

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI POLİNÜKLEER METAL KOMPLEKSLERİNİN ALKALEN
PROTEAZ, PLAZMİD DNA ÜZERİNE ETKİLERİNİN VE
ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Şevkinaz KONAK

Danışman:Prof.Dr.İsmail ÖZMEN

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ISPARTA-2012

TEZ ONAYI

Şevkinaz KONAK tarafından hazırlanan “**Bazı Polinükleer Metal Komplekslerinin Alkalen Proteaz, Plazmid DNA Üzerine Etkilerinin ve Antioksidan Kapasitelerinin Araştırılması**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Süleyman Demirel Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof.Dr. İsmail ÖZMEN
Süleyman Demirel Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı



Jüri Üyeleri :

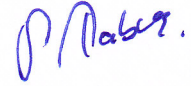
Doç.Dr. Fatma KARİPÇİN
Nevşehir Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı



Doç.Dr. Hakan AKTAŞ
Süleyman Demirel Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı



Yrd. Doç. Dr. Selma TABUR
Süleyman Demirel Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Yrd. Doç. Dr. Bülent DEDE
Süleyman Demirel Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı



Prof.Dr. Mehmet Cengiz KAYACAN

Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZİLGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xii
1.GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	4
1.1.1.Enzimlerin Sınıflandırılması	6
1.1.2.Proteazlar.....	7
1.1.2.1 Ekzopeptidazlar.....	11
1.1.2.2. Endopeptidazlar.....	13
1.1.3. Proteaz kaynakları	15
1.1.4. Endüstriyel açıdan alkali proteazlar	18
1.1.4.1. Süt teknolojisinde alkali proteazlar	19
1.1.4.2. Atık arıtımı ve dönüşümü	20
1.1.4.3. Deri endüstrisinde proteazlar	20
1.1.4.4. Deterjan endüstrisinde alkali proteazlar	21
1.1.4.5. Gıda sanayisinde proteazlar	22
1.1.4.6. Kozmetik ve ilaç sanayisinde proteazlar	22
1.1.5. Tez çalışmasında kullanılan <i>Bacillus subtilis</i> 'in özellikleri.....	23
1.2.Schiff Bazları	23
1.2.1. Schiff bazlarının metal kompleksleri	24
1.2.2. Schiff bazı komplekslerinin kullanım alanları	26
1.3.Plazmid DNA	28
1.3.1. Plazmidlerin yapısı.....	29
1.3.2. Plazmidlerin sınıflandırılması	32
1.3.2.1. Büyüklüklerine göre sınıflandırma	32

1.3.2.2. Uyum durumlarına göre sınıflandırma.....	33
1.3.2.3. Konjugatif özelliklerine göre sınıflandırma	33
1.3.2.4. Taşıdıkları özel sekanslara göre sınıflandırma.....	34
1.3.3. Plazmidin boyutsal tanımı ve hücre içindeki miktarı.....	35
1.3.4. Plazmid DNA'nın fonksiyonları ve kullanım alanları	35
1.3.5. Plasmidlerin bakteride saptanması.....	36
1.4. Serbest Radikaller	37
1.4.1. Nükleik asidlere ve DNA'ya etkisi	38
1.5. Antioksidanlar	39
1.5.1. Antioksidanların etki mekanizmaları	40
1.5.2. Antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler	41
1.5.1.1. Toplam antioksidan aktivite tayin metodu (β -Karoten-Linoleik asit sistemi)	42
1.5.1.2. Serbest radikal giderim aktivite (DPPH) tayin metodu.....	42
2. KAYNAK ÖZETLERİ	44
3. MATERYAL VE YÖNTEM	48
3.1 Kullanılan Maddeler.....	48
3.2. Kullanılan Metal Kompleks ve Ligandlar.....	48
3.3. Kullanılan Aletler.....	50
3.4. Deneysel Bölüm	50
3.4.1. Proteaz enziminin saflaştırılması	50
3.4.1.1. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 suşunun büyütülmesi	50
3.4.2. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	51
3.4.3. Jel filtrasyon kromatografisi	53
3.4.4. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile alkalen proteaz enzimin moleküler ağırlığının tayini	54
3.4.5. Alkalen proteaz aktivitesi ölçümü.....	56
3.4.6. Lowry yöntemi ile protein tayini.....	56
3.4.7. Antioksidan yöntemler	58
3.4.7.1. DPPH radikali süpürme aktivitesi.....	58
3.4.7.2. β -karoten-linoleik asit yöntemi	58

3.4.8. Agaroz jel elektroforezi.....	59
4.ARAŞTIRMA BULGULARI	63
4.1. <i>Basillus subtilis</i> ATCC 6633 Suşundan Alkalen Proteazın Saflaştırılması	63
4.2. Alkalen Proteaz Aktivitesi Ölçümü	63
4.3. Lowry Yöntemi ile Protein Tayini	64
4.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	64
4.5. Proteaz Enzimi Üzerine İn Vitro Polinükleer Metal Kompleksleri Çalışmaları.....	66
4.6. Antioksidan Yöntemler	69
4.6.1. DPPH radikali süpürme aktivitesi.....	69
4.6.2. β -karoten-linoleik asit yöntemi	73
4.7. Agaroz Jel Elektroforezi İle Metal Komplekslerin Ve Ligandların Plazmid DNA Üzerine Etkileri	74
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	75
5.1. Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırılması	75
5.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) İle Alkalen Proteaz Enzimin Moleküler Ağırlığının Tayini	76
5.3. Proteaz Enzimi Üzerine İn Vitro Polinükleer Metal Kompleksleri Çalışmaları.....	77
5.4. Antioksidan Yöntemler	78
5.5. Agaroz Jel Elektroforezi İle Metal Komplekslerin Ve Ligandların Plazmid DNA Üzerine Etkileri	79
6. KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ	95

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI POLİNÜKLEER METAL KOMPLEKSLERİNİN ALKALEN PROTEAZ, PLAZMİD DNA ÜZERİNE ETKİLERİNİN VE ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Şevkinaz KONAK

Süleyman Demirel Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İsmail ÖZMEN

Bu çalışmada bazı metal komplekslerinin, *Bacillus subtilis*'den izole edilen alkalen proteaz enzimi ve plazmid DNA üzerine etkileri araştırılmış ve antioksidan özellikleri incelenmiştir. Alkalen proteaz üretimi uygun besi ortamında, *Bacillus subtilis*'in 37°C'de ve 180 rpm çalkalama hızında 24 saat büyütülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon kromatografisi adımları ile enzim %9,9 verimde ve 69,6 kat saflaştırılmıştır. SDS-PAGE elektroforez sonrası tek bant gözlenmiş ve protein molekülünün 30,0 kDa ağırlığında olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, komplekslerin proteaz enzim aktivitesi üzerinde aktive edici bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. BHA'ya göre kıyaslandığında homo ve heterodinükleer bakır içeren komplekslerden B₂'nin antioksidan aktivitesi diğer metal kompleksler ve ligandlardan daha fazladır. B₂'den sonra en iyi antioksidan aktivite gösteren metal kompleksi B₃, ligand B₁'dir. Çalışmamızda homo ve heterodinükleer bakır içeren komplekslerin DNA'nın doğrusal formunu arttırdığı ve ortama hidrojen peroksidin ilave

edilmesi ile bu komplekslerin etkinliklerinin arttığı ve süper sarmal yapının oldukça açıldığı gözlenmiştir. Bunlardan bazılarının DNA'yı tamamen parçaladığı bazılarının ise hidrojen peroksit ilavesi ile süper sarmal yapıyı tamamen parçaladığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Alkaline proteaz, *Bacillus subtilis*, Schiff bazı, antioksidan, plazmid DNA.

