdeki proteazlar bitkilerin neredeyse her yerinde bulunmaktadır; kök, gövde, yaprak, çiçek, meyve, tohum, lateks ve reçine (Şekil 2.14). Bitki lateksleri zengin bir proteaz kaynağıdır. Yaklaşık %43,91 bitki proteazı tam olarak karakterize edilmemiştir. Bitkilerde genellikle sistein ve serin endoproteazlar bulunmaktadır. Bitkilerde, aspartik proteazlar ve aminopeptidazlar nadiren bulunmaktadır (Mahajan ve Badgujar 2010).



Şekil 2.14 Proteaz saflaştırılması ve karakterizasyonu için kullanılan bitki bölümlerinin dağılımı (Mahajan ve Badgujar 2010)

Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanılması, ekim için arazinin kullanılabilir olması ve büyüme için iklim koşullarının uygun olması gibi birkaç faktör tarafından belirlenir. Ayrıca, bitkilerden proteaz üretimi zaman alıcı bir süreçtir. Papain, bromelain, keratinaz ve ficin, bitki kökenli tanınmış proteazların bir kısmını temsil eder (Rao vd.1998).

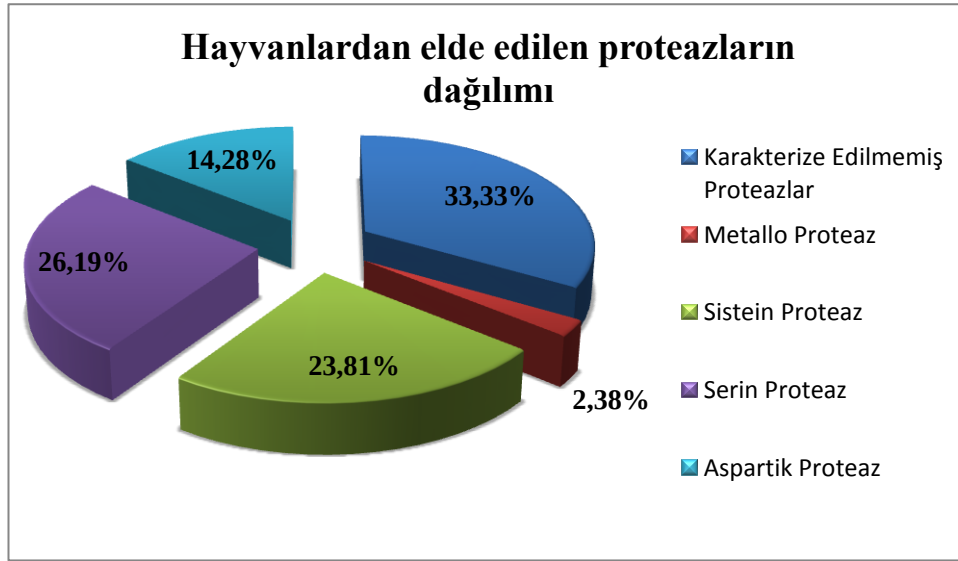


Şekil 2.15 Bitkilerden elde edilen proteazların dağılımı (Mahajan ve Badgujar 2010).

Papain geleneksel bir bitki proteazıdır ve uzun bir kullanım geçmişine sahiptir. Bu enzim, subtropikal bölgelerin batısında ve orta Afrika-Hindistan'da yetişen *Carica Papaya* bitkilerinin lateksinden elde edilir. Enzimin performansı; bitki kaynağına, büyüme için gerekli olan iklim koşullarına, enzimin elde edilmesi ve saflaştırılması için kullanılan yöntemlere bağlıdır (Mahajan ve Badgujar 2010). Başka bir bitkisel proteaz bromelaindir. Bromelain, ananasın kökünden ve suyundan hazırlanır. Saçın parçalanmasını da sağlayan keratinaz, bitkilerin bazı botanik grupları tarafından üretilen bir proteazdır. Saç ve yünlerin parçalanması, lizin gibi esansiyel amino asitlerin üretilmesi ve atık su sistemlerinin tıkanmasını önlemek için önemlidir (Rao vd.1998).

2.5.2 Hayvanlardan elde edilen proteazlar

Hayvansal kaynaklı bilinen en yaygın proteazlar pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve rennindir. Bu proteazlar toplu miktarlarda saf bir şekilde hazırlanırlar. Ancak, bu enzimlerin üretimi kesilecek hayvanın kullanılabilirliğine bağlıdır ve bu kullanılabilirlik durumu sırasıyla siyasi politikalar ve tarım politikaları tarafından belirlenir (Mahajan ve Badgular 2010).



Şekil 2.16 Hayvanlardan elde edilen proteazların dağılımı (Mahajan ve Badgular 2010)

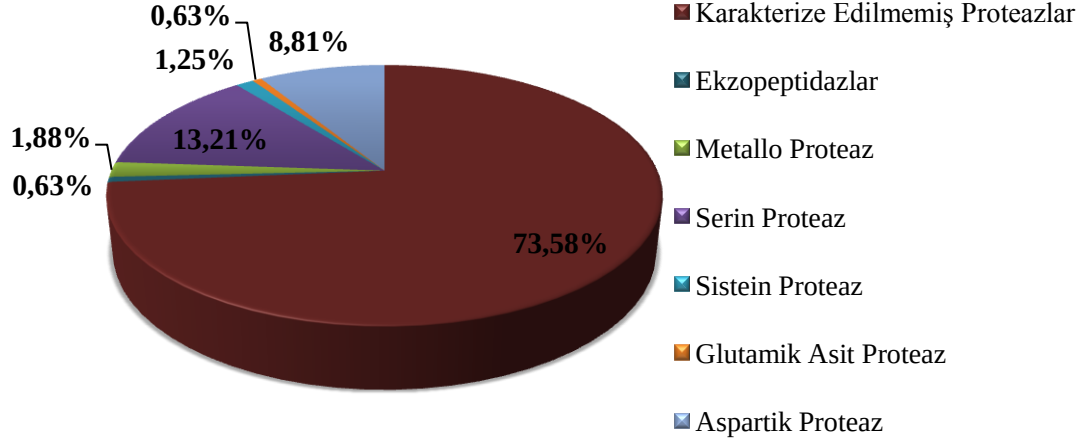
Tripsin üç temel sindirim proteazından biridir. Sindirim sürecinde; tripsinle birlikte diğer proteinazlar diyetle alınan protein moleküllerini, peptid ve amino asit bileşenlerine parçalarlar. Tripsin; (midede başlayan) sindirim işlemine, hafif alkalın ortamıyla maksimum enzim aktivitesinin gösterilmesini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

benzer. Rennin, tüm emziren memelilerin midelerinde inaktif prekürsörü olan prorennin şeklinde üretilen, pepsin benzeri bir proteazdır (Mahajan ve Badgujar 2010).

2.5.3 Mikrobiyal kaynaklı proteazlar

Günümüzde en çok kullanılan proteaz kaynağı, bakteri, fungus ve virus orijinli olan mikrobiyal proteazlardır. Mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamalar için hemen hemen tüm özelliklerinin istenen yönde değiştirilebilmesi, bitki ve hayvansal proteazlara göre daha saf elde edilebilmesi ve mikroorganizmaların uygun bir kültür ortamında üretilmesi mümkün olduğundan mikrobiyal kaynaklı proteazlar bitki ve hayvan kaynaklı proteazlara göre daha çok tercih edilmektedirler (Sevinç 2010). Bunların yanı sıra günümüzde hayvanlardan insanlara geçen bazı hastalıkların basında yoğun bir şekilde yer almasından dolayı (SARS, deli dana, kuş gribi vs.), hayvansal proteazların özellikle gıda maddesi yapımında kullanımı konusunda kuşkular artmıştır ve bu gelişme araştırmacıları yeni proteaz kaynakları aramaya sevk etmiştir (Duran 2006, Sarıkaya 2006). Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanılmasında ise; ekim için arazinin kullanılabilir olması, büyüme için iklim koşullarının uygun olması, bitkilerden proteaz üretimi zaman alıcı bir süreç olması gibi dezavantajlar mevcuttur (Rao vd.1998). Bitkisel ve hayvansal kaynakların bu gibi dezavantajlarından dolayı ve dünyanın mevcut taleplerini karşılamak için bitki ve hayvan proteazlarının yetersizliğinden dolayı mikrobiyal proteazlara olan ilgi artmıştır. Mikrobiyal kaynaklı proteazlar, bu kaynakların biyoteknolojik uygulamalar için istenilen hemen hemen tüm özellikleri karşılamasından dolayı bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere tercih edilmektedir (Rao vd.1998, Mahajan ve Badgujar 2010). Dünya çapında enzim satışlarının yaklaşık %40'ını mikrobiyal kaynaklı proteazlar oluşturmaktadır.

Mikrobiyal kaynaklı proteazların dağılımı



Şekil 2.17 Mikrobiyal kaynaklı proteazların dağılımı (Mahajan ve Badgujar 2010)

Mantarlar geniş bir çeşitlilikte, geniş bir pH aralığında ve yüksek substrat spesifikliğinde proteazlar üretirler. Örneğin; *Aspergillus oryzae* asidik, nötral ve alkalın proteaz üretir. Ancak mantarlardan elde edilen enzimler, bakteriyel enzimlere göre daha düşük bir reaksiyon hızına ve daha kötü ısı toleransına sahiptirler. Viral proteazlar; virüslerin proteinlerinin işlenmesinde fonksiyonel tutulmalarının AIDS ve kanser gibi bazı ölümcül hastalıklara neden olmasından dolayı önem kazanmıştır. Serin, aspartik ve sistein peptidazlar çeşitli virüsler bulunmuştur. Virüsler tarafından kodlanan bütün peptidazlar endopeptidazdır; bunların hiçbirisi metallopeptidaz değildir. Çoğu ticari proteazlar, özellikle nötral ve alkalın, *Bacillus* cinsine ait organizmalar tarafından üretilir (Rao vd.1998).

Endüstri alanında kullanılan, 10'dan fazla mikrobiyal enzimin, *Bacillus* cinsine ait türler tarafından sentezlendiği bilinmektedir. Enzim üretimi çalışmalarında kullanılan, bu bakterilerde birçok önemli özellik saptanmıştır. Örneğin, büyük bir bölümü kemoorganotrof olduğu için besin istekleri azdır, kolayca kültüre alınabilirler ve yapılarında heterojenlik yoktur (Temiz 2007). *Bacillus* türü mikroorganizmalar endüstriyel olarak kullanılan hemen hemen bütün enzim tiplerini üretebildiklerinden oldukça önemlidirler. Özellikle yüksek sıcaklık ve pH'larda üreyebilen bir *Bacillus*

soyunun üreteceği proteaz enzimleri, deterjanlara katkı maddesi olarak eklenmekte ve sıcak su ile daha etkin temizlik sağlayacak yıkama imkanı verebilmektedir. Biyoteknolojide uygulama olanağı bulacağı düşüncesi termofilik enzimlere olan ilgiyi arttırmıştır. Dolayısıyla tekstil ve deterjan endüstrisinde özellikle termofilik ve alkalifilik mikroorganizmaların ürettiği amilaz ve proteaz üreticisi *Bacillus* türlerinin taranmasına, saflaştırılmasına ve tanımlanmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Ayrıca düşük sıcaklıklarda yüksek aktiviteli proteaz ve amilaz üretebilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması ve enzimlerinin deterjan katkı maddesi olarak kullanılması, yüksek enerji sarfiyatını engelleyeceğinden günümüzde oldukça önem kazanmıştır.

Bacillus; ‘*Bacillaceae*’ familyası içerisindeki iki ana alt gruptan biridir. *Bacillus* grubu içerisinde 50 geçerli tür mevcuttur. Burada en iyi bilinen türler ise *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. sphaericus* ve *B. thuringiensis*’tir. Bunların rRNA dizilişlerine bakılarak üç tür *Bacillus* ana grubu belirlenmiştir. Bunlar; “*B. subtilis*” grubu, “*B. cereus*” grubu ve “*B. circulans*” grubudur. *Bacillus* türlerinin çoğu tabiatta saprofit olarak bulunmaktadır. *Bacillus* türleri tabiatta çürüten organik materyallerde, toz, toprak, yeşil sebzelerde, suda ve bazı türleri de normal vücut florasında bulunmaktadır. Bazı türler, insanlarda, hayvanlarda, diğer memelilerde ve böceklerde zorunlu patojen veya fırsatçı enfeksiyon etkenidirler. *Bacillus*’lar arasında *B. anthracis* ve *B. cereus* insan ve hayvanlarda enfeksiyon oluşturmaları açısından en önemli türlerdir. Bunların dışında kalan *Bacillus* türleri insanlarda veya hayvanlarda nadiren enfeksiyon etkenidirler (Sevinç 2010).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Laboratuvar ekipmanları

UV Spektrofotometre: Shimadzu (UV-1700 Pharmaspec)

Santrifüj: Beckman Coulter Allegra 64R

Çalkalamalı su banyosu: Clifton

Çalkalamalı inkübatör: Shel Lab

Hassas tartı: Denver Instrument

pH metre: Hanna pH300

Manyetik karıştırıcı: Chiltern HS31

Otoklav: Alp

Etüv: Memmert

İnkübatör: Salvis Lab

Vorteks karıştırıcı: Fisons

Elektroforez: Bio-Rad Protean IIXi Cell

Kromatografi cihazı: Pharmacia Biopilot FPLC

3.1.2 Kullanılan kimyasallar

Bakteriyel hücre kültürasyonunda kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup Merck (Darmstadt, Almanya)’den sağlanmıştır. Enzim saflaştırılmasında kullanılan Q Sepharose, Sepharose 4B-bacitracin ve Superdex 75 kolon dolgu maddeleri Sigma Chemical Ltd. (St Louis, ABD)’den alınmıştır. Çalışmada kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Merck, Fluka, Riedel-de Haën, Birpa ve Sigma Chemical Ltd’den temin edilmiştir.

3.1.3 Mikroorganizma

Çalışmada kullanılan *Bacillus circulans* M34 bakterisi Ankara ilinin Ahlatlıbel semtinden alınan topraktan, (pH 8,33) Miraç Yılmaz tarafından doktora çalışması kapsamında izole edilmiştir. Topraktan izole edilen izolatin teşhisinde çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal testlerden yararlanılmıştır. Öncelikli olarak izolatin morfolojisi, spor oluşturma durumu, gram boyamaya karşı reaksiyonuna bakılarak mikroskopik incelemeleri gerçekleştirilmiş ve katalaz reaksiyonu sonucuna göre *Bacillus* cinsine ait olduğu saptanmıştır. *Bacillus circulans* M34 bakterisinin 5 °C ve 65 °C’de gelişim göstermediği saptanmıştır. Bunun yanı sıra bakterinin; nişasta hidrolizini gerçekleştiremediği ve %10 NaCl varlığında gelişemediği tespit edilmiştir. Aynı zamanda bakterinin 6,5±0,7’lik zon çapıyla iyi bir proteolitik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Yılmaz 2003).

3.2 Yöntem

3.2.1 *Bacillus circulans* M34’den proteaz enziminin üretimi ve kısmi saflaştırılması

Alkalın proteaz üretimi için aşı kültür hazırlanmasında ve fermentasyonda literatürde tanımlanan nutrient broth kültür ortamı kullanılmıştır (Olajuyigbe ve Ajele 2008). Nutrient broth’un bileşimi; 3g et ekstraktı ve 5g pepton içermektedir.

Kültür ortamı distile suda çözüldükten sonra 121 °C’de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir.

Aşı kültürü için suşun nutrient agardaki stok kültüründen nutrient brotha ilk ekim yapılmış ve 24 saat 37 °C’de inkübe edilmiştir. Proteaz üretimi için 500 ml’lik erlenlere 100 ml besiyeri içerecek şekilde hazırlanan kültür ortamına 1ml aşı kültürü ilave edilmiş ve 37 °C’de 150 rpm’de 24 saat inkübe edilmiştir (Venugopal ve Saramma 2008).

Fermentasyon sonrasında *Bacillus circulans* M34’ün hücre izolatları 11000 rpm’de 20 dakika süreyle +4 °C’de santrifüjlenerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Üst faza; %30

konsantrasyona ulaşıncaya kadar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilave edilmiş ve magnetik karıştırıcı üzerinde bir saati aşkın karıştırılmıştır. Daha sonra 15000 rpm’de 15 dakika sũre ile +4 °C’de santrifũjlenmiř ve ũst faz alınmıştır. ũst faza, %80 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsantrasyonuna ulaşılıncaya kadar buz banyosu içerisinde ve magnetik karıştırıcı ile dũřũk devirde sũrekli karıştırılarak yavaş yavaş $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilave edilmiştir. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilavesi sırasında kũpũk oluşmamasına ve tuz tamamen ũzũnmeden ikinci bir ilave yapılmamasına dikkat edilmiştir. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilavesi tamamlandıktan sonra sıvı +4 °C’de gece boyu bekletilmiştir. Bekletilen sıvı 15000 rpm’de 15 dakika sũre ile +4 °C’de santrifũjlenmiř ve ũkelek çok az miktarda 50 mM pH10.5 glisin-NaOH tamponunda ũzũlerek toplanmıştır. Bũylece fermentasyon sıvısındaki enzimler %30-80 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile ũktũrũlmũřtũr. Toplanan sıvı +4 °C’de gece boyu aynı tampona karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz tamponu her 4 saatte bir değiştirilmiştir. Diyalizle örnekteki istenmeyen proteinler ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ uzaklaştırılarak kısmi saflaştırma yapılmıştır (Reddy vd.2008).

3.2.1.1 *Bacillus circulans* M34’den kısmi saflaştırılan proteaz enziminin Q Sepharose anyon değiştirici kolona yũklenmesi

Elde edilen örnek önceden 50 mM pH10.5 glisin- NaOH tamponuyla dengelenmiş Q Sepharose anyon değiştirici kolona yũklenerek 50 mM pH10.5 glisin-NaOH tamponuyla elũe edilmiştir. Bir sonraki adımda kolona 1M NaCl eşliğinde lineer gradient uygulanmış ve bağlanan fraksiyonlar toplanmıştır. rnek 3 ml/dak akış hızında 1,5 dakika arayla superfrac’da 4,5 ml’lik fraksiyonlar halinde toplanmıştır. 280 ve 260 nm’de fraksiyonlar tek tek değerlendirilmiştir. Enzim aktivitesi grũlen fraksiyonlar toplanmış ve karakterizasyon çalışmaları için kullanılmıştır (Beg ve Gupta 2003).

3.2.1.2 Afinite Kromatografisi için kolon dolgu maddesinin hazırlanması ve ligandın bağlanması

Afinite Kromatografisi için kolon dolgu maddesinin hazırlanması ve ligandın bağlanması için aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır.

I. 1 gram CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B kolon dolgu maddesi 5 ml 0,5M NaCl içeren 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,3) tamponunda çözülmüştür.

II. Karışım bir buchner hunisine aktarılmış ve ligand olan bacitracin (1 g kolon dolgu maddesi için 150 mg ligand kullanılmıştır) ilave edilmiştir (Paoletti vd.2001).

III. Karışım 1mM'lık HCl ile bir falkon tüpüne alınarak oda sıcaklığında bir saat hafifçe karıştırılmıştır. Karıştırma sırasında manyetik karıştırıcıların kullanılmamasına özen gösterilmiştir.

IV. Daha sonra karışım oluşan hacmin 5 katı kadar 0,5 M NaCl içeren 0,1 M NaHCO₃ (pH) 8,3 tamponuyla yıkanmıştır.

V. Kalan aktif uçları bloklamak için karışım iki saat pH 8'de 0,1 M Tris-HCl tamponu içinde bekletilmiştir.

VI. Son olarak karışım 0,5 M NaCl içeren pH 8'de 0,1 M Tris-HCl tamponuyla yıkanmış ve ardından 0,5 M NaCl içeren 0,1 M asetat tamponuyla (pH 4) muamele edilmiştir.

3.2.1.3 *Bacillus circulans* M34'den kısmi saflaştırılan proteaz enziminin CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B- bacitracin afinite kolonuna yüklenmesi

Örnek; kolonla aynı şartlara getirilmek için 1:1 oranında (v:v) 4.5 M NaCl içeren 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponuyla karıştırılmış ve aynı tamponla önceden dengelenmiş olan CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B-bacitracin afinite kolonuna yüklenmiştir. Kolona bağlanmayan maddeler; kolon hacminin 20 katı kadar 5 M NaCl içeren 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponuyla elue edilmiştir. Kolona bağlanan proteaz enzimi ise kolon hacminin 6 katı kadar 3.75 M NaCl ve %15 etanol içeren 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponuyla elue edilmiştir. Toplanan fraksiyonların aktivitesi ve Warburg-Christian metoduyla (280-260 nm'de) protein içeriği analiz edilmiştir. Afinite kromatografisinde verim ve saflaştırma katsayısı için gerekli olan protein miktarı Warburg-Christian metodu ile belirlenen verilere göre hesaplanmıştır (Studdert vd.2001).

3.2.1.4 Proteaz aktivitesinin belirlenmesi

Alkalın proteaz aktivitesi Venugopal ve Saramma (2008), tarafından tanımlanan kazeinin substrat olarak kullanıldığı yöntemin modifiye edilmesi ile belirlenmiştir.

50 µl enzim çözeltisi 3 ml 50 mM pH 10.5 Glisin-NaOH tampon çözeltisinde hazırlanmış %0.6'lık kazein çözeltisi ile karıştırılmış ve reaksiyon çözeltisi 30 dakika süre ile 40 °C'da inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 Glisin-NaOH tampon çözeltisi ilave edilen reaksiyon karışımı kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda reaksiyon karışımlarına 3 ml trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi ilave edilerek reaksiyon durdurulmuş ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre bitiminde reaksiyon karışımı 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve üst fazdan 0.5 ml alınmıştır. 0.5 ml'lik üst fazın üzerine 2.5 ml 0.5 M Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilmiştir. İyice karıştırılan reaksiyon karışımının üzerine 0.5 ml %50'lik (v/v) Folin-Ciocalteu reaktifi eklenerek karışım 35 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminde örneklerin absorbansı 660 nm'de köre karşı ölçülmüştür. Enzim aktivitesi önceden oluşturulmuş tirozin standart grafiğinin eğimi kullanılarak aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Proteaz Aktivitesi (U ml}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{A}_{660}/\text{Eğim}) \times \text{Toplam Hacim}}{\text{Enzim Hacmi} \times \text{İnkübasyon Süresi}} \times \text{Seyrelme Faktörü}$$

Bir ünite proteaz aktivitesi, 40 °C'de, pH 10.5'da gerçekleşen hidroliz reaksiyonunda %0.6 kazeinden 1 µg/dak tirozin oluşturan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir.

3.2.1.5 Tirozin standart grafiğinin hazırlanması

Alkalın proteaz aktivitesi hesaplamasında kullanılacak olan tirozin standart grafiğinin oluşturulması için 50 mM pH10.5 Glisin-NaOH tampon ile 1 mg/ml tirozin çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözeltide çizelge 3.1'de gösterildiği hacimlerde alınıp

üzerine 2.5 ml 0.5 M Na₂CO₃ ve 0.5 ml %50'lik folin reaktifi ilave edilmiştir. Karışım, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiş ve bu sürenin sonunda spektrofotometrede 660 nm'de absorbans değerleri okunmuştur (Kör olarak 0 µg/ml tirozin içeren 50 mM pH 10,5 glisin-NaOH tamponu kullanılmıştır). Tirozin miktarına bağlı olarak 660 nm'deki absorbans değerinde meydana gelen değişimi gösteren tirozin standart grafiği çizilmiştir. Çizilen standart doğrunun (Ek 1) eğimi belirlenerek alkalın proteaz aktivitesi hesabında kullanılmıştır (Takami vd.1989).

Çizelge 3.1 Tirozin standart grafiğinin hazırlanması

Test Örneği	1 mg/ml'lik Tirozin Çözeltilisinden Alınan hacimler (µl)	50mM pH10.5 Glisin-NaOH Tamponu (µl)	0.5 M Na ₂ CO ₃ (ml)	%50'lik Folin Reaktifi (µl)
Kör (0 µg/ml Tirozin)	0	1000	2,5	500
10 µg/ml Tirozin	10	990	2,5	500
20 µg/ml Tirozin	20	980	2,5	500
30 µg/ml Tirozin	30	970	2,5	500
40 µg/ml Tirozin	40	960	2,5	500
50 µg/ml Tirozin	50	950	2,5	500

3.2.1.6 Protein miktarının belirlenmesi

Protein miktarı bilinmeyen enzim örneğinden 150 µl temiz bir tüpe alınmış ve distile su ile 2,4 ml'ye tamamlanmıştır. 1/16 seyreltilmiş enzim örneğinin üzerine 600 µl Coomassie Blue reaktifi eklenmiş ve 2,5 dakika sonra Spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerinden, önceden çizilmiş protein standart grafiğinin eğimi kullanılarak aşağıdaki formül yardımıyla protein miktarı hesaplanmıştır. Protein miktarının belirlenmesinde kullanılan grafik Ek 1'de verilmiştir (Yapaşan 2008).

$$(A_{595}/\text{Eğim}) \times \text{Seyrelme Faktörü}$$

$$\text{Protein Miktarı (mg ml}^{-1}\text{)} = \frac{\text{---}}{1000}$$

3.2.1.7 Protein standart grafiğinin hazırlanması

Protein miktarının hesaplamasında kullanılacak olan protein standart grafiğinin oluşturulması için 0,2 mg/ml BSA çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözeltiden çizelge 3.2’de gösterildiği hacimlerde alınıp distile su ile 2,4 ml’ye tamamlanmış ve 0.6 ml Coomassie Blue reaktifi ilave edilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında 2,5 dakika beklenmiş ve bu sürenin sonunda spektrofotometrede 595 nm’de absorbans değerleri okunmuştur (Kör olarak mg/ml BSA çözeltisi içeren örnek kullanılmıştır). Çizilen standart doğrunun (Ek 1) eğimi belirlenerek protein miktarının hesaplanmasında kullanılmıştır (Yapaşan 2008).

Çizelge 3.2 Protein standart grafiğinin hazırlanması

Test Örneği	0,2 mg/ml’lik BSA (µl)	Distile Su Hacmi (µl)	Coomassie Blue Reaktifi (µl)
Kör (0 µg/ml BSA)	0	2400	600
1 µg/ml BSA	15	2385	600
2 µg/ml BSA	30	2370	600
4 µg/ml BSA	60	2340	600
6 µg/ml BSA	90	2310	600
8 µg/ml BSA	120	2280	600

3.2.2 *Bacillus circulans* M34’den saflaştırılan proteaz enziminin karakterizasyonu

3.2.2.1 *Bacillus circulans* M34’den saflaştırılan proteaz enziminin molekül kütlelerinin SDS-PAGE ile belirlenmesi

Bu çalışmada SDS’le; CNBr’le-aktifleştirilmiş Sepharose 4B- bacitracin afinite ve Q Sefaroz anyon değiştirici kolon kromatografisi ile elde edilen ekstraktların içerdiği enzim saflığı araştırılmış ve molekül kütlesi belirlenmiştir. SDS’de % 12’lik jel hazırlanmıştır. 300 volt, 200 miliamper’de örnekler elektroforezde yürütülmüştür. Dört saat sonra örneklerin jelde yürümesi bitince, jel çıkartılarak fiksasyon işlemine geçilmiştir. Fiksasyon işleminin amacı proteinlerin jele yapışmasını sağlamaktır. Gümüş boyama yöntemine göre jel boyanarak görüntüleme sağlanmıştır. Gümüş nitratla boyama yöntemi, diğer yöntemlere göre hassasiyeti yüksek olduğu için tercih edilmiştir (Uyanık 2008).

3.2.2.2 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin molekül kütlesinin Jel filtrasyon kromatografisi ile belirlenmesi

Daha önce yapılan çalışmalar incelenmiş ve hücre dışı proteaz enziminin molekül kütlesinin genellikle 20-60 kDa arasında değiştiği tespit edilmiştir. Bu yüzden molekül kütlesi 3 ile 70 kDa arası proteinleri ayıran 26x60 cm'lik Superdex 75 kolonu kullanılmıştır.

Diyaliz örneğinden 10 ml alınarak, 50 mM pH 10,5 Glisin-NaOH tamponu ile dengelenmiş olan Superdex 75 jel filtrasyon kolonuna yüklenmiştir Örnek 3 ml/dak akış hızında 1,5 dakika arayla superfrac'da 4,5 ml'lik fraksiyonlar halinde toplanmıştır. Toplanan fraksiyonların aktivitesi ve Warburg-Christian metoduyla protein içeriği analiz edilmiştir. Enzim aktivitesi görülen fraksiyonlar toplanmış ve elüsyon süreleri belirlenmiştir.

Diyaliz örneği için yapılan işlemler ticari olarak satılan 66,00 kDa'luk BSA (Sığır Serum Albumini), 66,07 kDa'luk HSA (İnsan Serum Albumini), 45,00 kDa'luk Ovalbumin ve 23,00 kDa'luk Tripsin standartları içinde tekrarlanmıştır. Standartların molekül kütleleri elüsyon sürelerine karşı grafiğe geçirilmiştir. Grafikten elde edilen denkleme, *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılmış olan proteaz enziminin elüsyon süresi yerleştirilmiş ve molekül kütlesi bulunmuştur. Çizilen grafik Ek 2'de verilmiştir.

3.2.2.3 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığının ve sıcaklık kararlılığının belirlenmesi

Bacillus circulans M34'den saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık profilinin belirlenmesi için, 50 µl enzim çözeltisi; pH 10,5 Glisin-NaOH tamponunda hazırlanan %0.6'lık kazein çözeltisinin 3 ml'siyle temiz deney tüplerinde karıştıırılarak, 20 °C'den 80 °C'ye kadar olan sıcaklık aralığında 30 dakika inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrası 3.2.1.4 bölümünde verilen yöntemle göre aktivite tayini yapılmıştır (Rahman vd. 2006). Enzimin sıcaklık profili grafiğinin çiziminde en yüksek aktivitenin gözlemlendiği sıcaklık değeri 100 olarak kabul edilmiştir.

Enzimin sıcaklık stabilitesini belirlemek için, 10 µl enzim çözeltisi ile 40 µl pH 10,5 50 mM Glisin-NaOH tamponuyla karıştırılmış ve çizelge 3.3'te gösterilen sıcaklıklarda ve sürelerde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon öncesinde ve sonrasında 3.2.1.4 bölümünde verilen yöntemle göre aktivite tayini yapılmıştır (Venugopal ve Saramma 2007). Enzim sıcaklık kararlılığı grafiğinin çiziminde, farklı sıcaklık değerlerinde, inkübasyondan önceki aktivite miktarı 100 olarak kabul edilmiş inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 3.3 Enzimin farklı sıcaklıklara karşı kararlılığının belirlenmesi

Sıcaklıklara karşı İnkübasyon Süreleri	dk	dk	dk	dk	dk	dk
40°C	30	60	90	120	150	180
50°C	15	30	45	60	75	90
60°C	5	10	15	20	25	30
70°C	1	2	3	4	5	10

3.2.2.4 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH değerinin ve pH kararlılığının belirlenmesi

Bacillus circulans M34'den saflaştırılan proteaz enziminin pH profilinin belirlenmesi için, 50 µl enzim çözeltisi; pH 4.0-5.0 aralığında 50 mM Glisin-HCl tamponunda, pH 6.0-7.0 aralığında 50 mM NaH₂PO₄-NaOH tamponunda, pH 7.0-9.0 aralığında 50 mM Tris-HCl tamponunda ve pH 10.0-12.0 aralığında 50 mM Glisin-NaOH tamponunda hazırlanan %0.6'lık kazein çözeltisinin 3 ml'siyle temiz deney tüplerinde karıştırılarak, 40 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrası 3.2.1.4 bölümünde verilen yöntemle göre aktivite tayini yapılmıştır (Rahman vd. 2006). Enzimin pH profili grafiğinin çiziminde en yüksek aktivitenin gözlemlendiği pH değeri 100 olarak kabul edilmiştir.