2012, 109 sayfa

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

INVESTIGATION OF EFFECTS ON ALKALEN PROTEASE AND PLASMID DNA OF POLYNUCLEAR METAL COMPLEXES AND ANTIOXIDANT CAPACITY

Şevkinaz KONAK

**Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Chemistry**

Supervisor: Prof.Dr. İsmail ÖZMEN

In this study, the effects of some metal complexes on alkaline protease enzyme isolated from *Bacillus subtilis* and plasmid DNA were researched and also their antioxidant features were investigated. The production of alkaline protease enzyme was performed with the growth of *Bacillus subtilis* at 37°C and at a shaking rate of 180rpm in 24 hours. With the ammonium sulfate precipitation and gel-filtration chromatography steps, the enzyme was refined at 9,9 % of yield and 69,6 fold. After SDS-PAGE electrophoresis, single band was observed and it was determined that the protein molecule was weighted at 30,0 kDa.

In our study, it was determined that the complexes increased the activity of protease enzyme. According to BHA, when compared, the antioxidant activity of B₂ from homo and heteronuclear complexes containing copper is more than the activity of other metal complexes and ligands. The metal complex, performing the best antioxidant activity subsequent to B₂, is B₃ and the ligand is B₁. In this study, it was observed that homo and

heteronuclear complexes containing copper raised the linear form of DNA and with the addition of hydrogen peroxide, the efficiency of these complexes was increased and the super coiling was unwind. It was also observed that some of these completely lysed DNA and some others lysed the super coiling with the addition of hydrogen peroxide. In conclusion, it was determined that the complexes has an activating effect on enzyme activity.

Key words: Alkaline protease, *Bacillus subtilis*, Schiff base, antioxidant, plasmid DNA.
2012, 109 pages

TEŞEKKÜR

Doktora tezimi yöneten, tez konumun belirlenmesinden başlayarak çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm ve bana her zaman destek olan değerli danışman hocam Prof.Dr. İsmail ÖZMEN'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez süresince çalışmalarımı izleyen ve yönlendiren Tez İzleme Komitesi Üyeleri Doç.Dr. Hakan AKTAŞ ve Yard. Doç.Dr. Selma TABUR'a teşekkürü bir borç bilirim.

Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde sentezlediği metal kompleksleri, çalışmamızda kullanmamızı sağlayan Yard.Doç.Dr.Bülent DEDE'ye teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm eşim Hüseyin Yaşar KONAK ve Umut ÇELİKOĞLU'na teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında daima yanımda olarak beni destekleyen ve bugünlere gelmemde büyük emek ve çabaları olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

2146-D-10 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Şevkinaz KONAK

Isparta, 2012

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Çift zincirli DNA molekülü yapısı.....	29
Şekil 1.2. Plazmid DNA konformasyonları ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) görüntüsü.....	30
Şekil 1.3. Halkasal formda plazmid DNA ve süpersarmal yapının dallanmış ve dallanmamış formları.....	31
Şekil 1.4. Farklı σ parametresine sahip süpersarmal plazmid DNA şekilleri.....	31
Şekil 4.1. Tirozin standart grafiği.....	63
Şekil 4.2. Lowry metodu bovin serum albumin (BSA) standart grafiği.....	64
Şekil 4.3. <i>B. subtilis</i> 'den alkalen proteaz enziminin %3-8 kesikli SDS-PAGE elektroforez analizi.....	65
Şekil 4.4. A ₂ 'nin saflaştırılmış alkalen proteaz üzerine etkisi.....	66
Şekil 4.5. A ₃ 'ün saflaştırılmış alkalen proteaz üzerine etkisi.....	66
Şekil 4.6. B ₂ 'nin saflaştırılmış alkalen proteaz üzerine etkisi.....	67
Şekil 4.7. B ₃ 'ün saflaştırılmış alkalen proteaz üzerine etkisi.....	67
Şekil 4.8. Proteaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmasında kullanılan elüsyon grafiği.....	68
Şekil 4.9. Jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan proteaz enziminin elüsyondan elde edilen protein grafiği.....	68
Şekil 4.10. BHA'nın DPPH radikali süpürme aktivitesi.....	69
Şekil 4.11. B ₁ 'in DPPH radikali süpürme aktivitesi	69
Şekil 4.12. B ₂ 'nin DPPH radikali süpürme aktivitesi	70
Şekil 4.13. B ₃ 'ün DPPH radikali süpürme aktivitesi	70
Şekil 4.14. A ₁ 'in DPPH radikali süpürme aktivitesi	71
Şekil 4.15 A ₂ 'nin DPPH radikali süpürme aktivitesi	71
Şekil 4.16 A ₃ 'ün DPPH radikali süpürme aktivitesi	72
Şekil 4.17 Metal komplekslerin DPPH süpürme aktivitelerinin karşılaştırılması.....	72

Şekil 4.18 β -Karoten-linoleik asit yöntemi ile metal komplekslerin antioksidan özelliklerinin karşılaştırılması.....	73
Şekil 4.19. Agaroz jel elektroforezi ile metal komplekslerin ve ligandların plazmid DNA üzerine etkileri	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Mikrobiyal enzimlerin yıllık kullanım değerleri.....	10
Çizelge 1.2. Proteazların sınıflandırması.....	11
Çizelge 1.3. Farklı fiziksel karakteristikteki plazmid örnekleri	32
Çizelge 1.4. <i>E.Coli</i> hücreesindeki nükleik asitlerin ve diğer bileşenlerin karakterizasyonu.....	35
Çizelge 4.1. Amonyum sülfat çöktürmesi (% 80) ve jel filtrasyon kromatografi sonucu çökelek ve süpernatantda bulunan enzim aktivitesi ve protein içeriği.....	63

SİMGELER DİZİNİ

% - Yüzde Orantı

°C – Santigrat Derece

α - Alfa

β - Beta

BHA- Bütillenmiş Hidroksianizol

BSA - Bovine Serum Albumine

C - Karbon

cm – Santimetre

Cu^{2+} – Bakır İyonu

CuSO_4 – Bakır Sulfat

DNA - Deoksiribonukleik Asit

dk – Dakika

g – Gram

M – Molar

mg – Miligram

Mg^{2+} – Magnezyum İyonu

MgSO_4 – Magnezyum Sulfat

mL – Mililitre

nm – Nanometre

N - Azot

SDS-PAGE - Sodyum Dodesil Sulfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SDS - Sodyum Dodesil Sulfat

TEMED - n,n,n,n-Tetrametiletildiamin

UL – Mikrolitre

1.GİRİŞ

Enzimler biyolojik katalizör olmaları nedeni ile dünyamızdaki canlıların yaşamını olası kılan etmenlerin başında gelir. İnsanlar çok eski zamanlardan beri enzimlerden yararlanmaktadırlar. Örneğin; şarap, yoğurt, ekmek, sirke, boza yapımında organizmaların ürettiği enzimlerden yararlanılmaktadır. Son yıllarda biyoteknoloji, sağlık, gen teknolojisi, ekoloji gibi pek çok alandaki gelişmeler insanın enzimlere olan ihtiyacını her geçen gün arttırmaktadır (Godfrey and West, 1996).

Enzimler, enzimatik süreçlerin çevre kirliliğine daha az yol açmaları, kimyasal süreçleri daha ılımlı koşullarda ve ekonomik olarak gerçekleştirebilmeleri sebebi ile günümüzde her geçen gün daha da artarak birçok endüstri alanında kimyasal süreçlerin yerini almaktadır. Endüstriyel enzimler arasında %60'lık pazar payı ile en büyük grubu alkalen proteaz enzimleri oluşturmaktadır (Gençkal and Tari, 2006).