Enzimin pH stabilitesini belirlemek için, 10 µl enzim çözeltisi ile 40 µl farklı pH'larda hazırlanmış tamponlarla (pH 4.0-5.0 için 50 mM Glisin-HCl tamponu, pH 6.0-7.0 için 50 mM NaH₂PO₄-NaOH tamponu, pH 7.0-9.0 için 50 mM Tris-HCl tamponu ve pH 10.0-12.0 için 50 mM Glisin-NaOH tamponu) karıştırılmış ve 1 saat 40 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon öncesinde ve sonrasında 3.2.1.4 bölümünde

verilen yönteme göre aktivite tayini yapılmıştır (Rahman vd. 2006, Venugopal ve Saramma 2007). Enzim pH stabilitesi grafiğinin çiziminde, farkh pH değerlerinde, inkübasyondan önceki aktivite miktarı 100 olarak kabul edilmiş inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

3.2.2.5 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan proteaz enzimine metal iyonlarının etkisini belirlemek için Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Sn^{2+} , Fe^{3+} , Ba^{2+} , K^{1+} , Na^{1+} , Zn^{2+} iyonları kullanılmıştır. Bu metallerin 2, 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlardaki çözeltileri pH 10,5 Glisin-NaOH tamponuyla hazırlanmıştır. Daha sonra 10  l enzim çözeltisi 40  l pH 10,5 50 mM Glisin-NaOH tamponuyla hazırlanmış metal iyonlarının çözeltisiyle karıştırılmış ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. K r olarak 10  l enzim çözeltisi ile 40  l pH 10,5 50 mM Glisin-NaOH tamponu karıştırılmış, ortama herhangi bir metal iyonu eklenmemiştir ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında 3.2.1.4 bölümünde verilen yönteme göre aktivite tayini yapılmıştır (Venugopal ve Saramma 2007). Metal iyonlarının *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz üzerine etkisini göstermek için hazırlanan çizelgede, k r olarak hazırlanan örneğin aktivitesi 100 olarak kabul edilmiş inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

3.2.2.6 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan proteaz enzimine organik çözücülerin etkisini belirlemek için Benzen, Toluen, Ksilen, Etanol, Bütanol, Aseton ve DMSO   zeltisi bire üç oranına pH 10,5 50 mM Glisin-NaOH tamponuyla hazırlanmıştır. Daha sonra 10  l enzim çözeltisi 40  l hazırlanan çözeltilerle karıştırılmış ve 40  C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. K r olarak; 10  l enzim çözeltisi ile 40  l tamponla karıştırılarak aynı koşullar altında inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında 3.2.1.4 bölümünde verilen yönteme göre aktivite tayini yapılmıştır. Organik   z c lerin *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz üzerine etkisini göstermek için çizilen grafikte, k r olarak hazırlanan örneğin aktivitesi 100 olarak kabul edilmiş inkübasyon sonrası elde edilen

değerler kalan aktivite yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

3.2.2.7 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerin ve yükseltgenlerin etkisinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan proteaz enzimine yüzey aktif ajanların ve hidrojen peroksitin etkisini belirlemek için % 1'lik SDS (w/v), %1'lik Tween-80 (v/v), %1'lik Triton X-100 (w/v), %2'lik ve %5'lik H₂O₂ (v/v) kullanılmıştır. Bu yüzey aktif maddelerin ve yükseltgenlerin verilen yüzdeleri pH 10,5 50 mM Glisin-NaOH tamponuyla hazırlanmıştır. Daha sonra 10 µl enzim çözeltisi 40 µl hazırlanan çözeltilerle karıştırılmış ve 40 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Kör olarak 10 µl enzim çözeltisi ile 40 µl tamponla karıştırılarak aynı koşullar altında inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında 3.2.1.4 bölümünde verilen yöntemle göre aktivite tayini yapılmıştır. Yüzey aktif maddelerin ve yükseltgenlerin *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz üzerine etkisini göstermek için çizilen grafikte, kör olarak hazırlanan örneğin aktivitesi 100 olarak kabul edilmiş inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

3.2.2.8 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara karşı spesifitesinin belirlenmesi

Proteaz enziminin protein substratlara karşı spesifitesini belirlemek amacı ile keratin, sığır serum albumini (BSA), jelatin, ovalbumin ve kazeinden oluşan protein substratları kullanılmıştır. Substratların %0.6'lık çözeltileri 50 mM pH 10,5 50 mM Glisin-NaOH tampon çözeltisinde çözülerek hazırlanmıştır. 50 µl enzim çözeltisi, 3 ml 50 mM pH 10,5 Glisin-NaOH tamponunda hazırlanmış substratlarla karıştırılmış ve 40 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 Glisin-NaOH tampon çözeltisi ilave edilen reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Daha sonra 3 ml TCA ile oda sıcaklığında 15 dakika beklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Süre bitiminde reaksiyon karışımı 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve üst fazdan 0.5 ml alınmıştır. 0.5 ml'lik üst fazın üzerine 2.5 ml 0.5 M Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilmiştir. İyice karıştırılan reaksiyon karışımının üzerine 0.5 ml %50'lik (v/v) Folin-Ciocalteu reaktifi eklenerek karışım 35 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminde örneklerin absorbansı 660 nm'de köre karşı ölçülmüştür.

Enzimin doğal substratlara karşı spesifitesinin belirlenmesi için çizilen grafikte kazein substratını bulunduran enzim çözeltisinin aktivitesi %100 kabul edilmiş ve hesaplanan diğer aktivite değerleri bu aktivite değerine oranlanarak % bağıl aktivite olarak verilmiştir.

3.2.2.9 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine amino asit inhibitörlerinin etkisinin belirlenmesi

Proteaz enziminin amino asit inhibitörlerine karşı etkisini belirlemek amacı ile PMSF, EDTA, Mercaptoethanol, DTT ve üre 5 mM'lık konsantrasyonlardaki çözeltileri pH 10,5 50 mM Glisin-NaOH tamponuyla hazırlanmıştır. Ancak PMSF çözeltisi önce 250 mM olacak şekilde ethanol içerisinde hazırlanmış daha sonra bu stok çözeltiden 200 µl alınarak 10 ml'ye pH 10,5 Glisin-NaOH tamponuyla tamamlanmıştır. Böylece son konsantrasyonu 5mM olarak ayarlanmıştır. Daha sonra 10 µl enzim çözeltisi 40 µl pH 10,5 Glisin-NaOH tamponuyla hazırlanmış inhibitör çözeltileriyle karıştırılmış ve 40 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Kör olarak 10 µl enzim çözeltisi ile 40 µl pH 10,5 Glisin-NaOH tamponu karıştırılmış, ortama herhangi bir inhibitör eklenmemiştir. Inkübasyon sonrasında 3.2.1.4 bölümünde verilen yönteme göre aktivite tayini yapılmıştır. İnhibitörlerin *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz üzerine etkisini göstermek için çizilen grafikte, kör olarak hazırlanan örneğin aktivitesi 100 olarak kabul edilmiş ve hesaplanan diğer aktivite değerleri bu aktivite değerine oranlanarak % bağıl aktivite olarak verilmiştir.

3.2.2.10 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin Michaelis Menten Kinetik sabitlerinin belirlenmesi

Bacillus circulans M34'den saflaştırılan proteaz enziminin, kazein varlığında kinetik sabitlerinin (K_m ve V_m) belirlenmesi için %0,2-1,6 aralığında sekiz farklı konsantrasyonda substrat çözeltisi hazırlanmıştır. 50 µl enzim çözeltisi, 3 ml 50 mM pH 10,5 Glisin-NaOH tamponunda hazırlanmış bu farklı konsantrasyonlardaki substratlarla karıştırılmış ve 40 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10,5 Glisin-NaOH tampon çözeltisi ilave edilen reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Daha sonra 3 ml TCA ile oda sıcaklığında 15 dakika beklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Süre bitiminde reaksiyon karışımı 10000 rpm'de 5 dakika

santrifüjlenmiş ve üst fazdan 0.5 ml alınmıştır. 0.5 ml'lik üst fazın üzerine 2.5 ml 0.5 M Na_2CO_3 çözeltisi ilave edilmiştir. İyice karıştırılan reaksiyon karışımının üzerine 0.5 ml %50'lik (v/v) Folin-Ciocalteu reaktifi eklenerek karışım 35 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminde örneklerin absorbansı 660 nm'de köre karşı ölçülmüştür. Daha sonra başlangıç substrat konsantrasyonlarının resiprokal değerlerine ($1/S$) karşı başlangıç hızlarının resiprokal değerleri ($1/v$) işaretlenerek Lineweaver-Burk diyagramı oluşturulmuş elde edilen lineer doğrunun eğiminden ve y eksenini kesim noktasından enzimin kazein hidrolizinin K_m , V_m değerleri hesaplanmıştır (Rao vd.2009).

4. BULGULAR

4.1 *Bacillus circulans* M34'ten Proteaz Üretimi

Proteaz üretimi için *Bacillus circulans* M34'ün aşı kültürü 100 ml nutrient broth besi yerine 1 ml olacak şekilde ekilmiş ve 37 °C'de 24 saat 150 rpm'de çoğaltılmıştır.

4.2 Proteaz Enziminin Saflaştırılması

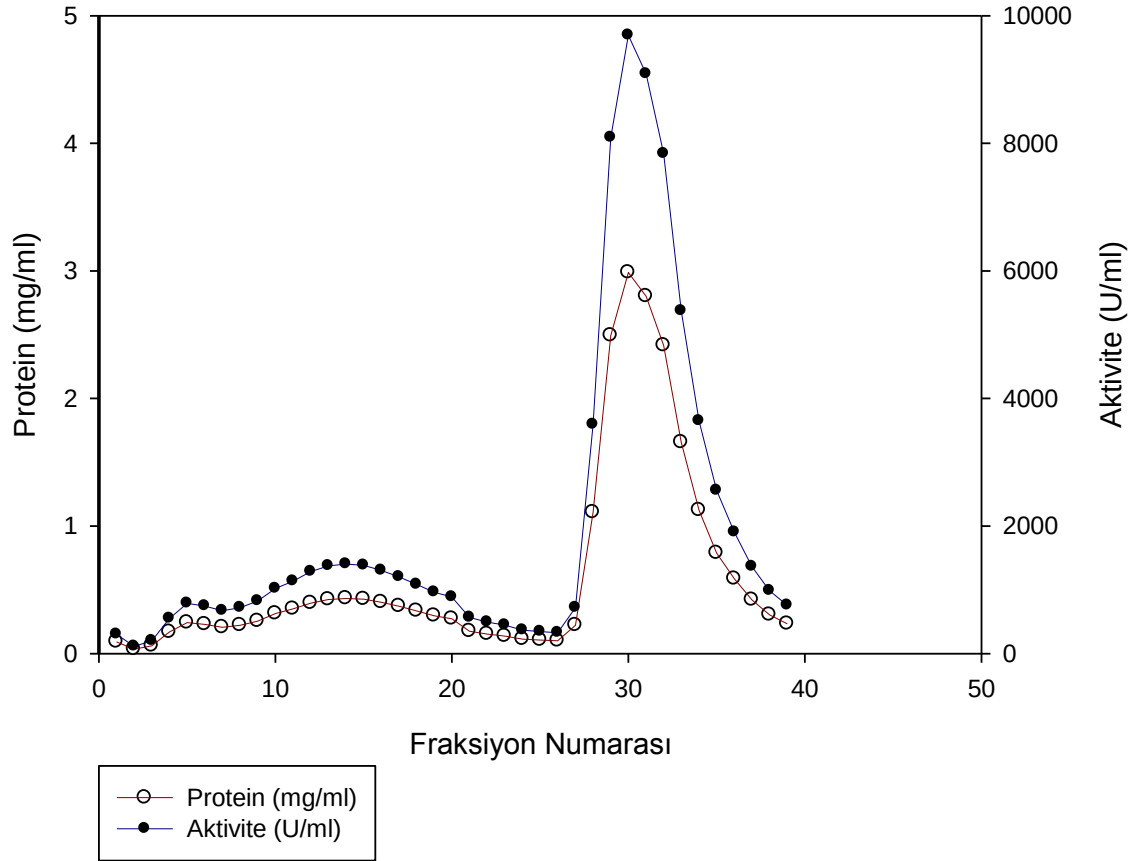
Bölüm 3.2.1'de belirtilen yöntemle göre kısmi saflaştırılan proteaz enzimi Q Sepharose anyon değiştirici kolona yüklenmiş ve sonuçlar çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Proteaz enziminin *Bacillus circulans* M34'ten iyon değişim kromatografisi ile saflaştırması

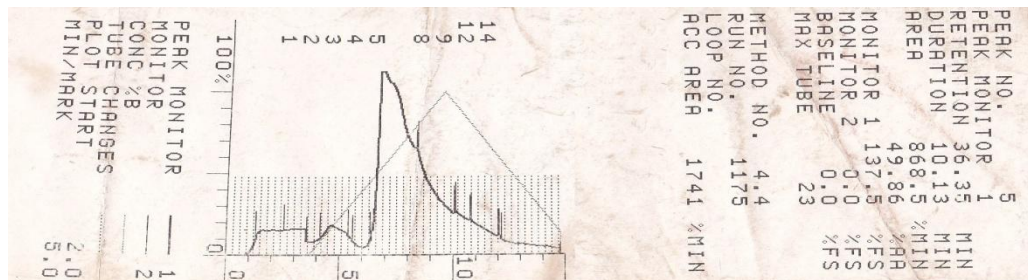
Saflaştırma Basamakları	Toplam Hacim (ml)	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Fermantasyon Sıvısı	200	71394,64	65,18	1095,26	100	1
%30-80 (NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi ve diyaliz sonrası elde edilen örnek	6	43031,45	11,82	3639,95	60,27	3,32
Q Sepharose anyon değiştirme kromatografisi	21	33763,47	3,25	10386,20	47,29	9,48

Q Sepharose anyon değiştirme kromatografisi bölüm 3.2.1.1'de belirtilen yöntemle göre yapılmıştır. Çalışma öncesi yapılan kaynak araştırmalarından ve çalışmadan önce yapılan tekrarlardan yola çıkarak proteazın katyonik yapıda olduğu bulunmuştur. Bu yüzden sadece kolona bağlanmayan fraksiyonlar toplanmıştır. Toplanan fraksiyonların protein miktarı Warburg-Christian methodu ile tespit edilmiştir. Fraksiyonların aktivitesi bölüm 3.2.1.4'de belirtilen yöntemle tespit edilmiş ve en yüksek aktivite gözlenen 5 tüp üzerinden karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Tüm fraksiyonların

protein ve aktivite değerlerinin grafiği şekil 4.1’de, elde edilen kromatogram ise şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 *Bacillus circulans* M34’ten saflaştırılan proteaz enziminin Q Sepharose anyon değiştirme kromatografisi sonucu elde edilen ürünlerinin protein miktarları ve aktiviteleri



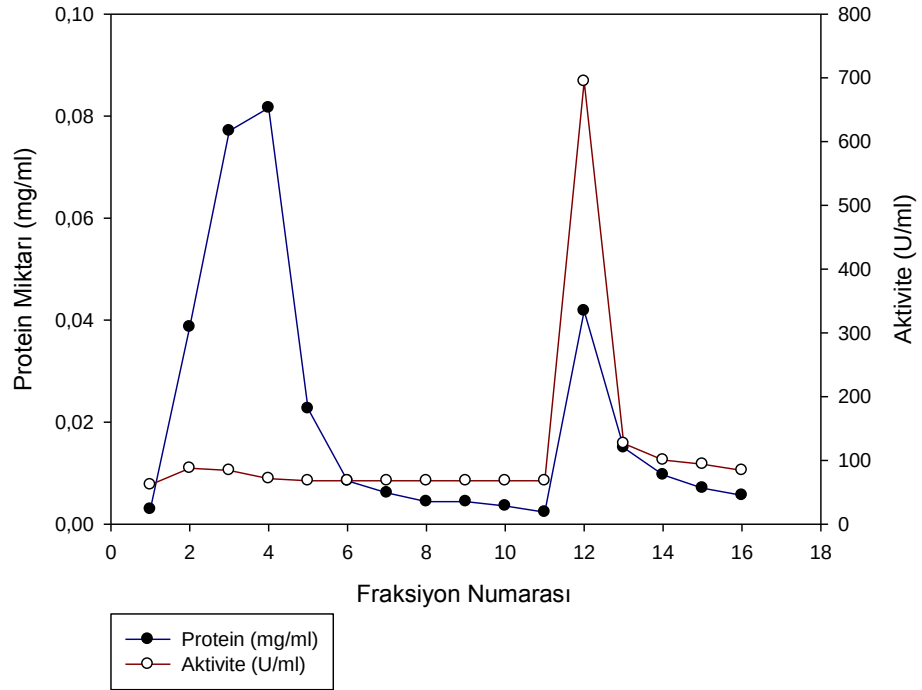
Şekil 4.2 *Bacillus circulans* M34’ten saflaştırılan proteaz enziminin Q Sepharose anyon değiştirme kromatogramı

Afinite kromatografisi için *Bacillus circulans* M34 bölüm 3.2.1’de belirtilen yöntemle göre tekrar çoğaltılmış ve kısmi olarak saflaştırılmıştır. Ancak Afinite kromatografisinde fermentasyon sıvısının, diyalizin ve kromatografisi sonucu elde edilen ürünün protein miktarları Warburg-Christian metoduyla belirlenmiştir. Sonuçlar çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

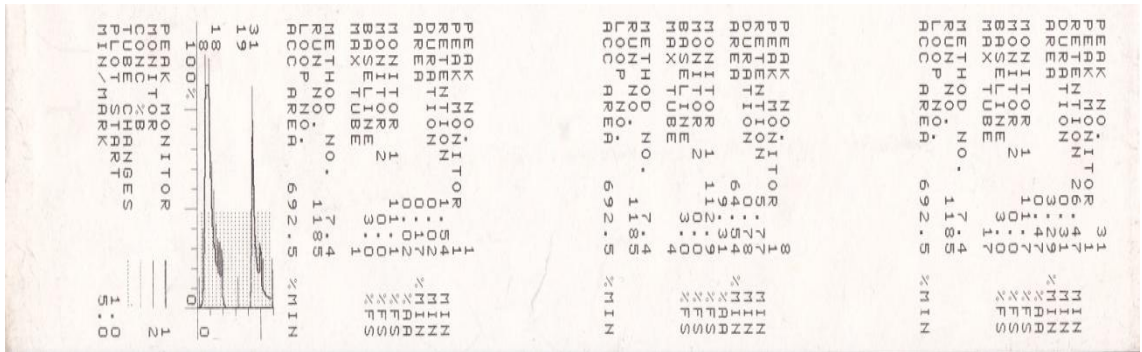
Çizelge 4.2 Proteaz enziminin *Bacillus circulans* M34’ten afinite kromatografisi ile saflaştırması

Saflaştırma Basamakları	Toplam Hacim (ml)	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Fermentasyon Sıvısı	212,5	126887,79	557,88	227,45	100	1
%30-80 (NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi ve diyaliz sonrası elde edilen örnek	5	85430,17	85,20	1002,64	67,33	4,41
CNBr Aktifleştirilmiş Sepharose 4B-Bacitracin Afinite Kromatografisi	75	52085,63	2,23	23398,80	41,05	102,88

Toplanan fraksiyonların; protein miktarı Warburg-Christian methoduna göre, aktivitesi ise bölüm 3.2.1.4’de belirtilen yöntemle tespit edilmiştir. Tüm fraksiyonların protein ve aktivite değerlerinin grafiği şekil 4.3’de, elde edilen kromatogram ise şekil 4.4’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3 *Bacillus circulans* M34'ten saflaştırılan proteaz enziminin Sepharose-bacitracin afinite kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonlarının protein miktarları ve aktiviteleri

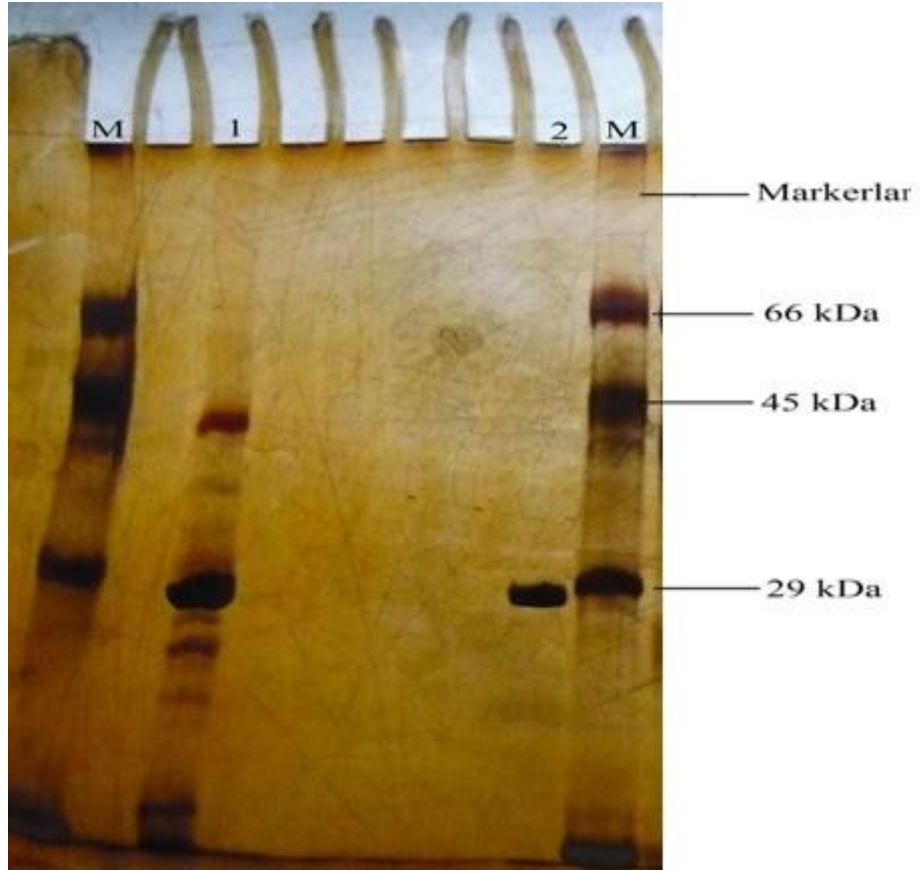


Şekil 4.4 *Bacillus circulans* M34'ten saflaştırılan proteaz enziminin Sepharose-bacitracin afinite kromatogramı

4.3 *Bacillus circulans* M34'den Saflaştırılan Proteaz Enziminin Karakterizasyonu

4.3.1 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin SDS-PAGE ile belirlenen molekül kütlesi

Bacillus circulans M34'den Q Sepharose anyon değiştirme kromatografisi ve CNBr'le Aktifleştirilmiş Sepharose 4B-Bacitracin afinite kromatografisi ile saflaştırılan proteaz enziminin molekül kütlesi SDS-PAGE ile görüntülenmiştir. Q Sepharose anyon değiştirme kromatografisinden elde edilen ürün birden çok bant vermiştir ancak 27,5 kDa civarındaki bant daha keskin olarak gözlenmiştir. Sepharose 4B-Bacitracin afinite kromatografisinden elde edilen ürün ise 27,5 kDa civarında tek bir bant vermiştir. Enzimin SDS-PAGE görüntüsü şekil 4.5'te verilmiştir.

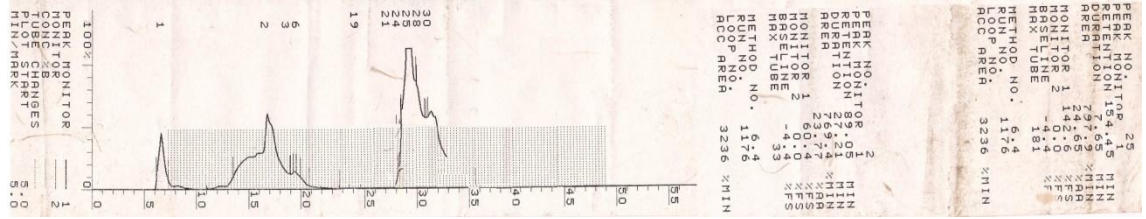


şekil 4.5 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü

1 numaralı yer: Q Sepharose anyon değiştirme kromatografisi ürünü
2 numaralı yer: Sepharose 4B-Bacitracin afinite kromatografisinin ürünü
M harfi ile gösterilen yer: markerlar

4.3.2 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile belirlenen molekül kütlesi

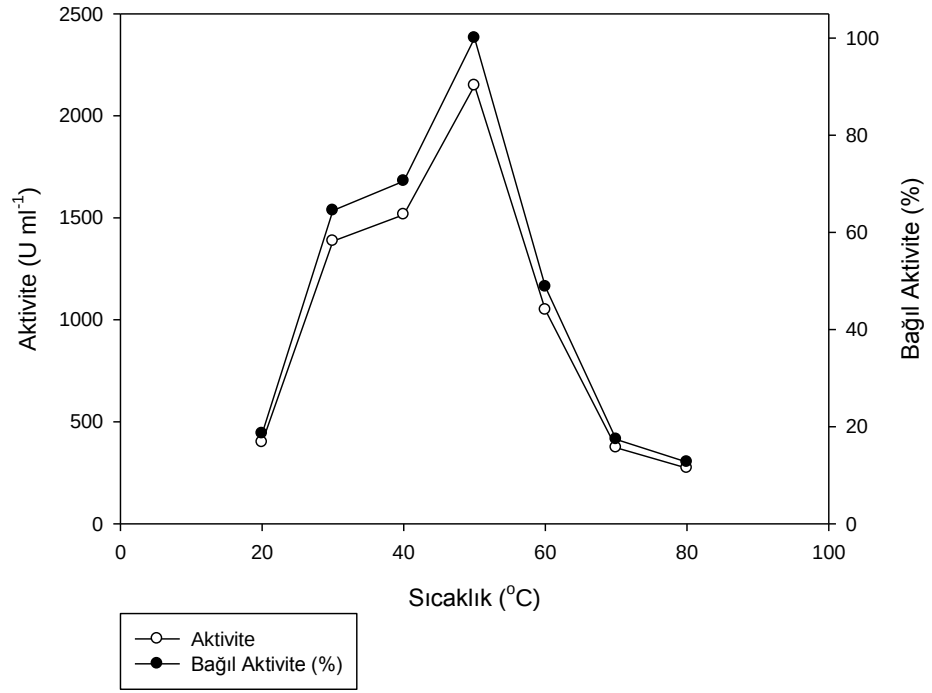
Bölüm 3.2.2.2'de anlatıldığı şekilde Jel filtrasyon kromatografisi yapılmıştır. Standartlar için yapılan Jel filtrasyon kromatografisi sonuçları grafiğe geçirilmiştir (Ek 2). Jel filtrasyon sonucu elde edilen kromatograma göre aktivite testleri yapılmış ve kromatogramda 25 numara ile gösterilen yerde aktivite gözlenmiştir. Bu fraksiyonun elüsyon süresi standart grafikten çıkarılan denklemde yerine konulduğunda enzimin molekül kütlesinin SDS-PAGE ile uyumlu olacak şekilde 27,5 kDa olduğu tespit edilmiştir. Jel filtrasyon sonucu elde edilen kromatogram şekil 4.6 gösterilmiştir.



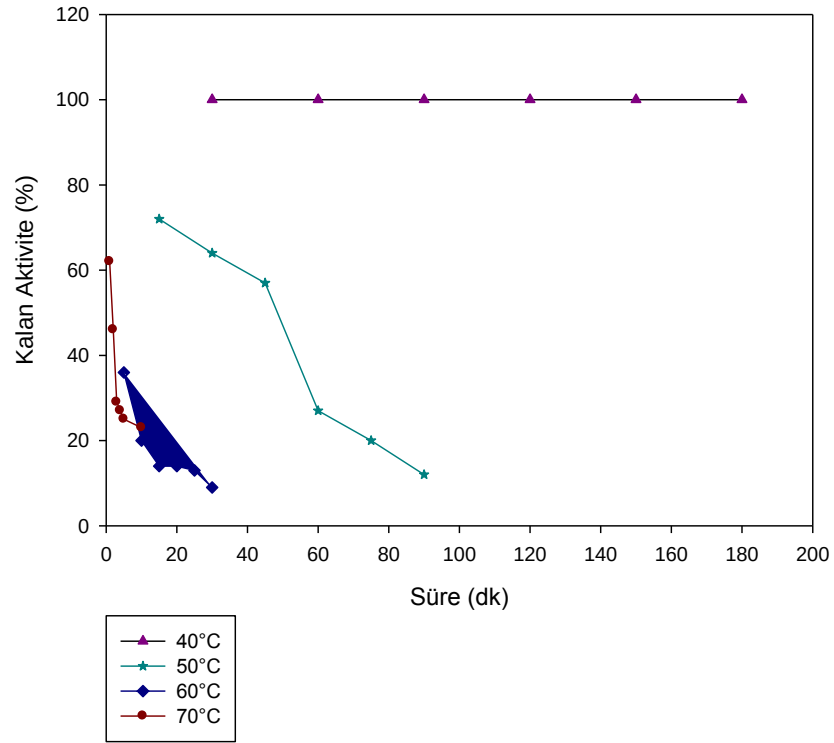
Şekil 4.6 *Bacillus circulans* M34'ten saflaştırılan proteaz enziminin Superdex 75 Jel filtrasyon kromatogramı

4.3.3 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık profili ve kararlılığı

Bacillus circulans M34'den saflaştırılan proteaz enziminin bölüm 3.2.2.3'deki yöntemle göre sıcaklık profili ve kararlılığı belirlenmiştir. Enzimin sıcaklık profili şekil 4.7'de gösterilmiştir. Proteaz aktivitesi için optimum sıcaklığın 50 °C olduğu tespit edilmiştir. Enzimin sıcaklık kararlılığı ise şekil 4.8'de gösterilmiştir. Proteazın 40 °C bir saatten fazla kararlılığını büyük oranda koruduğu görülmüştür. Ancak enzimin 50 °C, 60 °C ve 70 °C'de kararlılığının ciddi oranda azaldığı görülmüştür.



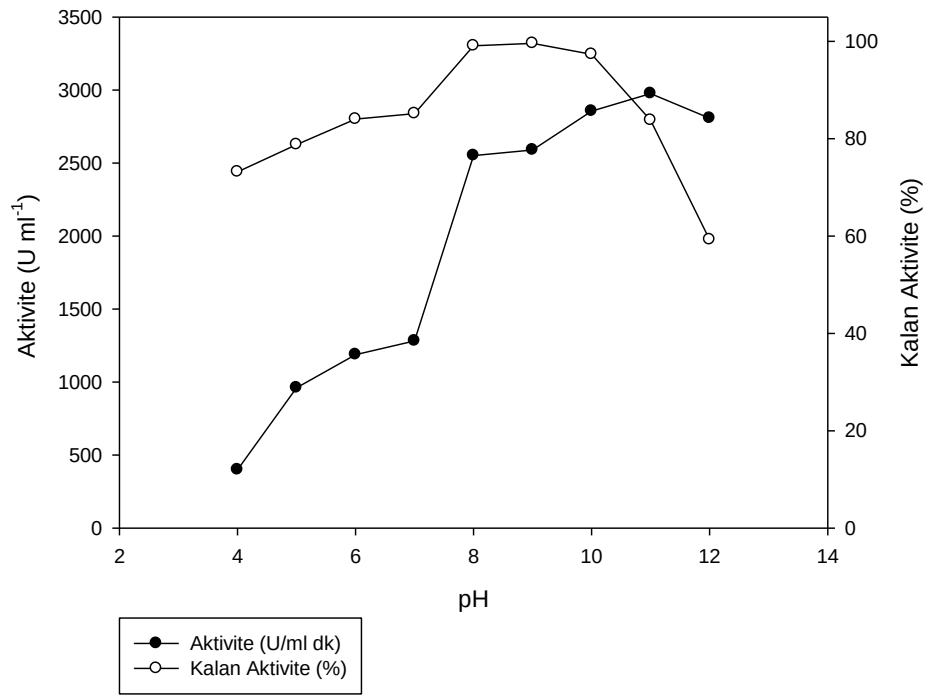
Şekil 4.7 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık profili



Şekil 4.8 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık kararlılığı

4.3.4 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin pH profili ve kararlılığı

Bacillus circulans M34'den saflaştırılan proteaz enziminin bölüm 3.2.2.4'deki yöntemle göre pH profili ve kararlılığı belirlenmiştir. Enzimin pH profili ve kararlılığı şekil 4.9'de gösterilmiştir. Proteaz aktivitesi için optimum pH'ın 11 olduğu tespit edilmiştir. Proteazın; pH 8, 9, 10 ve 11'de kararlılığını büyük oranda koruduğu görölmüştür. Ancak enzim; pH 4, 5, 6 ve 7'de aktivitesinin yaklaşık %20'sini kaybetmiştir. pH 12'de ise enzimin aktivitesinde %40'lık bir kayıp gözlenmiştir. Grafikte enzimin kararlılığı verilirken inkübasyona bırakılmayan çözeltinin aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir. İnkübe edilmiş örneklerin kalan aktivitesi; kendi pH'larında inkübasyona bırakılmayan çözeltilerin aktivitesine göre verilmiştir.



Şekil 4.9 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin pH profili ve kararlılığı

4.3.5 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisi

Çalışmada kullanılan proteaz enzimine metal iyonlarının etkisini belirlemek için Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Sn^{2+} , Fe^{3+} , Ba^{2+} , K^{1+} , Na^{1+} , Zn^{2+} iyonları kullanılmıştır. Bölüm 3.2.2.5'te belirtilen yönteme göre yapılan deney sonuçları çizelge 4.3'te verilmiştir. Sonuçlara göre Zn^{2+} , Cu^{2+} ve Co^{2+} enzim aktivitesini arttırırken Sn^{2+} , Fe^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} ve Mg^{2+} varlığında aktivitede kayıp gözlenmiştir. K^{1+} , Ca^{2+} ve Na^{1+} iyonlarının ise aktiviteye bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.3 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisi

Metal iyonları	İnkübasyon Sonrasında Kalan Aktiviteler (%)		
	2 mM	5 mM	10 mM
ZnCl_2	128	114	131
SnCl_2	71	68	62
NaCl	100	100	100
CaCl_2	108	109	100
KCl	106	104	100
FeSO_4	88	89	94
CuCl_2	103	115	112
CoCl_2	94	101	103
BaCl_2	63	69	67
FeCl_3	70	69	66
MnCl_2	81	78	78
MgCl_2	80	87	88

4.3.6 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisi

Çalışmada kullanılan proteaz enzimine organik çözücülerin etkisini belirlemek için Benzen, Toluen, Ksilen, Etanol, Bütanol, Aseton ve DMSO çözeltisi kullanılmıştır. Bölüm 3.2.2.6'da belirtilen yöntemle göre yapılan deney sonuçları çizelge 4.4'te verilmiştir. Sonuçlara göre etanol çözeltisi ile aktivitede artış gözlenirken ksilen varlığında enzim aktivitesinde %79'luk bir düşüş gözlemlenmiştir. DMSO, toluen, bütanol ve benzen varlığında enzim aktivitesi ortalama %88 korunmuştur. Ancak aseton çözeltisi enzim aktivitesinde %35'lik bir düşüşe neden olmuştur.