Enzimlerin teknoloji ve sanayide kullanımı için saflaştırılması gerekmektedir. Bu süreçte de gerek kolay üreyebilmeleri gerekse ürettikleri enzimlerin diğer organizmalara oranla daha kolay saflaştırılmaları nedeni ile biyoteknolojik süreçlerde mikroorganizmalar temel enzim kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bugüne kadar tanımlanan enzimlerin büyük çoğunluğu düşük sıcaklıkta ve dar bir pH aralığında çalışmaktadır ve bu nedenle endüstrinin tercih ettiği geniş pH aralığı ve yüksek sıcaklık koşullarında kullanılamamaktadır. Bu durum da endüstriyel talebi karşılayabilecek nitelikte yeni enzimlerin ve bu enzimleri üretebilecek mikroorganizmaların bulunmasını teşvik etmektedir. Ekstrem koşullardan izole edilen ekstremofil olarak adlandırılan mikroorganizmalar endüstrinin arzuladığı nitelikteki enzimlerin elde edilmesinde önemli bir kaynak olarak karşımıza çıkmaktadır (Anvar and Saleemuddin, 1998; Niehaus et al., 1999). *Bacillus* cinsinin de içinde bulunduğu ekstremofil özellikle birçok mikroorganizma bulunmaktadır ve *Bacillus* genusu üyeleri proteaz üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kumar and Takagi, 1999).

Alkalen proteazlar yüksek pH değerlerinde aktivite gösterebilen enzimlerdir. Bu nedenle deterjan sanayii başta olmak üzere gıda, sağlık ve deri endüstrilerinde geniş çapta kullanılmaktadır. Ayrıca boynuz, tüy ve saç gibi proteinlerin hidrolizinde ve bu proteinlerin kullanışlı biyokütleler haline getirilmesinde, X-ray filmlerindeki jelatinin hidroliziyle gümüşün geri kazanılmasında, tekstilde protein bağlı zincirlerin kaldırılmasında ve daha birçok endüstri alanında kullanılmaktadır. (Anvar and Saleemuddin, 1998; Kumar and Takagi, 1999).

Polinükleer metal komplekslerinin sentezinde ligand olarak kullanılan Schiff bazları konusuyla birçok bilim adamı ilgilenmiş ve çeşitli kompleksler elde etmişlerdir. Schiff bazlarının yapılarında bulunan gruplardan dolayı bunlardan elde edilen metal kompleksleri başta boya ve tekstil sektörü olmak üzere farklı endüstri dallarında kullanılmaktadır (Serin, 1980).

Schiff bazları metabolik faaliyetlerde de önemli reaksiyonlarda görev alır. Örneğin salisialdehit ve aminoasit türevli Schiff bazlarının geçiş metalleriyle oluşturmuş olduğu kompleksler, transaminasyon, dekarboksilasyon, α ve β eliminasyon gibi metabolik reaksiyonlarda kullanılır. Ayrıca 2-salisilidenaminotilamin Schiff bazının metalleriyle oluşturulan kompleksler sistein proteaz enziminin inhibitörü olarak kullanılır (Liu et al., 2009).

Schiff bazlı komplekslerinin antikanser aktivite göstermesi özelliğinden dolayı tıp dünyasındaki önemi giderek artmaktadır ve kanserle mücadelede reaktif olarak kullanılması araştırılmaktadır (Scovil et al., 1982; West and Pannell, 1989). Aromatik aminlerin Schiff bazı kompleksleri özellikle kemoterapi alanında (Singh and Rana, 1986) bazı kimyasal reaksiyonlarda çeşitli substratlara oksijen taşıyıcı olarak kullanılmaktadır (Tarafer and Miah, 1986).

Bazı geçiş materyallerinin nükleolitik aktivitelere sahip oldukları bilinmektedir. Bu redoks aktif bileşikler fizyolojik pH ve sıcaklıkta DNA moleküllerinin fosfodiester

iskeletini kırmaktadırlar (Sigman et al., 1979; McLachlan et al., 1996). Schiff bazlarının metal kompleksleri enzimler için birer model olup, bunun yanında biyolojik aktivite de göstermektedirler (Taş vd., 2005).

Cu(II) kompleksleri biyolojik aktivite bakımından oldukça önemlidir ve antitümör, antiviral ve antiinflamatuvar ajanları olarak bilinmektedirler. Özellikle Schiff baz ligandlarından oluşturulan Cu(II) kompleksleri biyolojik bakır sistemlerinin fiziksel ve kimyasal davranışlarının incelenmesinde önemli model bileşik olmuşlardır (Reddy and Reddy, 2000). 1,10-Fenantrolin'in Cu(II) kompleksi etkili bir şekilde nükleolitik aktivite gösteren ilk sentetik geçiş metal kompleksidir (Pope and Sigman, 1984). Bleomisin (Kane and Hecht, 1994), pirol (Borah et al., 1998), tiyoeter (Dülger et al., 2000), oksim (Sağlam et al., 2002), peptid (Garcia et al., 2003), imidazol (Gonzalez-Alvarez, et al., 2002) gibi bazı ligandlarında bakır kompleksleri DNA-yarıcı aktivite göstermektedirler. Ayrıca Cu(II) kompleksleri çoğu enzimlerin kofaktörleri olarak görev yapmaktadır (Ferrari et al., 1999).

Bu tezdeki çalışmanın genel amacı, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde sentezlenen bazı metal komplekslerinin alkalen proteaz ve plazmid DNA üzerine etkilerini araştırmak ayrıca antioksidan özelliklerini incelemektir. Böylece bu tür kompleksler sadece ilgili bilim adamları tarafından sentezlenmeyecek aynı zamanda devam eden çalışmalarla endüstri, tıp ve eczacılıkta kullanımı ile ilgili alt yapı oluşturulacaktır. İlgili kompleksler uygun konsantrasyonlarda hazırlanacak ve bakterinden saflaştırılan alkalen proteaz enzimi üzerine etkileri belirlenecektir. Enzimi inhibe veya aktive etmesi kompleksin kullanım alanına göre olumlu sonuç olarak algılanabilir. Plazmid DNA'nın sarmal yapısı üzerine komplekslerin etki edip etmediği araştırılacaktır. Eğer sarmalın açılması yönünde etki ediyorsa hem antibakteriyel olarak hem de moleküler çalışmalarda bu komplekslerin nükleaz olarak kullanılabileceği anlamına gelir. Ayrıca komplekslerin antioksidan kapasitelerinin yüksek çıkması durumunda gıda sektöründe antioksidan koruyucu olarak tıpta ve eczacılıkta savunma sistemi ilaçları olarak kullanılabilir.

1.1. Enzimler

Enzimler, canlı dokuların bileşiminde az miktarda bulunan, fakat canlı organizmada oluşan tüm tepkimelerin uygun koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bu tepkimeleri düzenleyen, katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu (ribozimler) hariç olmak üzere, genellikle protein ana yapıdaki özelleşmiş biyokatalizörlerdir. Yapılarını esas olarak proteinler oluşturduğu için, enzimlere metabolik proteinler de denmektedir. Canlı hücrenin bütün fonksiyonları enzimlerle sağlandığından; yaşama, bir anlamda birbirini izleyen enzimatik tepkimeler bütünü de denilebilir (Eren Kıran, 2006). Enzimler de diğer katalizörler gibi reaksiyon hızını arttırarak çalışırlar. Benzer koşullar altında, enzim varlığındaki tepkime oranı, katalizör yokluğundaki reaksiyon oranına göre bir veya birkaç milyon kat daha yüksek olabilmektedir (Uludağ, 2000). Yapılarındaki aminoasitlerin sıralanışı ve buna bağlı olarak kazandıkları üç boyutlu yapı enzimlerin kataliz görevini yapabilmelerini sağlayan en önemli etkidir (Onat ve Emerk, 1997).

Enzimler her biyokimyasal süreçte merkez durumundadır. Enzimler düzenli tepkime dizilerindeki aktiviteleriyle besinsel moleküllerin parçalandığı tepkime basamaklarının yüzlercesini katalizler, böylece kimyasal enerji korunur, dönüştürülür ve basit öncüllerden biyolojik makromoleküller üretilir. Metabolik yollar, düzenleyici enzimlerin aktivitesi altında yaşamı sürdürmek için gerekli birçok farklı aktivite arasındaki etkileşimi sağlamak için, oldukça yüksek oranda ilişkilendirilmiştir (Nelson and Cox, 2005). Enzim, kelime anlamı olarak eski Yunanca'da, ilk kez mayalardan elde edildiği için, “mayada bulunan” (in yeast) anlamına geliyorsa da, günümüzde enzimler yaşayan tüm hücrelerden; hayvanlardan, bitkilerden ve özellikle de mikroorganizmalardan elde edilebilmektedir (Polaina and MacCabe, 2007).

Hücrelerde önemli metabolik görevlere sahip olan enzimler artık çok çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere günlük hayata da girmişlerdir. Enzimler; ekmek, peynir, bebek gıdaları üretimi, alkollü içecekler, meyve suyu ve süt üretiminde, temizlik malzemelerinde ve tıpta teşhis ile tedavi sürecinde büyük miktarlarda

kullanılmaktadırlar. Ayrıca kimya, kâğıt, nişasta, biyoyakıt, kauçuk ve fotoğraf endüstrisinde, ziraatte, kontakt lens temizleyicilerinden, biyolojik savaşta kullanıma kadar çok geniş alanlarda da enzimler kullanılmaktadır. Enzimlerin bu kadar fazla alanda kullanılabilir olmasının sebepleri; maliyet bakımından ucuz olması, in-vitro şartlarda aktif olması, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olması ve en önemlisi de enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmamasıdır (Wiseman, 1987).

Endüstriyel ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerlerinin çok yüksek olmasına bağlı olarak enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, endüstriyel enzimler ile ilgili alanda yapılan çeşitli araştırmaların daha da önem kazanmasına neden olmaktadır. Özellikle son yıllarda stratejik alan olarak değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak, enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır (Gessesse, 1999). Temizlik maddeleri ve bazı gıda ürünlerine katılan enzimlerin, yüksek sıcaklığa dayanabilir olması, deterjanların yapısındaki kimyasallara karşı yapısını koruyabilmesi ve uzun süre stabil kalabilmesi gerekmektedir. Doğada bu özelliklere istenildiği kadar sahip olamayan enzimler, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak istenilen hale getirilmeye çalışılmaktadır. Endüstriyel enzimlerin dünya piyasasındaki payı 1,6 milyar doları aşmaktadır (Ottrup and Jorgensen 2002, Schallmey et al., 2004; Zakaria, 2006).

Gıda, deterjan ve nişasta endüstrileri, endüstriyel enzim üretiminin %75'ini kullanmaktadır ve proteaz, amilaz, lipaz, selüloz, pektinaz gibi hidrolazlar, en yaygın kullanılan enzim gruplarıdır (Topal vd., 2000). Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin %80'i polimerlerin doğal yapısını bozabilme yeteneğine sahip olan hidrolazlardır (Kasavi, 2006). Endüstriyel enzimler arasında ise %60'lık pazar payı ile en büyük grubu proteazlar oluşturmaktadır (Gençkal ve Tari, 2006). Bunu %28 ile karbohidrazlar, %2 ile lipazlar ve %10 ile diğer enzim grupları izlemektedir (Dinçbaş, 2009). Günümüzde proteaz gibi birçok mikrobiyal enzim, önemli araştırma konusu haline gelmiş, dünyanın hemen her yerinde üretilmeye, sanayi ve endüstri alanında kullanılmaya başlanmıştır.

1.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Önceleri enzimlerin birçoğu, sadece substrat isimlerine göre “az” eki ilave edilerek tek grupta toplanırdı. Günümüzde ise 2000’den fazla farklı enzimin bilinmesi, böyle bir sınıflandırmayı yetersiz kılmaktadır. Bu sebeple, uluslararası bilimsel sınıflandırma sistemine gidilmiştir. Bu sisteme göre; bir enzim ECS x.x.x.x şeklinde bir numara almaktadır. Örneğin, glikoz transferaz enziminin tanımlanması “ECS 2.7.1.1” şeklinde yapılmaktadır. İsmi sonundaki “az” eki enzim olduğunu; “2” transferaz olduğunu; “7” fosfotranferaz olduğunu; “1” hidroksil grup taşıdığını; “1” bir fosfat grubunu D-glikoza verdiğini ifade eder. Milletlerarası 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 dâhil edilmişlerdir.

a) Oksido-redüktazlar

Elektron transferi yapan enzimlerdir. Yani oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını (redoks tepkimelerini) katalizler.

b) Transferazlar

Grup transferi yapan reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir. Hidrojen dışında herhangi bir atom veya atom grubunun (metil, karboksil, amino, fosfat grupları), bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlarlar.

c) Hidrolazlar

Su moleküllerini kullanarak kompleks moleküllerin bağlarını parçalayan enzimlerdir (sindirim reaksiyonları).

d) Liyazlar

Bir molekülden su molekülü çıkarmadan bir grubu koparan enzimlerdir. Örneğin C-C bağı aldolaz veya karboksilaz enzimleriyle yıkılabilir. Ayrıca, C-O ve C-N bağı yıkan enzimler de bu gruba girerler.

e) İzomerazlar

İzomerik grupları vermek üzere, molekül içi grup transferi yapan enzimlerdir.

f) Ligazlar

ATP yıkımı ile dehidrasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Enerji kullanarak substrat moleküllerinin birbirine bağlanmasını; örneğin aminoasitlerin ve yağ asitlerinin aktifleşmesini sağlarlar.

1.1.2. Proteazlar

Proteazlar, proteinlerdeki peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Proteazlar, doğada bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kalıntıların dekompozisyonunda önemli rol oynamaktadırlar ve böylece besin döngüsünü sağlamakta ve ayrıca bitkilerin besinleri alabilmelerini sağlamaktadır (Aoki et al., 1995). Proteazlar enzimlerin oldukça kompleks bir grubunu oluştururlar ve oldukça farklı fizikokimyasal ve katalitik özelliklere sahiptirler. Proteaz sentezinin hücrel kontrolünden sorumlu mekanizma henüz tam olarak bilinmemekle beraber alkali proteazların üretimi amino asit veya amonyum gibi hızlı bir şekilde metabolize edilebilen azot kaynakları ile baskılanmaktadır. Diğer ortam bileşenleri küçük şekerler ve mineraller enzim sentezini etkilemektedir. Potansiyel proteaz kullanımı ve maksimum enzim üretimi ile endüstriyel işlemlerin maliyetini düşürmek amaçlanmaktadır (Kaur et al., 2001).

Proteazlar ayrıca çamaşır deterjanları, deri, et, süt, ilaç, bira, fotoğrafçılık, organik sentezler ve atık muamelesinde kullanılmaktadır (Kıran vd., 2006). Proteazlar, endüstrinin hemen her alanında kullanılan diğerk enzim grupları gibi çoğunlukla mikroorganizmalardan elde edilirler. Bunun nedeni mikrobiyal enzimlerin bitkisel, hayvansal ya da kimyasal olarak üretilen enzimlere göre önemli avantajlara sahip olmalarıdır. Katalitik aktiviteleri çok yüksektir, istenmeyen yan ürünler oluşturmazlar, daha stabil ve ucuzdurlar, ayrıca tek bir üretim prosesinde çok fazla miktarda üretmek mümkün olmaktadır (Zeman and Mcree, 1985).