Çizelge 4.4 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisi

Organik Çözücüler	Kalan Aktivite (%100)
Kontrol	100
Aseton	65
Benzen	78
Bütanol	86
DMSO	94
Etanol	108
Ksilen	21
Toluen	94

4.3.7 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerin ve yükseltgenlerin etkisi

Çalışmada kullanılan proteaz enzimine yüzey aktif ajanların ve hidrojen peroksitin etkisini belirlemek için %1'lik SDS (w/v), %1'lik Tween-80 (v/v), %1'lik Triton X-100 (v/v), %2'lik ve %5'lik H₂O₂ (v/v) kullanılmıştır. Bölüm 3.2.2.7'de belirtilen yöntemle göre yapılan deney sonuçları çizelge 4.5'te verilmiştir. Sonuçlara göre SDS varlığında enzim aktivitesinde %81 gibi ciddi bir düşüş gözlenirken diğer bir yüzey aktif madde olan triton X-100'de enzim aktivitesi %72 korunmuştur. Oksitleyici bir ajan olan H₂O₂'de ise düşük konsantrasyonlarda enzim aktivitesinde çok az bir artış gözlenirken yüksek konsantrasyonlarda enzimi inhibe ettiği gözlenmiştir.

Çizelge 4.5 Proteaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerin ve yükseltgenlerin etkisi

Yüzey Aktif Maddeler	Kalan Aktivite (%100)
Kontrol	100
SDS	19
Tween 80	106
Triton X-100	72
Yükseltgen Reaktifler	Kalan Aktivite (%100)
Kontrol	100
H ₂ O ₂ (%2)	105
H ₂ O ₂ (%5)	68

4.3.8 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara karşı spesifitesi

Çalışmada kullanılan proteaz enziminin doğal substratlara karşı spesifitesini belirlemek amacıyla %0,6'lık (w/v) keratin, sığır serum albumini (BSA), jelatin, ovalbumin ve kazeinden oluşan protein substratları kullanılmıştır. Bölüm 3.2.2.8'de belirtilen yöntemle göre yapılan deney sonuçları çizelge 4.6'da verilmiştir. Sonuçlara göre *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin en iyi aktiviteyi kazein substratına karşı gösterdiği görülmüştür. Çizelge 4.6'da en yüksek aktiviteyi gösteren substrat aktivitesi 100 kabul edilmiştir. Diğer substratların aktivitesi en yüksek aktiviteyi veren substrata göre bağıl olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.6 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara karşı spesifitesi

Doğal Substratlar (%0,6 w/v)	Bağıl Aktivite (%100)
Kazein	100
Keratin	11
Jelatin	68
Ovalbumin	82
BSA	41

4.3.9 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine amino asit inhibitörlerinin etkisi

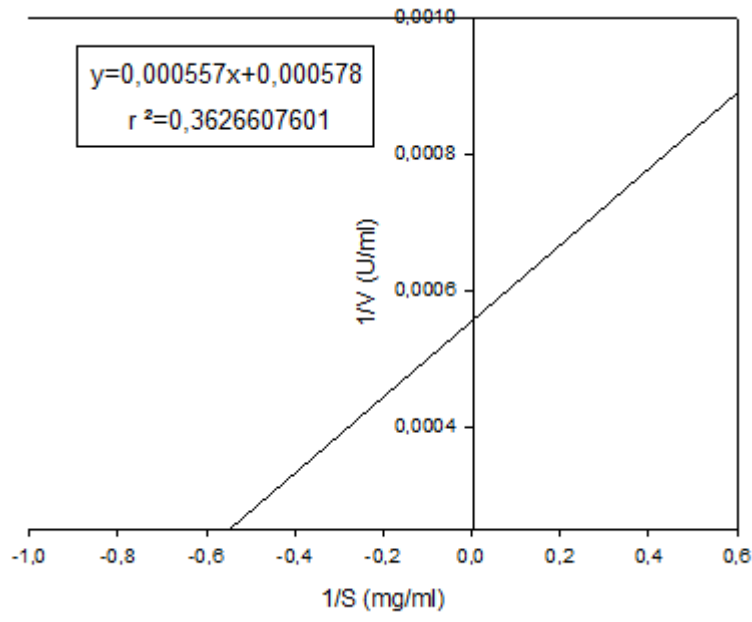
Proteaz enziminin amino asit inhibitörlerine karşı etkisini belirlemek amacı ile PMSF, EDTA, DTT ve ürenin 5mM'lık ve β -Mercaptoethanol'ün 2mM'lık konsantrasyonlardaki çözeltileri kullanılmıştır. Bölüm 3.2.2.9'de belirtilen yöntemle göre yapılan deney sonuçları çizelge 4.6'da verilmiştir. *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin 5mM'lık PMSF varlığında %95 inhibe olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra enzim aktivitesinde 5mM EDTA varlığında %27'lik ve 5mM üre varlığında %16'lık bir kayıp gözlenmiştir. 2mM'lık β -Mercaptoethanol varlığı ise enzim aktivitesini etkilememiştir. Enzimin serin spesifik inhibitörü olan PMSF ile tamamen inhibe olması enzimin bir serin proteaz olduğu ve EDTA varlığında meydana gelen aktivite kaybının ise enzimin metal bağlama bölgesine sahip olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır.

Çizelge 4.7 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine amino asit inhibitörlerinin etkisi

İnhibitörler	Bağıl Aktivite (%100)
Kontrol	100
PMSF (5mM)	5
EDTA (5mM)	73
Üre (5mM)	84
DTT (Dithiothreitol) (5mM)	91
β -Mercaptoethanol	100

4.3.10 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin Michaelis Menten Kinetik sabitleri

Bacillus circulans M34'den saflaştırılan proteaz enziminin, kazein varlığında kinetik sabitlerinin (K_m ve V_m) belirlenmesi için Lineweaver-Burk grafiğı kullanılmıştır. Bölüm 3.2.2.10'da belirtilen yöntemle göre yapılan deney sonucu elde edilen grafik şekil 4.10'da verilmiştir. K_m ve V_m değerleri sırasıyla 0,96 mg/ml ve 9,548 $\mu\text{mol ml}^{-1} \text{dk}^{-1}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.10 *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada *Bacillus circulans* M34 suşundan hücre dışı proteaz enzimi saflaştırılmış ve karakterizasyon işlemleri yapılmıştır. Enzim önce primer teknikler kapsamında yer alan %30-80'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi ve diyaliz ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Bu kısmi saflaştırılmış proteaz enzimi; iki farklı kromatografi tekniğiyle saflaştırılmaya devam edileceği için bu işlem iki farklı fermentasyon sıvısına uygulanmıştır. Bu işlem sonucu elde edilen örneklerin verimleri ve saflaştırma katsayıları sırasıyla %60,27-67,33 ve 3,32-4,41 olarak bulunmuştur. Reddy ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları çalışmada *Bacillus sp.* RKY3'den proteaz saflaştırması için çalışmamıza benzer şekilde %30-80'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi ve diyaliz işlemi uygulanmıştır. Bu işlemler sonrası verim ve saflaştırma katsayısı sırasıyla %42,5 ve 9,4 olarak bildirmişlerdir. Reddy ve arkadaşlarının çalışması bu çalışma ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir verim elde etmemize rağmen saflaştırma katsayısının daha düşük olduğu görülmüştür. Kazan ve arkadaşlarının (2005) yürüttüğü benzer bir çalışmada ise *Bacillus clausii* GMBAE 42'den proteaz saflaştırılması için %75'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi ve diyaliz işlemi sonucu %65,39 verim ve 1,3 kat saflaştırma yapılmıştır. Kazan ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada elde edilen verimin bu çalışmayla yaklaşık olmasına rağmen saflaştırma katsayısının bu çalışmadan daha düşük olduğu belirlenmiştir. Towatana ve arkadaşlarının (1999) yürüttüğü başka bir çalışmada ise %80 doygunlukta $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi yapılmış ve örneğin %80 verimle 1,5 kat saflaştırıldığı bildirilmiştir. Sonuçlardan da görüldüğü gibi *Bacillus sp.* PS719'den proteaz saflaştırılması için yapılan bu çalışma daha yüksek bir verimle gerçekleştirilmesine rağmen daha düşük bir saflaştırma katsayısına sahiptir. *Bacillus circulans*'tan proteaz saflaştırması yapan Rao ve arkadaşları (2009) ise %60'lık $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi ve diyaliz işlemi sonrası 2,2 kat saflaştırdıkları örneği %62,2'lik bir verimle elde etmişlerdir. *Bacillus circulans* M34 suşunun kullanıldığı bu çalışma ile Rao ve arkadaşlarının çalışması karşılaştırıldığında benzer bir verim elde edildiği ancak bu çalışmanın daha yüksek bir saflaştırma katsayısına sahip olduğu görülmüştür.

Saflaştırma işlemine Q Sefaroz anyon değiştirici kolon kromatografisi ile devam edilmiştir. Kromatografi sonrası ürün %47,29 verimle 9,48 kat saflıkta elde edilmiştir. Literatürde benzer çalışmalar incelenmiş ve Q Sefaroz anyon değiştirici kolon

kromatografisi ile *Bacillus mojavensis*'ten proteaz enzimi saflaştırıldığı görülmüştür. Beg ve Gupta'nın (2003) yaptığı bu çalışmada ürünün; %37,2 verimle 17 kat saflaştırılmış şekilde elde edildiği görülmüştür. Bu çalışmayla kıyaslandığında veriminin daha düşük olmasına rağmen saflaştırma katsayısının daha yüksek olduğu görülmüştür. Joo ve Chang'ın (2005) yaptığı *Bacillus clausii* I-52'den proteaz saflaştırılması çalışmasında ise Fenil-Sepharose ve DEAE-Sepharose anyon değişim kromatografisi birlikte kullanılmıştır. Bu çalışmada ise ürün %78,9 verimle 9,6 kat saflaştırılmıştır. *Bacillus clausii* I-52'den proteaz saflaştırılması çalışması bu çalışma ile karşılaştırıldığında verimin daha düşük olduğu ancak saflaştırma katsayısının çok benzer olduğu görülmüştür. Haddar ve arkadaşlarının (2009) yürüttüğü bir çalışmada ise *B. mojavensis* A21'den BM1 ve BM2 olarak adlandırdıkları proteaz enzimi saflaştırması için DEAE-Selüloz ve Sephadex G-75 kromatografileri birlikte kullanılmıştır. Sonuçta ürünün %14,5 verimle 5,78 kat saflaştırıldığı bildirilen bu çalışmanın veriminin ve saflaştırma katsayısının bu tez çalışmasından daha düşük olduğu görülmüştür. Doddapaneni ve arkadaşlarının (2009) *Bacillus cereus*'dan proteaz saflaştırma çalışmalarında ise bu çalışmaya benzer şekilde Q Sepharose anyon değiştirici kolon kromatografisi kullanılmıştır. Çalışmada ürünün 1,8 saflıkta ve %49 verimle elde edildiği bildirilmiştir. Doddapaneni ve arkadaşlarının çalışması bu tez çalışması ile kıyaslandığında bu çalışmanın verim ve saflaştırma katsayısı bakımından daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür. Deng ve arkadaşlarının (2010) yürüttüğü *Bacillus* sp. B001'dan proteaz enziminin saflaştırılması çalışmasında ise yüksek performanslı iyon değişim (Resource Q) ve jel filitrasyon (superdex 200) kromatografisi birlikte kullanılmıştır. Bu çalışma sonucu ürünün %5,6 verimle 6,8 kat saflaştırıldığını bildirmişlerdir. *Bacillus* sp. B001'dan elde edilen bu proteaz enziminin verimi ve saflaştırılma katsayısının *Bacillus circulans* M34'ten elde edilen proteaz enziminden daha düşük olduğu görülmüştür. Ghafoor ve Hasnain (2010); *Bacillus subtilis* EAG-2'den proteaz enzimini DEAE-Selüloz kromatografisi ile %29 verimle 11 kat saflaştırmışlardır. *Bacillus subtilis* EAG-2'den saflaştırılan bu proteazın saflaştırma katsayısının *Bacillus circulans* M34'ten elde edilen proteazdan daha yüksek olduğu ancak veriminin daha düşük olduğu görülmüştür.

Fermantasyon sıvısının $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'la çöktürülmesi ve diyaliz edilmesinden sonra CNBr'le-aktifleştirilmiş Sepharose 4B- bacitracin afinite kromatografisiyle ikinci bir saflaştırma işlemi yapılmıştır. Bu işlem sonrası proteaz enzimi %41,05 verimle 102,88 kat saflaştırılmıştır. Literatürde benzer çalışmalara çok fazla rastlanmamıştır. Ancak *Natronococcus occultus*'dan hücre dışı serin proteaz saflaştıran Studdert ve arkadaşları (2001) CNBr'le-aktifleştirilmiş Sepharose 4B- bacitracin afinite kromatografisi kullanmış ve ardından kromatografi sonrası elde edilen ürünü ultrafiltrasyon işlemiyle konsantre etmişlerdir. Bu işlemler sonrası ürünü %19 verimle 328 kat saf halde elde etmişlerdir. *Natronococcus occultus*'dan saflaştırılan hücre dışı serin proteazın veriminin *Bacillus circulans* M34'ten elde edilen proteazdan daha düşük olduğu halde saflaştırma katsayısının daha yüksek olduğu görülmüştür. *Natrialba magadii*'den hücre dışı proteaz saflaştıran ve karakterizasyonunu yapan Giménez ve arkadaşları (2000) ise aynı şekilde CNBr'le-aktifleştirilmiş Sepharose 4B- bacitracin afinite kromatografisi kullanmış ve %34 verimle 75,6 kat saflaştırılmış ürün elde etmişlerdir. *Natrialba magadii* ile yapılan bu çalışma benzer şekilde *Bacillus circulans* M34'le yapılan çalışmayla karşılaştırıldığında *Bacillus circulans* M34'ten elde edilen ürünün hem veriminin hem de saflaştırma katsayısının daha yüksek olduğu görülmüştür. Namwong ve arkadaşları (2006) ise *Halobacillus sp.* SR5-3'ten benzer yöntemle %39 verimle 270 kat serin proteaz saflaştırmışlardır. Namwong ve arkadaşlarının çalışması bu çalışma ile kıyaslandığında daha yüksek bir saflaştırma katsayısına sahip oldukları ancak verimlerinin daha düşük olduğu görülmüştür. *Perkinsus marinus*'tan aynı kromatografi tekniğiyle proteaz saflaştıran Faisal ve arkadaşları (1999) ise ürünü 30 kat saflaştırdıklarını bildirmişlerdir. *Perkinsus marinus*'tan elde edilen ürünün saflığının *Bacillus circulans* M34'ten elde edilen üründen daha düşük olduğu görülmüştür. Başka bir çalışmada ise Stepanov ve arkadaşları (1992) *Halobacterium mediterrane*'nin fermantasyon sıvısını proteaz eldesi için Sepharose 4B- bacitracin afinite kromatografisine uygulamış ve %80 verimle 93 kat saflaştırılmış ürün elde etmişlerdir. *Halobacterium mediterrane*'dan saflaştırılan proteaz enzimi *Bacillus circulans* M34'ten elde edilen proteaza göre daha düşük bir saflıkta olmasına rağmen daha yüksek bir verimle elde edilmiştir.