Proteazlar arasında bakteriyel proteazların, hayvansal ve fungal proteazlar ile karşılaştırıldığı zaman daha etkin olduğu görülmüştür (Banerjee et al., 1999). Proteazlar, bakteri, küf, maya gibi esitli kaynaklardan elde edilse de *Bacillus* cinsi bakteriler biyoteknolojide en fazla kullanılan mikroorganizmalardır (Kalisz, 1988; Singh et al., 2000). Bunun nedeni, çok esitli ortamlardan izolasyonlarının nispeten kolay olmasıdır. Bununla birlikte *Bacillus*, hem kompleks hem de sentetik besi ortamında gelişebilmektedir. Ayrıca *Bacillus* türleri post-eksponansiyal ve durgunluk fazlarında da ekstrasellüler proteazlar üretebilmektedir (Mabrouk et al., 1998; Singh et al., 2000).

Genel olarak mikroorganizmalardan yüksek oranda enzim verimi elde etmek için, ya mutasyonla yeni mutantlar elde edilmekte ya mikroorganizma doğrudan izole edilmekte ya da üretim ortamının değiştirilmesi yoluna gidilmektedir. Özellikle besin ortamında bulunan karbon ve nitrojen kaynakları, inorganik tuzlar ve diğerk büyüme faktörleri, bakterilerin enzim üretim kapasiteleri üzerinde önemli etkiye sahiptir (Khalil et al., 2003).

Mikroorganizmalardan elde edilen proteolitik enzimler dünya çapında deterjan endüstrilerinde en fazla kullanım bulan enzimlerdir. 30 yıl boyunca deterjanlardaki proteazların önemi küçük katkı maddesinden, anahtar bileşenlere değişmiştir. İyi bir deterjan enzimi oksitleme ajanı ve ağartıcılarla beraber stabilitesini koruyabilmelidir. Ticari olarak kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı ağartma/oksitleme ajanlarının

varlığında stabilitesini koruyamamaktadır. Bu nedenle enzim tabanlı deterjanların daha iyi stabiliteye sahip olması için rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır. Bununla birlikte mikrobiyal çeşitliliği derinlemesine inceleyerek ticari olarak daha kullanışlı enzimler üretebilen mikroorganizmaların bulunma şansı da daima vardır (Oberoi et al., 2001).

Klasik olarak deterjanlar yüksek yıkama sıcaklıklarında kullanılmaktadır. Şimdilerde alkalın proteazların tanımlanmasında geniş sıcaklık aralıklarında etkili olması oldukça ilgi çekmektedir. Diğer taraftan günümüzde deterjan endüstrisi, yıkama sıcaklığının düşürülmesi ve deterjan kompozisyonunun değişmesi yönünde çalışmalar yapmakta, fosfat tabanlı deterjanları uzaklaştırarak, deterjan uygulamaları için daha uygun yeni alkali proteazlar üzerinde durmaktadır (Yang et al., 2000).

Proteazların diğer ilginç bir kullanım alanı ise deniz Crustaceae atıklarının deproteinizasyonudur. Kimyasal işlemlerin üstesinden gelmek için mikroorganizmaların veya proteolitik enzimlerin kullanılması üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Yang et al., 2000). Kitin ve türevleri çok yönlü biyolojik aktiviteleri ve zirai- kimyasal uygulamalarından dolayı büyük ekonomik değere sahiptir. Deniz Crustaceanları ise kitin bakımından oldukça zengindir.

Klasik olarak deniz atık materyallerinden kitinin hazırlanması güçlü asit ve bazları kullanarak demineralizasyonu ve deproteinizasyonu gerektirmektedir. Bununla beraber kimyasalların kullanılması kitinin deasetilasyonunu kısmi olarak gerçekleştirmektedir. Kimyasal uygulamalar aynı zamanda atık sularda nötralizasyon ve detoksifikasyon yapılmasını gerektirmektedir. Bu nedenle kimyasal uygulamalardan doğan zararların üstesinden gelmek için alternatif olarak mikroorganizmaların kullanılması veya proteolitik enzimlerin kullanılması gündemdedir (Singh et al., 2000).

Alkali proteazlar geniş pH ve sıcaklık aralıklarında kararlı olduklarından birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır ve bu nedenle enzim pazarında oldukça büyük bir

paya sahiptir, proteaz enzimlerinin yıllık olarak tüketilen oranları Çizelge 1.1.'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Mikrobiyal enzimlerin yıllık kullanım değerleri

Enzim	Pazar payı (%)
Alkali Proteazlar	25
Diğer Proteazlar	21
Amilaz	18
Reninler	10
Analitik enzimler	10
Karbohidrolazlar	10
Lipaz	3
Tripsin	3

Proteazlar ayrıca, katalize ettikleri reaksiyon tipine göre ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Bu tanımlamada belirleyici olan enzimlerin substratta etkili oldukları bölgedir (Mahler and Cordes, 1966). Proteazlar katalitik mekanizmalarına göre; serin proteazlar, sistein proteazlar, aspartik proteazlar ve metallo proteazlar şeklinde ve aktivite gösterdikleri pH aralığına göre de asidik proteazlar, nötral proteazlar ve alkali proteazlar olarak sınıflandırılmışlardır (Singh et al., 2000). Buna göre, bazı proteazların bu sınıflandırmadaki yeri Çizelge 1.2.'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Proteazların sınıflandırması

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

1.1.2.1 Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar polipeptit zincirinin amino ya da karboksil ucundaki peptit bağlarını hidroliz ederler. Proteinin amino ucundaki peptit bağlarını hidroliz eden ekzopeptidazlar, aminopeptidazlar; karboksil ucundaki peptit bağlarını hidroliz edenler ise karboksipeptidazlar olarak adlandırılırlar. Proteazlarda, zincirin amino ucundaki ilk peptit bağı hidrolizleyen aminopeptidazlar, amino ucundaki ikinci peptit bağının hidrolizini katalize eden endopeptidazlar, dipeptilaminopeptidazlar vb. olarak bilinirler.

Karboksipeptidazlar proteinlerin karboksil ucunda etki gösterirler. Gerçek karboksipeptidazlar bu uçtaki son peptid bağıını hidrolize ederler (Gheorghiu Alpan, 2008).

Dipeptidilkarboksipeptidazlar ise karboksi uça bulunan son peptid bağından bir önceki peptid bağıını hidroliz ederler. Aminopeptidazlar ve karboksipeptidazların yanı sıra tanımlanmış iki ekzopeptidaz ailesi bulunmaktadır. Bunlar dipeptitleri hidroliz eden dipeptidazlar ve prostetik gruba bağılı aminoasitlerin karboksil veya amino uçlarındaki peptit bağlarının hidrolizini katalize eden omegapeptidazlardır (Silverthorn, 2004; Rao et al., 1998).

a) Aminopeptidazlar

Aminopeptidazlar, polipeptid zincirinin ucundaki serbest N terminaline atak yapmaktadırlar. Enzim, tek bir aminoasidi, bir dipeptidi ya da bir tripeptidi hidroliz etmesine göre isim almaktadır. Aminopeptidazların N-terminal metionini (Met) uzaklaştırdıkları bilinmektedir. Bakteri ve fungusları da içeren mikroorganizmaların çoğunda bulunmaktadır. Genellikle hücre içi enzimlerdir fakat *A. oryzae* tarafından üretilen aminopeptidaz hücre dışı bir enzimdir. Bakteri ve funguslardan üretilen aminopeptidazların substrat spesifisiteleri, hidroliz ürünlerinin profilleri temel alındığında farklı olabilmektedir.

Örneğin, *E. coli*'den üretilen aminopeptidaz I 400 kDa'luk büyük bir proteazdır. Optimum pH'sı 7.5-10.5 arasındadır ve optimum aktivite için Mg^{2+} ya da Mn^{2+} 'a ihtiyaç duyarlar. *Bacillus licheniformis* aminopeptidazın ise, molekül ağırlığı 34 kDa'dur ve aktivitesi Co^{2+} iyonları varlığında artar. Diğer taraftan, *B. stearothermophilus* aminopeptidaz II bir dimerdir ve molekül ağırlığı 80-100 kDa arasında olup, Zn^{2+} , Mn^{2+} ve Co^{2+} iyonları tarafından aktive olmaktadır (Rao et al., 1998; Gheorghiu Alpan, 2008).

b) Karboksipeptidazlar

Karboksipeptidazlar, polipeptid zincirinin serbest bir C ucunda işlevseldir ve tek bir aminoasit ya da bir dipeptidi ayırmaktadırlar. Karboksipeptidazlar enzimlerin aktif bölgesindeki aminoasit çeşitlerinin yapısına göre üç ana gruba ayrılırlar. Bunlar; serin karboksipeptidazlar, metallo karboksipeptidazlar ve sistein karboksipeptidazlardır. *Penicillium sp.*, *Saccharomyces sp.* ve *Aspergillus sp.*'den izole edilen serin karboksipeptidazların substrat spesifisiteleri aynıdır fakat optimum pH, stabilite, moleküler ağırlık ve inhibitörlerin etkisi gibi diğer özellikleri farklıdır. *Saccharomyces sp.*, ve *Pseudomonas sp.*'den izole edilen metallo karboksipeptidazlar aktiviteleri için Zn^{2+} ya da Co^{2+} iyonuna ihtiyaç duyarlar. Sistein karboksipeptidazlar, aktif bölgelerinde sistein aminoasidi içerirler (Rao et al., 1998; Szecsi et al., 1992).

Bazı ekzopeptidazların tepkime mekanizmaları tam olarak açıklanamadığından alt grup olarak da sınıflandırılmışlardır. Omega peptidaz olarak bilinen bu peptidazlar, NC-IUBMB (Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Adlandırma Komitesi) tarafından E.C 3.4.19 alt-alt sınıfına yerleştirilmişlerdir. Omega peptidazlar serbest bir N ya da C terminal ucuna ihtiyaç duymazlar. Endopeptidazlardan farklı olarak N ya da C terminal uçlara yakın bölgelerde hidroliz etme yeteneğine sahiptirler. Amino veya karboksipeptidazların direkt etkide bulunamadıkları polipeptid bölgelerini hidroliz ederler. Farklı özelliklerde omega peptidazlar vardır. Bunlar; ubiquitinil hidrolazlar, piroglutamil peptidazlar ve gama-glutamil hidrolazlardır.

1.1.2.2. Endopeptidazlar

Hartley, 1960 yılında endopeptidazları katalitik mekanizmalarına göre serin proteazlar (E.C. 3.4.21), sistein proteazlar (E.C. 3.4.22), aspartat proteazlar (E.C. 3.4.23) ve metallo proteazlar (E.C. 3.4.24) olmak üzere dört grup altında sınıflandırmıştır. Endopeptidazlar ekzopeptidazların aksine amino veya karboksil uçlarda bulunan peptit bağları yerine iç kısımlarda bulunan peptit bağlarını hidroliz ederler (Tanksale, 2001).

a) Serin proteazlar

Serin proteazlar, aktif merkezlerindeki aspartik asit (Asp), serin (Ser) ve histidinden (His) oluşan üçlü katalitik yapılar ile karakterize edilirler. Bu yapı içinde serin, substrat ile kovalent bağ oluşturan oldukça reaktif bir elemandır. Serin proteazlar alkali koşullarda aktivite göstermeleri ve kararlılıkları nedeni ile farklı endüstriyel uygulama alanlarına sahip enzimlerdir. Serin proteazlar DFP (diizopropilflorofosfat) ve PMSF (fenilmetilsulfonilflorid) tarafından inhibe edilen enzimlerdir. Alkali pH değerlerinde aktif olan bu enzimler geniş bir substrat çeşitliliğine sahiptir, moleköl ağırlıkları ise çoğunlukla 18-35 kDa aralığındadır (Rao et al., 1998).

b) Sistein proteazlar

Sistein proteazlar tiol proteazlar olarak da bilinir ve aktif merkezlerindeki sistein (Cys), histidin (His) ve aspartik asitten (Asp) oluşan üçlü katalitik yapıları ile karakterize edilirler. Sistein, substrat ile kompleks oluşturulmasında etkili olmakta ve aktif merkezlerinde bir -SH grubu içerdiklerinden ve bu grup ağır metal iyonları ve okside edici ajanlarla kolayca inhibe edildiğinden önemli enzimlerdir (Kenny, 1999).

c) Aspartat proteazlar

Aspartat proteazlar asit endopeptidazlar olarak da bilinirler. Bu enzimlerin katalitik bölgeleri iki aspartik asit içerir ve bu proteazlar genellikle düşük pH değerlerinde aktivite gösterirler. Moleköl ağırlıkları 30-45 kDa arasında olup; pepsin, katepsin D ve E ile renin aspartat endopeptidazların bilinen örnekleridirler (Szecsi et al., 1992).

d) Metallo proteazlar

Bu grup, etki mekanizması yönünden diğer protezlara göreceli olarak, en çok farklılık gösteren enzimleri içerirler. Metallo proteazlar aktiviteleri için divalent katyonlara gerek

duyan enzimlerdir. Metallo proteazların yapısında katyon olarak genellikle çinko (Zn^{2+}) bulunmaktadır, bunlar EDTA gibi, şelat yapıcı ajanlar tarafından inhibe edilen enzimlerdir. Bu grup içinde bulunan 30 adet enzim ailesinden 17 tanesi endopeptidaz, 12 tanesi ekzopeptidaz ve birisi hem endopeptidaz hem de ekzopeptidazdır. Metallo peptidazlar nötral, alkali, miksobakter I ve II olmak üzere dört gruba ayrılırlar (Tanksale, 2001).

1.1.3. Proteaz kaynakları

Proteazlar, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi kaynaklardan elde edilebilmektedirler. Bu nedenle proteazlar kaynağına göre; bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal olmak üzere üç farklı yoldan elde edilebilirler.

a) Bitkisel kaynaklar

Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanılmasını, bitkinin yetiştiği iklim koşulları ve kultivasyon toprağının uygunluğu gibi farklı faktörler belirlemektedir. Bitkisel kaynaklı proteazlar, aktif merkezlerindeki sulfidril grupları ile karakterize edilirler ve günümüzde bitkilerden elde edilen tüm proteazlar aynı gruba aittirler. Enzimlerin aktivitesinden ise bu sulfidril grupları sorumludur (Uhlir, 1998). Bitkisel kaynaklı proteazlar özellikle tropikal bitkilerden elde edilmektedir. Bilinen en güçlü bitkisel proteaz kaynakları; papaya (*Carica papaya*), ananas (*Anana sativa*), bazı Ficus türleri (*F. carica*, *F. glabrata*), enginar (*Cynara cardunculus*) ve soya fasulyesi (*Soya hispida*) dir (Ward, 1985).