Çalışmada karakterizasyon işlemleri için Q Sefaroz anyon değiştirici kolon kromatografisi ürünü kullanılmıştır. İlk olarak elde edilen ürünün molekül kütlesi tespit edilmiştir. *Bacillus circulans* M34'ten elde edilen ürünün molekül kütlesi SDS-PAGE ile yaklaşık 27,5 kDa olarak tespit edilmiş ve bu değer Superdex jel filtrasyon kromatografisi ile doğrulanmıştır. Literatürde benzer çalışmalar incelenmiş ve elde edilen proteazların molekül kütlesi tespit edilmiştir. Venugopal ve Saramma (2007) *Bacillus circulans* BM15'den elde ettikleri proteazın 30 kDa olduğunu bildirmişlerdir. Kazan ve arkadaşlarının (2005) *Bacillus clausii* GMBAE 42 ile yaptıkları çalışmada 26,5 kDa'luk bir proteaz saflaştırdıklarını bildirmişlerdir. Joo ve Chang'ın (2005) *Bacillus clausii* I 52'den saflaştırdıkları proteazın 28 kDa olduğunu ifade etmişlerdir. Gessesse ve arkadaşları (2003) *Nesterkononia sp.* AL-20 ve *B. pseudofirmus* AL-89'dan saflaştırdıkları proteazların sırasıyla 23 ve 24 kDa olduğunu yayınlamışlardır. Haddar ve arkadaşlarının (2009) *Bacillus mojavensis* A21'den saflaştırdıkları BM1 ve BM2 olarak adlandırdıkları proteazların sırasıyla 29 ve 15,5 kDa olduğunu göstermişlerdir. Beg ve Gupta (2003); *Bacillus mojavensis* ile yaptıkları çalışmada 30 kDa'luk bir proteaz elde etmişlerdir. Kumar ve arkadaşlarının (1999) *Bacillus spp.*'den saflaştırdıkları AP1 ve AP2 olarak adlandırdıkları proteazların sırasıyla 28 ve 29 kDa olduğu görülmüştür. Jaswal ve Kocher (2007) ise *Bacillus circulans*'la yaptıkları çalışmada ise 24,5 kDa'luk bir proteaz elde etmişlerdir. Ghafoor ve Hasnain (2010) *Bacillus subtilis* EAG-2 ile yaptıkları çalışmada 27 kDa'luk bir proteaz elde ettiklerini bildirmişlerdir. Doddapaneni ve arkadaşları (2009) ise *Bacillus cereus*'tan 28 kDa'luk bir proteaz saflaştırmışlardır. Deng ve arkadaşları (2010) ise *Bacillus sp.* B001 ile çalışmış ve 28 kDa'luk bir proteaz elde etmişlerdir. Sonuç olarak *Bacillus circulans* M34'ten elde edilen 27,5 kDa'luk bu proteazın literatürdeki çalışmalar ile tutarlı olduğu görülmüştür.

Bacillus circulans M34'ten elde edilen proteaz enzimin sıcaklık profili incelenmiş ve optimum sıcaklığının 50 °C olduğu tespit edilmiştir. Huang ve arkadaşlarının (2003) *Bacillus pumilus*'tan saflaştırdıkları proteazın optimum aktivitesinin 55 °C olduğu görülmüştür. Kumar ve arkadaşlarının (1999) *Bacillus spp.*'den saflaştırdıkları AP1 ve AP2 olarak adlandırdıkları proteazların optimum sıcaklıkları sırasıyla 50 ve 55 °C olarak bildirilmiştir. Ghorbel ve arkadaşları (2003) ise *Bacillus cereus* BG1'den

saflaştırdıkları proteaz ile çalışmış ve optimum sıcaklığını Ca^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda sırasıyla 60 ve 50 °C olarak bildirmişlerdir. Yang ve arkadaşları (2000) ise *Bacillus subtilis*'ten elde ettikleri proteaz enziminin optimum sıcaklığını 50 °C olarak tespit etmişlerdir. Singh ve arkadaşları (1999) *Bacillus sphaericus* ile yaptıkları çalışma sonucu elde ettikleri proteazın optimum sıcaklığını 50 °C olarak bulmuşlardır. Sareen ve Mishra (2008) ise *Bacillus licheniformis* RSP-09-37'den saflaştırdıkları proteaz için optimum sıcaklığın 50 °C olduğunu yayınlamışlardır. Literatürdeki bu çalışmalar; bu tez kapsamında *Bacillus circulans* M34'ten elde edilen proteaz enziminin optimum sıcaklık değeriyle uyumludur.

Bacillus circulans M34'ten elde edilen proteaz enziminin sıcaklık kararlılığı incelendiğinde enzimin 40 °C'de üç saat kararlılığını koruduğu görülmüştür. Ancak 50 °C'de 45. dakikada enzim aktivitesinin %43'lük bir kayıpla neredeyse yarılacağı tespit edilmiştir. 60 °C'de ise enzimin ilk beş dakikada aktivitesinin % 64'ünü kaybettiği fakat daha sonra başlangıç değerine göre daha yavaş bir aktivite kaybının olduğu gözlenmiştir. 70 °C'de enzimin 2. dakikada %54'lük bir aktivite kaybıyla neredeyse yarılacağı 10. dakikada ise % 77'lik bir aktivite kaybıyla kararlılığını koruyamadığı bulunmuştur. Enzimin sıcaklık kararlılığının incelendiğinde düşük sıcaklıklarda aktivitesi koruyabildiği ancak yüksek sıcaklıklarda kararlı olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Reddy ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları çalışmada *Bacillus sp.* RKY3'den elde ettikleri proteazın 60 °C'de aktivitesini hızla kaybettiği bildirilmiştir. Bu sonuç *Bacillus circulans* M34'ten elde edilen proteaz enzimi ile karşılaştırıldığında birbirleri ile tutarlı olduğu tespit edilmiştir. Venugopal ve Saramma (2007) *Bacillus circulans* BM15'den elde ettikleri proteazın 40 °C'de bir saat kararlılığını koruduğunu ancak 50 °C'de bir saat inkübasyondan sonra aktivitesinin %45'ini kaybettiğini yayınlamışlardır. *Bacillus circulans* M34'ten elde edilen proteaz enzimi bu veriler ile uyum içindedir. Bayondh ve arkadaşlarının (2000) yürüttüğü benzer bir çalışmada ise *Pseudomonas aeruginosa* MN'den saflaştırılan proteaz enzimi 70 °C'de 15 dakika inkübe edilmiş ve aktivitesinin %85'ini kaybetmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* MN'den saflaştırılan proteaz enzimi 70 °C'deki kararlılığı *Bacillus circulans* M34'ten elde edilen proteaz enzimininkine çok benzemektedir. Bu çalışmalar doğrultusunda *Bacillus circulans* M34'ten elde edilen proteaz enziminin düşük sıcaklıklarda

kararlılığını koruyabildiği sonucuna ulaşılmıştır. Bu tespitten yola çıkarak enzimin; düşük sıcaklıkta kararlılık gerektiren ticari uygulamalarda alternatif olabileceği düşünülmüştür.

Bacillus circulans M34'ten izole edilen enzimin pH profili incelenmiş ve optimum pH'nın 11 olduğu bulunmuştur. Enzimin pH 8-12 aralığında aktivitesinin birbirine yakın olduğu saptanmıştır. Ancak pH 4-7 aralığında enzimin aktivitesinde ciddi bir düşük olduğu görülmüştür. Genckal ve Tari'nin (2006) yaptığı çalışmada *Bacillus* sp.'den elde ettikleri proteazın optimum pH'ı 11 olarak tespit edilmiştir. Kazan ve arkadaşlarının (2005) yürüttüğü benzer bir çalışmada ise *Bacillus clausii* GMBAE 42'den saflaştırdıkları proteazın optimum pH'nın 11,3 olduğu görülmüştür. Beg ve Gupta (2003); *Bacillus mojavensis* ile yaptıkları çalışmada elde ettikleri proteazın optimum pH'ını 10,5 olarak bildirmişlerdir. Kumar ve arkadaşlarının (1999) *Bacillus* spp.'den saflaştırdıkları AP1 ve AP2 olarak adlandırdıkları proteazların optimum pH'larının sırasıyla 11 ve 12 olduğu görülmüştür. Oberoi ve arkadaşları (2001) ise *Bacillus* sp.'den saflaştırdıkları proteazın optimum pH'ını 11 olarak bildirmişlerdir. Singh ve arkadaşları (1999) *Bacillus sphaericus* ile yaptıkları çalışma sonucu elde ettikleri proteazın optimum pH'ını 10,5 olarak bulmuşlardır. *Bacillus circulans*'tan proteaz saflaştırması yapan Rao ve arkadaşları (2009) ise saflaştırdıkları proteazın optimum pH'ını 11 olarak tespit etmişlerdir. *Bacillus circulans* M34'ten elde edilen proteaz enziminin optimum pH'nın literatürdeki bu çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Bacillus circulans M34'ten saflaştırılan proteaz enziminin pH kararlılığı incelendiğinde ise, pH 8-11 aralığında bir saatlik inkübasyon sonrasında aktivitesinin %97'den fazlasını koruduğu görülmüştür. Ancak pH 6 ve 7'de bu oran %85'e düşerken pH 4 ve 5'te ortalama %75'e düşmüştür. Enzimin optimum pH'nın 11 olmasına rağmen pH 12'de bir saatlik inkübasyon sonrasında aktivitesinin %40'ını kaybetmesi dikkat çekicidir. Reddy ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları *Bacillus* sp. RKY3'den proteaz saflaştırması çalışmasında saflaştırdıkları proteazın pH 7-9 aralığında optimum sıcaklığında yarım saatte aktivitesinin %80'ini koruduğu görülmüştür. Bu sonuç *Bacillus circulans* M34'ten saflaştırılan proteaz enzimi ile karşılaştırıldığında; enzimin 40°C'de bir saat inkübasyon sonrasında pH 7'de %85 ve pH 8 ve 9'daki %97 bağlı

aktivite göstererek daha iyi bir kararlılık sergilediği görülmüştür. Rahman ve arkadaşların (2006) *Pseudomonas aeruginosa*'tan saflaştırdıkları proteazın ise pH 6-11 aralığında 37 °C'de yarım saat inkübe edildikten sonra aktivitesinin %90'ını koruduğu görülmüştür. *Bacillus circulans* M34'ten saflaştırılan proteaz enziminin bir saatlik inkübasyon sonrasında pH 6-7'de %85 ve 8-11'de %97 aktivite kararlılığıyla daha iyi bir sonuç verdiği görülmüştür. Gessesse ve arkadaşları (2003) *Nesterkonia sp.* AL-20 ve *B. pseudofirmus* AL-89'dan saflaştırdıkları proteazların pH kararlılığını sırasıyla pH 6-11'de %90 ve pH 6,5-10,5'de %70 olarak bildirmişlerdir. *Nesterkonia sp.* AL-20'den saflaştırılan proteazın pH kararlılığı *Bacillus circulans* M34'ten saflaştırılan proteaz ile benzerlik göstermektedir. Ancak *Bacillus circulans* M34'ten saflaştırılan proteazın pH kararlılığının *B. pseudofirmus* AL-89'dan saflaştırdıkları proteazdan daha iyi olduğu görülmüştür. Haddar ve arkadaşlarının (2009) yürüttüğü bir çalışmada ise *B. mojavensis* A21'den BM1 ve BM2 olarak adlandırdıkları proteaz enzimlerini saflaştırmış ve pH kararlılıklarını tespit etmişlerdir. BM1 olarak adlandırılan proteazın pH kararlılığı; 40°C'de bir saat inkübe edildikten sonra pH 7-10 aralığında aktivitesinin tamamını koruduğu ancak pH 11 ve 12'de sırasıyla aktivitenin %88'inin ve %50'sinin korunduğu bildirilmiştir. *Bacillus circulans* M34 proteazının BM1 olarak adlandırılan proteaza göre pH 7'de daha zayıf pH 8-10 aralığında ise benzer bir kararlılık gösterdiği görülmüştür. Ancak pH 11 ve 12'de *Bacillus circulans* M34 proteazının BM1 olarak adlandırılan proteazdan daha iyi bir kararlılık sergilediği görülmüştür. BM2 olarak adlandırılan proteazın pH kararlılığı ise; 40 °C'de bir saat inkübe edildikten sonra pH 8 ve 9'da aktivitesinin tamamını koruduğu ancak pH 10 ve 11'de sırasıyla aktivitenin %83'ünü ve %60'ını korunduğu bildirilmiştir. *Bacillus circulans* M34 proteazının BM2 olarak adlandırılan proteazla pH 8 ve 9'da benzer bir kararlılık gösterdiği görülmüştür. Ancak pH 10 ve 11'de *Bacillus circulans* M34 proteazının BM2 olarak adlandırılan proteazdan daha kararlı olduğu tespit edilmiştir. Oberoi ve arkadaşları (2001) ise *Bacillus sp*'den saflaştırdıkları proteazın pH kararlılığına 25 °C'de bir saat inkübe ederek bakmışlar ve pH 6-12 aralığında aktivitesinin %80'ini koruduğunu bildirmişlerdir. *Bacillus circulans* M34'ten saflaştırılan proteazın pH kararlılığının pH 6-11 aralığında *Bacillus sp*'den saflaştırılan proteazdan daha iyi olduğu ancak pH 12'de daha zayıf bir kararlılık sergilediği görülmüştür. Literatürdeki bu çalışmalarla karşılaştırıldığında *Bacillus circulans* M34'den elde edilen proteazın pH kararlılığının

oldukça iyi olduğu görülmüştür. Bu yüzden enzimin yüksek pH kararlılığı gerektiren ticari uygulamalarda kullanılma potansiyelinin olduğu düşünülmüştür.

Bacillus circulans M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisi incelendiğinde; Zn^{2+} , Cu^{2+} ve Co^{2+} iyonları aktivatör etkisi gösterirken Sn^{2+} , Fe^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} ve Mg^{2+} iyonları inhibitör etkisi göstermişlerdir. K^{1+} , Ca^{2+} ve Na^{1+} iyonları varlığında ise enzim aktivitesinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Rahman ve arkadaşların (2006) *Pseudomonas aeruginosa*'tan saflaştırdıkları proteaz üzerine metal iyonlarının etkisini incelemiş ve 2, 5 ve 10 mM'lık Zn^{2+} iyonunun aktiviteyi arttırdığını görmüşlerdir. Bunun yanı sıra 2 mM'lık Ba^{2+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} aktivitede düşüşe neden olurken 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlardaki çözeltileri aktiviteyi arttırmıştır. 2, 5 ve 10 mM'lık Fe^{2+} iyonları varlığında ise aktivitede ciddi bir azalma söz konusudur. 2, 5 ve 10 mM'lık Ca^{2+} iyonu ise aktivitede çok az bir artışa neden olmuştur. Bu sonuçlar *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enzimi ile karşılaştırıldığında; 5 ve 10 mM'lık Ba^{2+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} aktiviteyi arttırması haricinde benzerlik gösterdiği görülmüştür. Haddar ve arkadaşlarının (2009) yürüttüğü bir çalışmada ise *B. mojavensis* A21'den saflaştırdıkları proteazları BM1 ve BM2 olarak adlandırmışlar ve 5mM'lık metal tuzlarının aktivite üzerine etkisini incelemişlerdir. BM1 olarak adlandırılan enzim Ca^{2+} ve Zn^{2+} iyonları varlığında aktivitede artış gösterirken Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Hg^{2+} iyonları varlığında inhibe olmuştur. K^{1+} , Mg^{2+} ve Na^{1+} iyonları varlığında ise enzim aktivitesinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu veriler *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enzimi ile Ca^{2+} , Cu^{2+} ve Mg^{2+} metalleri haricinde örtüşmektedir. BM2 olarak adlandırılan enzim Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonları varlığında aktivitede artış gösterirken Mn^{2+} , Ba^{2+} , Hg^{2+} iyonları varlığında inhibe olmuştur. K^{1+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ve Na^{1+} iyonları varlığında ise enzim aktivitesinde bir değişiklik gözlenmemiştir. BM2 proteazda ise K^{1+} , Na^{1+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} iyonlarının aktivite üzerine etkisinin *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enzimi ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. Nilegaonkar ve arkadaşlarının (2007) *Bacillus cereus* MCM B-326 ile yaptıkları çalışmada ise *Bacillus circulans* M34'e benzer şekilde Mn^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarının inhibitör etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Jaswal ve Kocher (2007) ise *Bacillus circulans*'la yaptıkları çalışmada ise *Bacillus circulans* M34'e benzer şekilde Zn^{2+} ve Co^{2+} iyonlarının aktivatör etkisi gösterdiği görülmüştür. Doddapaneni ve

arkadaşlarının (2009) *Bacillus cereus*'dan saflaştırdıkları proteazın ise *Bacillus circulans* M34'e benzer şekilde Zn^{2+} , Cu^{2+} ve Co^{2+} iyonları ile aktivitesi artmıştır.