b) Hayvansal kaynaklar

Hayvansal proteazlar enzimolojinin başlangıcından beri bilinmektedir. Protein ve enzimlerin kimyasal yapıları keşfedilmeden önce pepsin ve pankreas proteazlarının protein sindirici özellikleri olduğu bilinmekteydi. Günümüzde ise en çok bilinen

hayvansal kaynaklı proteazlar; pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve renindir. Hayvansal proteazlar, gıda sanayisinde, protein hidrolizatları üretiminde, et ve balık atıklarının gideriminde, deri endüstrisinde ve tıpta kullanılmaktadır. Tripsin, pankreastan salgılanan, ince bağırsakta proteinleri parçalayıcı özelliğe sahip sindirim enzimidir. Enzimatik mekanizması diğer serin proteazlara benzer. Tripsin, bakteriyel ortamın hazırlanmasında ve bazı özel tıbbi uygulamalarda kullanılır. Kimotripsin, proteolizi gerçekleştirebilen hayvansal pankreatik ekstraktlarda bulunan bir sindirim enzimidir. Bir serin proteazdır ve peptid bağlarını fenilalanin, tirozin ve triptofan aminoasitlerinden sonraki karboksil gruplarından hidrolizler. Saf kimotripsin pahalı bir enzimdir ve yalnızca diagnostik ve analitik uygulamalarla süt protein hidrolizatlarının deallerjenasyonunda kullanılmaktadır (Rao et al., 1998).

Pepsin, gıda proteinlerini peptidlere parçalamak için, hemen hemen tüm omurgalıların midelerinde ana hücreler tarafından salgılanan asidik bir proteazdır. Pepsin 1836'da Theodor Schwann tarafından keşfedilen ilk hayvansal enzimdir. Aktif enzim, enzimin zimojen formundan yani pepsinojenden oluşturulur. Pepsin bir aspartik proteazdır ve pH 1-2 arasında optimum aktivite göstermektedir. pH 6'nın üzerinde inaktive olur ve iki hidrofobik aminoasit arasındaki peptid bağlarının hidrolizini sağlar. Renin, anne sütünü sindirmek için her memelinin midesinde üretilen doğal, kompleks bir enzimdir ve sütü pıhtılaştırır. Hayvansal bazlı renin (rennet) için en yaygın kaynak yeni doğan sütle beslenmiş buzağının kesilen şirdenidir (Fankhauser, 2007). Renin, pepsine benzer bir proteazdır ve bütün süt veren memelilerin midelerinde inaktif pro-renin olarak bulunur. Pepsin işleviyle ya da kendi kendine katalizle aktif renine dönüşür. Süt endüstrisinde süt kazeininin çöktürülmesinde ve lor üretiminde kullanılmaktadır (Rao et al., 1998).

c) Mikrobiyal kaynaklar

Proteazlar, tüm ökaryotik ve prokaryotik organizmalar için vazgeçilmez enzimlerdir ve hücrede birçok önemli fizyolojik görevler üstlenmektedirler. Proteazlar, proteinazlar veya peptidazlar organizmada sentezlenen proteinlerin kompozisyonunun,

büyükliğünün, biçiminin ve döngüsünün kontrolünde esansiyel olan enzimlerdir. Günümüzde en çok kullanılan proteaz kaynağı, bakteri, fungus ve virüs 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 üretilebilmesi mümkün olduğundan mikrobiyal kaynaklı proteazlar bitki ve hayvan kaynaklı proteazlara göre daha çok tercih edilmektedirler (Kıran vd. 2006).

Mikrobiyal proteazlar aktif merkezlerine göre sınıflandırılmaktadırlar ve en önemli grupları; serin-, metallo- ve karboksil proteazlardır. Ayrıca literatürde ‘jelatinaz’, ‘keratinaz’, ‘kazeinaz’ şeklinde yapılan sınıflandırmalara da rastlamak mümkündür (Novel et al., 1963). Fungus orijinli proteazları üreten mantarlar, bakterilerden daha geniş kapsamlı enzim üreticileridirler. Ayrıca fungal proteazlar pH 4-11 gibi geniş bir pH aralığında aktivite gösterirler. Bakteriyel kaynaklı enzimler ile karşılaştırıldıklarında bakteriyel enzimlerden daha düşük reaksiyon hızına ve daha düşük bir sıcaklık toleransına sahiptirler. Özellikle peynir endüstrisinde dar pH ve sıcaklık spesifisitesinden dolayı kullanılırlar (Rao et al., 1998; Uhlig, 1998).

Fungal proteazlar endo ve ekzopeptidazlar olup, çok geniş çeşitlilikte salgılanabilmektedirler (Gripon, 2003). Virus orijinli proteazlar, özellikle virus proteinlerine olan hassasiyetleri dolayısıyla önemlidirler. Viral proteazlar, viral replikasyon ve birleşimi koordine etmek ve düzenlemek için optimize edilmişlerdir. Yapılan araştırmalarda en önemli nokta viral proteazların üç boyutlu yapısı ve sentetik inhibitörler ile etkileşimidir. Serin, aspartik ve sistein peptidazlar değişik virüslerde bulunmaktadır. Virus kaynaklı peptidazların hepsi endopeptidazlardır (Babe and Craik, 1997).

Bakteri orijinli proteazlar, büyük polipeptidlerin daha küçük peptidlere ve amino asitlere hidrolizine yardımcı olurlar, böylelikle onların hücre tarafından absorpsiyonunu kolaylaştırırlar. Hücre dışı enzimler, onların depolimerleşme aktivitesinden dolayı

beslenmede büyük bir rol oynar. Hücre içi proteazlar hücrede uygun protein dönüşümünü yapmaya katkısıyla bilinirler. E.coli’de, lon geni tarafından üretilen ATP-bağılı proteaz La, anormal proteinlerin hidrolizinden sorumludur (Çelik, 2006).

1.1.4. Endüstriyel açıdan alkali proteazlar

Proteazlar global enzim ürünleri satışında önemli paya sahip bir endüstriyel enzim grubu olup; deterjan, deri, et, süt, ilaç, bira, fotoğrafçılık, organik atıklar ve geri dönüşüm vb. endüstrisinde kullanılmaktadır. Endüstride kullanılan alkali proteazlar bakteri, fungi ve böcekler gibi farklı kaynaklardan elde edilebilir (Anwar and Saleemuddin, 1998). Proteazların endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliğini bazı özellikleri belirler, daha önce bu alanda yapılan çalışmalarda proteaz ürünleri için fungal kültürlerde çalışılmış ve ürün miktarının kullanılan tür ve ortama göre fazlasıyla değişken olduğu ortaya konmuştur.

Banerjee ve diğerlerinin (1993) yaptıkları çalışmada bir *Rhizopus oryzae* izolatından alkali proteaz elde etmek için kültür koşullarını optimize etmişlerdir. Çalışmada, organik ve inorganik azot kaynakları, metal iyonları, surfaktanlar ve mantar öldürücü ilaçların proteaz üretimi ve ürünleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Organik azot kaynaklarının proteaz üretimini olumlu etkilediği saptanmış, ancak ekonomik boyutu gözeticilerle endüstriyel proteaz üretimi için inorganik tuzlar tercih edilmiştir. İnorganik azot kaynağı olarak % 0,2 sodyum nitrat çözeltisinin en etkili olduğu saptanmıştır.

Bazı metal iyonları (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Ag^{3+} , Pb^{3+} , Hg^{2+}) ve surfaktanlar (Tween 80, SDS, Triton X-100) proteaz üretimi için uyarıcı bir etkiye sahiptir. Proteaz üretimi için etken süreçlerin geliştirilmesi, alkali proteazların endüstride birçok alanda kullanılmasında etken olmuştur. Alkali proteazların yüksek pH ve sıcaklıklarda, çeşitli surfaktanların varlığında aktivite göstermeleri, bunların endüstriyel uygulamalar için elverişli kılmaktadır (Kumar and Takagi, 1999; Anwar and Saleemuddin, 1998).