Bacillus circulans M34'den saflaştırılan proteaz enziminin organik çözücüler varlığında kararlılığı incelendiğinde ise; etanol varlığında enzim aktivitesinde %8'lik bir artış gözlenirken ksilen varlığında enzimin %79 inhibe olduğu görülmüştür. Toluen, DMSO ve bütanol varlığında ise enzim aktiviteleri sırasıyla %94, %94 ve %86 oranında korunmuştur. Aseton ve benzen ise diğer organik çözücülere göre biraz daha fazla inhibitör etkisi göstererek enzim aktivitesinde sırasıyla %35 ve %22'lik bir düşüşe neden olmuştur. Reddy ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları çalışmada *Bacillus sp.* RKY3'den elde ettikleri proteazın; DMSO, etanol, aseton, benzen, bütanol ve toluen varlığında aktivitesinin sırasıyla %93, %75, %34, %109, %37 ve %107 oranında değiştiği bildirilmiştir. *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteazın; DMSO, etanol, aseton ve bütanol varlığında *Bacillus sp.* RKY3'den elde edilen proteazdan daha iyi bir kararlılık sergilediği görülmüştür. Ancak benzen ve toluen varlığında bu durumun tersi söz konusudur. Rahman ve arkadaşların (2006) *Pseudomonas aeruginosa*'tan saflaştırdıkları proteaz üzerine organik çözücülerin etkisini incelemiş ve benzen, toluen ve ksilen varlığında aktivitenin sırasıyla 1.3, 1.14 ve 1.19 kat attığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteazla karşılaştırıldığında; *Pseudomonas aeruginosa*'tan saflaştırdıkları proteazın organik çözücülere karşı daha kararlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Shah ve arkadaşlarının (2010) *Bacillus cereus*'tan saflaştırdıkları proteaz ise DMSO ve etanol varlığında bir saatlik inkübasyon sonrasında aktivitesinin sırasıyla %70 ve %80'ini korumuştur. Ksilen, toluen, ve benzen varlığında aktivite artış gözlenirken bütanol varlığında aktivitede ciddi bir düşüş söz konusudur. Bu verilerden; *Bacillus circulans* M34 proteazının DMSO, etanol ve bütanol varlığında daha kararlı olduğu ancak ksilen, toluen ve benzen varlığında *Bacillus cereus* proteazının daha kararlı olduğu görülmüştür. Bu incelemeler *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteazın organik çözücüler karşısında kararlı olduğunu göstermiştir.

Çalışmada kullanılan proteaz enzime yüzey aktif ajanların ve hidrojen peroksitin etkisini belirlemek için SDS, Tween-80, Triton X-100, %2'lik ve %5'lik H_2O_2 kullanılmıştır. *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteazın; Tween-80 ve %2'lik

H₂O₂ varlığında aktivitesinde sırasıyla %6 ve %5 artış gözlenmiştir. %1'lik Triton X-100 ve %5'lik H₂O₂ varlığında ise aktivitede sırasıyla %28 ve %32 düşüş gözlenmiştir. %1'lik SDS varlığında ise enzim ciddi bir aktivite kaybına uğramış ve aktivitesinin %81'ini kaybetmiştir. Reddy ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları çalışmada *Bacillus sp.* RKY3'den elde ettikleri proteazın aktivitesinde; %2'lik H₂O₂, %1'lik Tween 80 ve Triton X-100 varlığında sırasıyla %19, %17 ve %24'lük bir artış gözlenmiştir. Ancak %1'lik SDS ve varlığında aktivitede %23'lük bir düşüş gözlenmiştir. Bu verilere göre *Bacillus sp.* RKY3'den elde edilen proteazın yüzey aktif maddeler ve yükseltgenler karşısında *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteazdan daha kararlı olduğunu göstermiştir. Bunun yanı sıra her iki proteaz içinde; %2'lik H₂O₂ ve Tween 80 aktivatör etkisi gösterirken SDS inhibitör etkisi göstermiştir. Venugopal ve Saramma (2007) *Bacillus circulans* BM15'den elde ettikleri proteaz aktivitesinde ise; %1, 2, 3 ve 4'lük H₂O₂ varlığında sırasıyla %4, 13, 28, 16 artış olduğu bildirilmiştir. Bunun yanı sıra %0.05, 0.1, 0.2 ve 0.4 SDS varlığında enzim aktivitesi kontrole göre sırasıyla % 70, 66, 68 ve 56 olacak şekilde değişmiştir. %0.1, 0.4, 0.7 ve 1'lik Triton X 100 varlığında ise enzim aktivitesi kontrole göre sırasıyla %69, 94, 103 ve 72 olacak şekilde değişmiştir. *Bacillus circulans* M34'den elde edilen proteazda %2'lik H₂O₂ varlığında aktivitede artış olması ama %5'lik H₂O₂ varlığında aktivitenin azalmış olması, *Bacillus circulans* BM15'den elde edilen proteazda %3'lik H₂O₂ varlığında aktivitede %28 artış olurken %4'lik H₂O₂ varlığında aktivitenin %16'lık bir artışla daha düşük bir sonuç vermesi ile çok benzerdir. Aynı şekilde %0,4'lük SDS varlığında *Bacillus circulans* BM15 proteazının aktivitesinde görülen %44'lük kayıp; %2'lik SDS varlığında *Bacillus circulans* M34 proteazın aktivitesinde görülen %81'lik kayıpla çok uyumludur. %1'lik Triton X-100 ise hem *Bacillus circulans* BM15 proteazı hem de *Bacillus circulans* M34 proteazı aynı oranda (%28) inhibe etmiştir. Haddar ve arkadaşlarının (2009) *Bacillus mojavensis* A21'den saflaştırdıkları BM1 ve BM2 olarak adlandırdıkları proteazların %1'lik Tween 80 varlığında aktivitelerindeki kayıpları sırasıyla %6 ve %8 olarak bildirmişleridir. BM1 ve BM2'nin %1'lik Triton X-100 varlığında aktivitelerindeki kayıplar ise %17 ve %20 olarak tespit edilmiştir. BM1 ve BM2'nin %1'lik SDS varlığında enzim aktiviteleri kontrole göre sırasıyla %49 ve 83 olacak şekilde değişmiştir. BM1 proteazın; %1'lik ve %5'lik H₂O₂ varlığında aktivitesindeki kayıp sırasıyla %30 ve %62 olarak gösterilmiştir. BM2 proteazın ise; %1'lik ve %5'lik H₂O₂

varlığında aktivitesindeki kayıp sırasıyla %24 ve %60 olarak bildirilmiştir. Bu verilere göre; Tween 80 ve H₂O₂ varlığında *Bacillus circulans* M34 daha kararlı dururken, SDS ve Triton X-100 varlığında BM1 ve BM2 daha kararlı kalmışlardır. Kumar ve arkadaşlarının (1999) *Bacillus spp.*'den saflaştırdıkları AP1 ve AP2 olarak adlandırdıkları proteazların aktivitesinde ise %1'lik Triton X-100 varlığında sırasıyla %39 ve %14 artış gözlenmiştir. AP1 ve AP2'nin %0,5'lik SDS varlığında ise enzim aktiviteleri kontrole göre sırasıyla %4 ve 3 olacak şekilde değişmiştir. Bu sonuçlar; AP1 ve AP2'nin *Bacillus circulans* M34 proteazdan, Triton X-100 varlığında daha kararlı olduğunu ancak SDS varlığında daha düşük bir kararlılığa sahip olduğunu göstermektedir. Rao ve arkadaşlarının (2009) *Bacillus circulans*'tan saflaştırdıkları proteaz ise %1'lik Triton X-100, SDS ve H₂O₂ varlığında kontrole göre sırasıyla %115, 75 ve 105 olacak şekilde değişen bir aktivite göstermiştir. Rao ve arkadaşlarının saflaştırdıkları proteaz Triton X-100 ve SDS varlığında bu çalışmada saflaştırılan proteaza göre daha kararlı bir yapı sergilemişlerdir. Ancak H₂O₂ varlığında *Bacillus circulans* M34 proteaz ile benzer bir kararlılık sergilemişlerdir.

Bacillus circulans M34'ten saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara karşı spesifitesini belirlemek amacıyla %0,6'lık (w/v) keratin, sığır serum albumini (BSA), jelatin, ovalbumin ve kazeinden oluşan protein substratları kullanılmıştır. Sonuçlara göre *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin en iyi aktiviteyi kazein substratına karşı gösterdiği görülmüştür. Reddy ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları çalışmada *Bacillus sp.* RKY3'den elde ettikleri proteazın substrat spesifitesi çalışmalarında gösterdikleri aktiviteler belirlenmiştir. *Bacillus sp.* RKY3 proteazın; kazein, BSA ve jelatin için gösterdiği aktiviteler sırasıyla %100, 47 ve 35 olarak bildirilmiştir. *Bacillus circulans* M34 proteaz için ise; kazein, BSA ve jelatin için bu değerler %100, 41 ve 11 olarak bulunmuştur. Bu veriler iki proteazın birbiriyle uyumlu sonuçlar verdiğini göstermektedir. Kumar ve arkadaşları (1999) *Bacillus spp.*'den saflaştırdıkları AP1 ve AP2 olarak adlandırdıkları proteazların doğal substratlara karşı spesifitesini belirlemişlerdir. AP1 bu değerler için kazein, albumin ve keratin spesifitesi sırasıyla %100, 8.1 ve 0.05 olarak bildirilirken AP2 için %100, 7.8 ve 0.03 olarak bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre *Bacillus circulans* M34 proteazın albumin ve keratine karşı olan spesifitesi daha yüksektir. Nilegaonkar ve arkadaşlarının (2007) *Bacillus*

cereus MCM B-326 ile yaptıkları çalışmada ise enzimin kazein ve BSA için spesifitesi sırasıyla %100 ve 40 olarak tespit edilmiştir. Enzim keratin ve jelatin substratlarını ise hidrolize etmemiştir. Kazein ve BSA substratı için *Bacillus cereus* MCM B-326 proteazla aynı sonuçları veren *Bacillus circulans* M34 proteazı keratin ve jelatin söz konusu olduğunda daha yüksek bir spesifite sergilemiştir. Literatürdeki bu sonuçlar *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteazla büyük ölçüde benzerlik göstermektedir.

Bacillus circulans M34'den saflaştırılan proteaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi incelenmiştir. 5mM'lık PMSF varlığında %95 inhibe olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra enzim aktivitesinde; 5mM EDTA varlığında %27'lik, 5mM üre varlığında %16'lık ve 5mM DTT varlığında %9'luk bir kayıp gözlenmiştir. 2mM'lık β -Mercaptoethanol varlığı ise enzim aktivitesini etkilememiştir. Enzimin serin spesifik inhibitörü olan PMSF ile tamamen inhibe olması enzimin bir serin proteaz olduğu ve EDTA varlığında meydana gelen aktivite kaybının ise enzimin metal bağlama bölgesine sahip olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır. Proteinlerin sistein kalıntıları arasında meydana gelen disülfüt bağlarını kıran DTT ve β -Mercaptoethanol varlığında aktivitede bir azalmanın olmaması enzimin bir sistein proteaz olmadığını kanıtlamıştır. Reddy ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları *Bacillus sp.* RKY3'den proteaz saflaştırması çalışmasında saflaştırdıkları proteazın PMSF, EDTA ve β -Mercaptoethanol varlığında kalan aktiviteleri sırasıyla %0, 64 ve 95 olarak bildirilmiştir. Bu verilerden yola çıkarak enzimin bir serin proteaz olduğunu düşündüklerini bildirmişlerdir. Bu sonuçların; serin proteaz olduğu düşünülen *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enzimi ile tutarlı olduğu görülmüştür. Venugopal ve Saramma (2007) *Bacillus circulans* BM15'den elde ettikleri proteazın ise PMSF, EDTA, DTT, üre ve β -Mercaptoethanol varlığında enzim aktivitesi kontrole göre sırasıyla %12, 6, 114 ve 66 olacak şekilde değişmiştir. Ancak enzim metallo proteaz spesifik inhibitörü Phenanthroline tarafından inhibe edilmediğinden enzimin serin proteaz olduğu ancak metal bağlama bölgesinin olduğu düşünülmüştür. Bu verilerin *Bacillus circulans* M34'den elde edilen proteaz ile tutarlı olduğu görülmüştür. Haddar ve arkadaşlarının (2009) *Bacillus mojavensis* A21'den saflaştırdıkları BM1 ve BM2 olarak adlandırdıkları proteazların 5mM'lık PMSF varlığında aktivitelerini tamamen yitirdikleri bildirmiştir. 5mM'lık EDTA

varlığında ise BM1 ve BM2 için enzim aktiviteleri sırasıyla %72 ve 68 olarak tespit edilmiştir. β -Mercaptoethanol ve DTNB varlığında her iki enziminde aktivitesinde bir düşüş gözlenmemiştir. Bu çalışmalar sonucu Haddar ve arkadaşları BM1 ve BM2 olarak adlandırdıkları proteazların serin proteaz olduğunu düşünmüştür. Bu verilerin *Bacillus circulans* M34'ten saflaştırılan proteaz ile uyum içerisinde olduğu görülmüştür. Rao ve arkadaşlarının (2009) *Bacillus circulans*'tan saflaştırdıkları proteaz ise 5mM'lık PMSF varlığında aktivitesini %98 kaybederken 5mM'lık EDTA varlığında aktivitesinde yalnızca %2'lik bir kayıp gözlenmiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak Rao ve arkadaşları saflaştırdıkları proteazın serin proteaz olduğu tespit etmişlerdir. Bu literatür taramaları *Bacillus circulans* M34'ten saflaştırılan proteaz enziminin bir serin proteaz sınıflandırılabilirliğini göstermektedir.

Bacillus circulans M34'den saflaştırılan proteaz enziminin, kazein varlığında kinetik sabitlerinin (K_m ve V_m) belirlenmesi için Lineweaver-Burk grafiği kullanılmış ve bu değerler sırasıyla 0,96 mg/ml ve 9,548 $\mu\text{mol ml}^{-1} \text{dk}^{-1}$ olarak bulunmuştur. K_m değeri enzimin substrata ilgisinin bir ölçüsüdür. K_m değeri ne kadar küçükse enzimin substrata olan ilgiside o kadar büyüktür. Literatürde bulunan bazı çalışmaların K_m ve V_m değerleri taranmış ve *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin değerleri ile karşılaştırılmıştır. Kazan ve arkadaşlarının (2005) yürüttüğü *Bacillus clausii* GMB AE 42'den proteaz saflaştırılması çalışmasında saflaştırılan proteazın K_m değeri 0,655 μM olarak tespit edilmiştir. Joo ve Chang'ın (2005) yaptığı *Bacillus clausii* I-52'den proteaz saflaştırılması çalışmasında ise K_m değeri 83,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ olarak bildirilmiştir. Towatana ve arkadaşlarının (1999) *Bacillus sp.* PS7 19'dan saflaştırdıkları proteazın ise K_m ve V_m değerleri sırasıyla 0,6mM ve 1.0 $\text{mol.min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Rao ve arkadaşlarının (2009) *Bacillus circulans*'tan saflaştırdıkları proteazın K_m 'si 0.597 mg ml^{-1} ve V_{max} 'ı ise 13825 mmol min^{-1} olarak bildirilmiştir. Bu verilere bakıldığında *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin substrata ilgisinin literatürde bulunan bu çalışmalarda proteaz enzimlerine göre daha küçük olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak *Bacillus circulans* M34'ten Q Sepharose anyon değişim kromatografisi ile elde edilen proteazın saflaştırma katsayısının literatürdeki diğer çalışmalara kıyasla daha düşük olduğu ancak veriminin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bacitracin-

Sepharose 4B afinite kromatografisi ile elde edilen proteazın ise literatürdeki diğer çalışmalara oranla daha yüksek bir saflık ve verimle elde edildiği görülmüştür. 27,5 kDa molekül kütlesine sahip olan *Bacillus circulans* M34 proteazın literatürle tutarlı olduğu belirlenmiştir. Enzimin optimum sıcaklığının 50 °C olduğu ve kararlılığının literatürdeki diğer çalışmalara oranla daha zayıf olduğu görülmüştür. Enzimin optimum pH'ının 11 olduğu ve kararlılığının literatürdeki diğer çalışmalara oranla daha düşük olduğu görülmüştür. Enzim metal iyonları ile muamele edildiğinde ise kararlılığını büyük oranda korumuş Zn^{2+} varlığında ise aktivitesi artmıştır. Organik çözeltiler varlığında ise enzimin stabilitesini koruduğu belirlenmiştir. Enzimin SDS haricinde yüzey aktif maddelere ve oksitleyici reaktiflere karşı kararlı olduğu görülmüştür. En yüksek spesifiteyi kazeine karşı gösteren enzimin serin spesifik inhibitörü olan PMSF ile tamamen inhibe olması serin proteaz olduğunu düşündürmüştür. *Bacillus circulans* M34'den saflaştırılan proteaz enziminin K_m değeri incelendiğinde substrata olan ilgisinin literatürdeki diğer çalışmalara göre daha az olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

- Avcı Duman, Y. 2008. *Bacillus clausii* Alkalen Proteazı'nın Su ile Karışabilen Organik Çözücüler Varlığında Kinetik ve Termodinamik Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, Sayfa: 3-36.
- Beg, Q. and Gupta, R. 2003. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 294-304.
- Bulut, Ş. 2007. Marinal Bakteri *Teredinobacter Turnirae*' den Proteaz Üretimi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, Sayfa: 14-24.
- Castro, H., Abreu, P., Geraldo, R., Martins, R., Santos, R., Loureiro, N., Cabral, L. and Rodrigues, C. 2010. Looking at the proteases from a simple perspective. *Journal of Molecular Recognition*, 24, 165-181.
- Cera, D. E. 2009. Serine proteases. *IUBMB Life*, 61 (5), 510-515
- Chou, K. C. and Cai, Y. D. 2006. Prediction of protease types in a hybridization space. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339, 1015–1020.
- Ciechanover, A. 2010. Vücudumuz Her Ay Yenileniyor Proteinlerimizi Yıkıyoruz (çeviri: İkinci, Ö.), Bilim Teknik, 76-79 s., Ankara.
- Çaklı, Ş. 1999. Bazı su ürünlerinde proteolitik enzim aktiviteleri (Katepsin D ve Kazein Test). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 23, 385-390.
- Çelik, N. 2006. *Bacillus clausii* GMBAE 42'den Saflaştırılan Alkalen Proteazın Termal İnaktivasyon Kinetiğinin Belirlenmesi ve Cu^{2+} İyonları ile Termostabilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, Sayfa: 5-24.
- Deng, A., Wu, J., Zhang, Y., Zhang, G. and Wen, T. 2010. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus sp.* B001. *Bioresource Technology*, 101, 7100–7106.
- Doddapaneni, K., Tatineni, R., Vellanki, R., Rachcha, S., Anabrolu, N., Narakuti, V. and Mangamoori, L. 2009. Purification and characterization of a solvent and detergent-stable novel protease from *Bacillus cereus*. *Microbiological Research*, 164, 383—390.

- Duran, E. D. 2006. Peynir üretiminde kullanılabilirliğinin araştırılması amacıyla kapari (*capparis spinosa*) bitkisinin kapsüllerinden proteaz enziminin saflaştırılması ve tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, Sayfa: 1-18.
- Garrett, R. H. and Grisham, C. M. 2010. Biochemistry. Brooks/Cole Cengage Learning, 500-532, USA.
- Genckal, H. and Tari, C. 2006. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. Enzyme and Microbial Technology, 39, 703-710.
- Gessesse, A., Kaul, R., Gashe, B. and Mattiasson, B. 2003. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. Enzyme and Microbial Technology, 32, 519-524.
- Ghafoor, A. and Hasnain, S. 2010. Purification and characterization of an extracellular protease from *Bacillus subtilis* EAG-2 strain isolated from ornamental plant nursey. Polish Journal of Microbiology, 59(2), 107-112.
- Gheorghiu Alpan, L. 2008. Bazı Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin Alkali Proteazlarının Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Sayfa: 5-13.
- Ghorbel, B., Kamoun, A. and Nasri, M. 2003. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. Enzyme and Microbial Technology, 32, 513-518.
- Haddar, A., Agrebi, R., Bougatef, A., Hmidet, N. and Kamoun, A. 2009. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavenis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. Bioresource Technology, 100, 3366-3373
- Haddar, A., Bougatef, A., Agrebi, R., Kamoun, A. and Hmidet, N. 2009. A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavenis* A21. Purification and characterization. Process Biochemistry, 44, 29–35.
- Harem, M. 2005. Mast hücre proteazları ve biyolojik önemi. Sağlık Bilimleri Dergisi, 14(1), 61-67.

- Huang, Q., Peng, Y., Li, X., Wang, H. and Zhang, Y. 2003. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. *Current Microbiology*, 46, 169–173.
- Jaswal, R., Kocher, G. and Virk, M. 2008. Production of alkaline protease by *Bacillus circulans* using agricultural residues: A statistical approach. *Indian Journal of Biotechnology*, 7, 356-360.
- Joo, H. and Chang, C. 2005. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from a halo-tolerant *Bacillus clausii* I-52: enhanced production and simple purification. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 491-497.
- Kasavi, C. 2006. Kovalent Bağlanma ve Fiziksel Adsorpsiyon Metotları ile Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Sayfa: 3-11.
- Kazan, D., Denizci, A., Öner, M. and Erarslan, A. 2005. Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42. *The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32, 335-344.
- Kerimak Öner, N. M. 2008. Zorunlu Alkalifilik *Bacillus marmariensis* GMBE 72 Soyundan İzole Edilen Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, Sayfa: 3-50.
- Khan, A., Williams, K., Molloy, M. and Nevalainen, H. 2003. Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. *Protein Expression and Purification*, 32, 210–220.
- Kim, S., Kim, Y. and Rhee, I. 2001. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Bacillus cereus* KCTC 3674. *Archives of Microbiology*, 175, 458–461.
- Kocher, G. and Jaswal, R. 2007. Partial characterization of a crude alkaline protease from *Bacillus circulans* and its detergent compatibility. *The Internet Journal of Microbiology*, 4(1), 1-13.
- Kumar, C., Tiwari, M. and Jany, K. 1999. Novel alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus* spp.: purification and some properties. *Process Biochemistry*, 32, 441–449.

- Mahajan, R. and Badgujar, S. 2010. Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. *Journal of Pharmacy Research*, 3(9), 2048-2068.
- Nilegaonkar, S., Zambare, V., Kanekar, P., Dhakephalkar, P. and Sarnaik, S. 2007. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresource Technology*, 98, 1238–1245.
- Oberoi, R., Beg, Q., Puri, S., Saxena, R. and Gupta, R. 2001. Characterization and wash performance analysis of an SDS-stable alkaline protease from a *Bacillus* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 493-497.
- Olajuyigbe, F. M. and Ajele, O. 2008. Some Properties of Extracellular Protease from *Bacillus licheniformis* Lbbl-11 Isolated from “iru”, A Traditionally Fermented African Locust Bean Condiment. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 3 (1), 42-46.
- Özçömlekçi, E. 2006. Proteaz Enziminin Glutaraldehit Kullanarak Kovalent Baglanma ile İmmobilizasyonunda Optimum Şartların Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Sayfa: 1-8.
- Öztürk. S. 2007. Ülkemizden İzole Edilen *Bacillus licheniformis* BA17'den Elde Edilen Alkalen Proteaz Enzimimn Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Sayfa: 1-7.
- Page, M. J. and Cera, E. 2008. Serine peptidases: Classification, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 1220–1236.
- Paoletti, M., Castroviejo, M., Bégueret, J. and Clavé, C. 2001. Identification and characterization of a gene encoding a subtilisin-like serine protease induced during the vegetative incompatibility reaction in *Podospora anserina*. *Current Genetics*, 39, 244-252.
- Polaina, J. and MacCabe, A. P. 2007. *Industrial Enzymes Structure, Function and Applications*. Springer, 161-243, Spain.
- Prakasham, R., Rao, S., Rao, R. and Sarma, P. 2005. Alkaline protease production by an isolated *Bacillus circulans* under solid-state fermentation using agroindustrial waste: process parameters optimization. *Biotechnol. Prog*, 21, 1380-1388.
- Rahman, R., Geok, L., Basri, M. and Salleh, A. 2006. An organic solvent-stable alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: Enzyme purification and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1484-1491

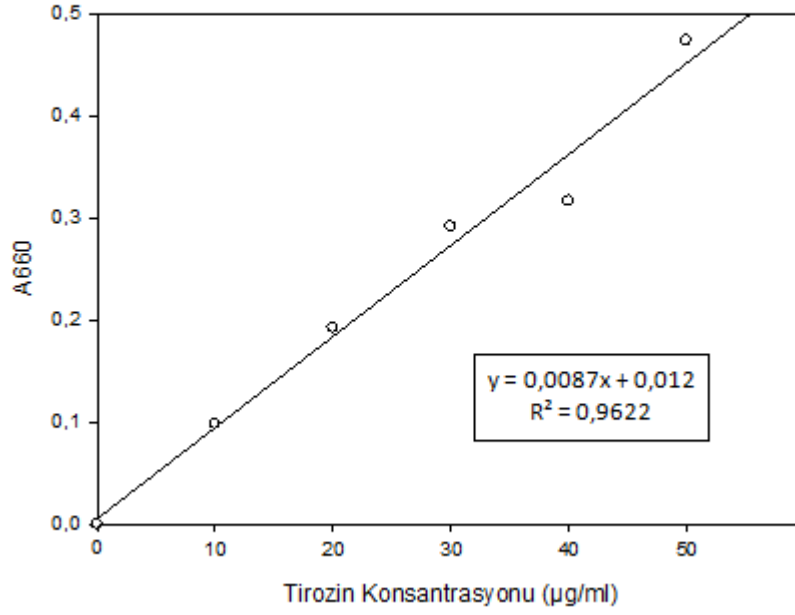
- Raksakulthai, R. and Haard, F. N. 2003. Exopeptidases and Their Application to Reduce Bitterness in Food: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (4), 401–445.
- Raksakulthai, R. and Haard, N. 2003. Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(4), 401–445.
- Ramakrishna, D., Reddy, G. and Rajagopal, S. 2010. Purification and properties of an extra-cellular alkaline protease produced by *Bacillus Subtilis* (MTTC N0-10110). *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6(4), 493-504.
- Rao, K. and Narasu, M. 2007. Alkaline protease from *Bacillus firmus* 7728. *African Journal of Biotechnology*, 6 (21), 2493-2496.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. and Deshpande, V.V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol 62, pp. 597-635.
- Rao, S., Sathish, T., Ravichandra, P. and Prakasham, R. 2009. Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. *Process Biochemistry*, 44, 262–268.
- Reddy, L. Wee, Y. and Ryu, H. 2008. Purification and characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus* sp. RKY3. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83, 1526-1533.
- Sareen, R. and Mishra, P. 2008. Purification and characterization of organic solvent stable protease from *Bacillus licheniformis* RSP-09-37. *Appl Microbiol Biotechnol*, 79, 399–405.
- Sarıkaya, B. S. 2006. Yabani çuha (*Primula veris*) bitkisinin çiçeklerinden proteaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve peynir üretiminde kullanılabilirliğinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, Sayfa: 1-18.
- Sevinç, N. 2010. Türkiye Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* sp. Suşlarından Proteaz Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, Sayfa: 5-30.
- Shah, K., Mody, K., Keshri, J. and Jha, B. 2010. Purification and characterization of a solvent, detergent and oxidizing agent tolerant protease from *Bacillus cereus*

- isolated from the Gulf of Khambhat. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67, 85-91.
- Sharmin, F. and Rahman, M. 2007. Isolation and characterization of protease producing *Bacillus strain FS-1*. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, 9, 1-10.
- Shen, H. and Chou, K. 2009. Identification of proteases and their types. *Analytical Biochemistry*, 385, 153–160.
- Singh, J., Batra, N. and Sobti, R. 2001. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus sp.* SSR1. *Process Biochemistry*, 36, 781–785.
- Singh, J., Vohra, R. and Sahoo, D. 1999. Alkaline protease from a new obligate alkalophilic isolate of *Bacillus sphaericus*. *Biotechnology Letters*, 21, 921-924.
- Takami, H., Akiba, T., Horikoshi, K. 1989. Production of extremely thermo stable alkaline protease from *Bacillus sp.* no. AH-101. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30, 120-124.
- Taşdelen, Ç. 2006. Proteaz Enziminin Fiziksel Adsorpsiyon, Kovalent ve İyonik Bağlanma Metotları ile İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Sayfa: 3-8.
- Temiz, F. 2007. Kahramanmaraş ili kağıt fabrikaları çevresindeki su ve toprak örneklerinden izole edilen selüloz üreticisi *Bacillus sp.* suşlarının farklı substratlar ve karbon kaynakları kullanılarak enzim üretme yeteneklerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, Sayfa: 1-3.
- Towatana, N., Painupong, A. and Suntinanalert, P. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus sp.* PS7 19. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87, 581-587
- Turk, B. 2006. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 785-799.
- Uyar, F., Porsuk, I., Kizil, G. and Yılmaz, E. 2011. Optimal conditions for production of extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* strain CA15. *EurAsian Journal of BioSciences*, 5, 1-9.

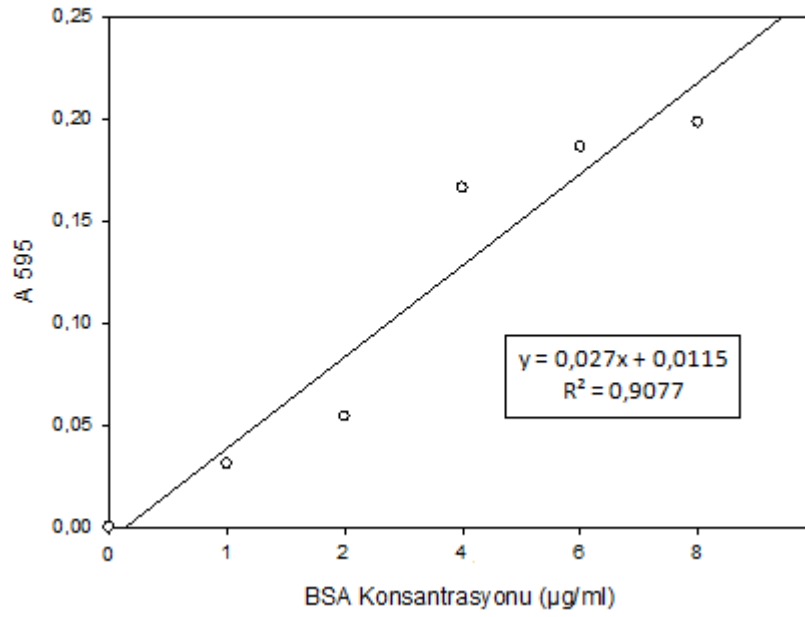
- Venugopal, M. and Saramma, A. 2007. An alkaline protease from *Bacillus circulans* BM15, newly isolated from a mangrove station: characterization and application in laundry detergent formulations. *Indian Journal of Microbiology*, 47, 298-303.
- Whitford, D. 2005. *Proteins Structure and Function*. John Wiley & Sons, 9-37, England.
- Władyka, B. and Pustelny, K. 2008. Regulation of bacterial protease activity. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 13, 212-219.
- Wolfe, M. 2009. Intramembrane-cleaving proteases. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(21), 13969–13973.
- Yang, J., Shih, I., Tzeng, Y. and Wang, S. 2000. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 406-413.
- Yapaşan, E. 2008. Partial purification and characterization of lipase enzyme from a *Pseudomonas* strain, Yüksek Lisans Tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Sayfa: 25-26.
- Yılmaz, M. 2003. Topraktan izole edilen *Bacillus* cinsi bakterilerin bazı metabolik özelliklerinin belirlenmesi, plazmid DNA ve protein profillerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Sayfa: 4-56.

EK 1 Tirozin ve Protein Standart Grafiği

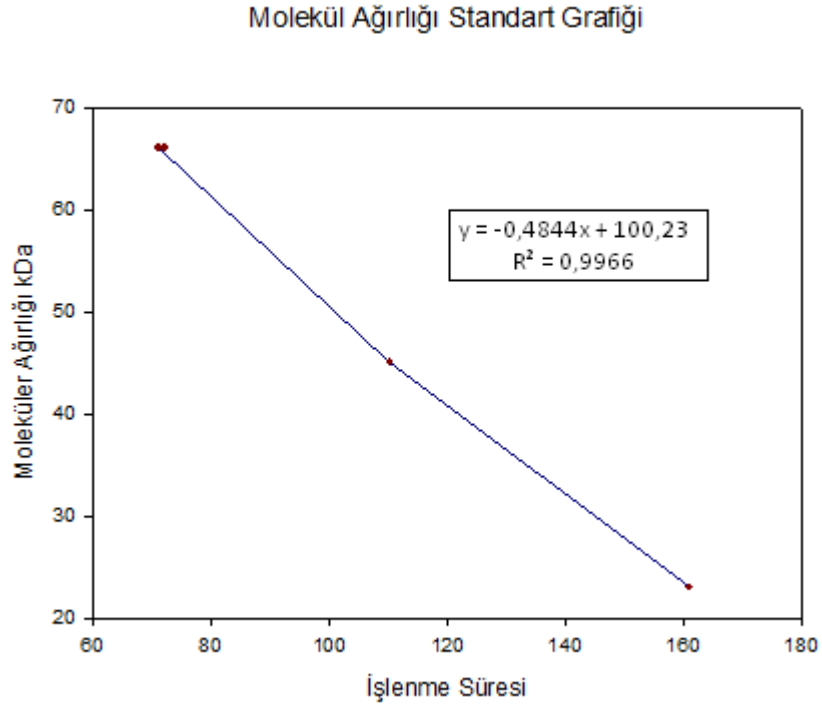
Proteaz Aktivitesi için Standart Tirozin Grafiği



Protein Standart Grafiği



EK 2 Jel Filtrasyon Kromatografisi Standart Grafiği



Standartlar	Moleküler Kütlesi kDa	İşlenme Süresi
BSA (Sığır Serum Albumini)	66,00	72,280
HSA (İnsan Serum Albumini)	66,01	71,100
Ovalbumin	45,00	110,40
Tripsin	23,00	161,00

Molekül Kütlesinin Bulunması İçin = (İşlenme Süresi x -0,4844) + 100,23

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Esmâ SARİ

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 09.09.1986

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Cemal ŞAŞMAZ Koleji, 2003

Lisans : Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Kimya
Öğretmenliği Bölümü (Haziran 2009)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya
Anabilim Dalı (Eylül 2010- Haziran 2011)