Son yıllarda ultrafiltrasyon ve ters osmoz gibi membran prosesleri atık işleme, süt ve meşrubat endüstrilerinde büyük önem kazanmıştır. Bu süreçleri sınırlayan temel faktörler; membran tıkanmalarına bağlı olarak akış hızının azalması ve membran temizliğinin maliyeti arttırmasıdır. Enzim temelli bir basamak ile birlikte veya enzim kullanılmaksızın asit ve alkali ile membranların temizlenmesi; geleneksel temizlik uygulamalarında kullanılan ana basamaklardır. Bu amaçla kullanılan enzimler günümüzde daha çok mezofilik organizmalarından elde edilmekte, dar pH aralığında, ılımlı sıcaklıklarda çalışmakta ve deterjanlara karşı toleransları sınırlı olmaktadır. Buna karşın alkali proteazlar yüksek pH ve sıcaklıklarda, sürfaktanlar ve kaotropik ajanların varlığında optimal aktivite göstermekte ve bu özellikleri onları endüstriyel uygulamalar için elverişli kılmaktadır (Gheorghiu Alpan, 2008).

1.1.4.1. Süt teknolojisinde alkali proteazlar

Laktik asit bakterileri, süt teknolojisinde peynir ve süt ürünlerinin yapımında çok önemli bir mikroorganizma grubunu oluşturur (Thomas and Mills, 1981). Bu bakteriler sütte bulunan kazeinin peptit bağlarının kırarak kazeinin pıhtılaşmasını ve buna bağlı olarak peynirin oluşumunu sağlarlar. Laktik asit bakterileri, peynir üretiminde süütün asitlenmesi ile peynirin olgunlaşmasında işlevseldir ve özgün lezzetin oluşumuna da katkıda bulunurlar. Bakterilerin bu iki işlevi için proteolitik aktivite temeldir. Peynir endüstrisindeki önemleri nedeni ile son yıllarda fermentasyon bakterileri üzerine yapılan çalışmalar oldukça artmıştır. Laktik asit bakterileri başka besinlerin fermentasyonu ve fermentasyon için uygun ortamın oluşturulmasında da kullanılmaktadır. Proteazlar ayrıca gıda sektöründe bebek maması, diyet ürünleri, meyve suyu v.b. ürünlerin üretilmesinde kullanılmaktadır (Anwar and Saleemuddin, 1998).

1.1.4.2. Atık arıtımı ve dönüşümü

Boynuz, tüy, tırnak ve saç gibi lifsel proteinler doğada atık olarak oldukça bol miktarda bulunurlar. Bu atıklar bazı mikroorganizmalardan elde edilen proteazlarla kullanılabilir hale dönüştürülebilir veya yok edilebilirler. Proteazların proteolitik aktivitesi ile protein içerikli bu atıkların parçalanarak giderimi sağlanmaktadır. Bu etkileri ile proteazlar son zamanlarda atık yönetiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kümes atıklarının düzenlenmesi proteazların kullanım alanları arasındadır, bu yolla atıklar ve tüy birikintileri giderilebilmektedir.

Alkalen proteazlar fotoğrafçılık sektöründe de kullanılmaktadır. Fotoğraf filmleri üzerinde önemli miktarda gümüş bulunmaktadır, filmlerin yakılması ile yüzeyindeki gümüş geri kazanılmakta ancak bu yöntemle çevre kirliliğinin artmasına yol açılmaktadır. Bu işlemde proteazların kullanılması, gümüşün geri dönüşümü için çevre dostu bir yöntem olarak görülmektedir. Filmler üzerindeki jelatinin enzim tarafından parçalanması ile üzerinde bulunan gümüş kolayca geri kazanılmakta, proteazlar film sektöründe de giderek önemli bir yer edinmektedir (Anwar and Saleemuddin, 1998).

1.1.4.3. Deri endüstrisinde proteazlar

Deri endüstrisinde enzim kullanımı ile hayvan derilerinin daha düzgün bir yüzeye sahip olmasını sağlamaktadır. Bu süreç, geleneksel olarak kullanılan, derilerin kireç ve sodyum sülfid ile işlenmesinin yerini almaktadır. Ayrıca kimyasalların kullanıldığı klasik yöntem pahalı ve çevreye zararlı olduğundan, günümüzde deri sanayinde enzimlerin kullanılması tercih edilmektedir (Afşar, 2008). Deri işlenmesinin çeşitli basamaklarında kullanılan alkali proteazlar daha kaliteli deri üretimine olanak sağlamaktadır. Bu uygulamada, deride istenilmeyen pigmentlerin yok edilmesi, deri yüzeyinden kılların ve tüylerin uzaklaştırılması ve daha düzgün, kullanışlı bir deri yüzeyinin elde edilmesi sağlanmaktadır (Anwar and Saleemuddin, 1998).

1.1.4.4. Deterjan endüstrisinde alkali proteazlar

Uzun yıllardan beri bazı enzimler alkali pH'da çalışabildikleri için deterjan endüstrisinde de kullanılmaktadır. Deterjanlar proteaz, amilaz, lipaz gibi farklı enzimler içerir ve deterjan katkı maddesi olarak farklı enzimlerin kullanılması protein içerikli lekelerin yanı sıra, nişasta ve karbohidrat lekelerinin de çıkarılmasına olanak sağlar. Enzimlerin deterjan katkı maddesi olarak kullanılmasında etken olan başlıca özellikler; alkali pH'da çalışmaları ve deterjanlarla uyumlu olmalarıdır (Demain and Solomon, 1981).

Daha iyi temizleme performansı ve düşük maliyet, proteazların deterjan endüstrisinde kullanımını yaygınlaştırmıştır. Deterjan katkı maddesi olarak kullanılan proteazlar çoğunlukla *Bacillus* proteazlarıdır. Deterjan endüstrisinde genellikle subtilisinler kullanılmaktadır. Subtilisinler katalitik mekanizmaları gözetilerek alkali proteazlar olarak tanımlanırlar. Aminoasit dizileri ve üçboyutlu yapıları diğer serin proteazlardan farklıdır. Subtilisinlerin katalitik üçlü yapıları aspartik asit, histidin ve serin içermektedir. Subtilisinlerin molekül ağırlıkları 18-90 kDa arasında değişmekle birlikte, deterjanlarda kullanılanlar genellikle 27 kDa büyüklüğündedir. Subtilisinlerin başarılı kullanımının temelinde, yüksek sıcaklıklardaki kararlılık ve yüksek substrat özgüllüğü gibi nitelikleri yatmaktadır. Bir diğer önemli nokta ise, oldukça kısa sürede üretilibilmeleridir. Bu proteazlar her türlü çamaşır ve bulaşık deterjanlarında kullanılmakta; işlevleri kan, süt, yumurta gibi protein içerikli lekelerin azaltılmasını sağlamaktadır (Maurer, 2004).

Yıkama verimini arttıran proteazlar, enzimin karakterine bağlı olarak daha düşük sıcaklıklarda ve daha düşük sürelerde temizlik sağlayabilmektedir. Proteazların özellikle kan ve çim gibi lekelerin çıkarılmasında çok etkili olduğu bilinmektedir. Yiyecek lekelerinin çıkarılmasında ise proteazların amilaz ve lipazlarla birlikte kullanıldığı kombinasyonları daha etkili olmaktadır. Ayrıca, deniz solucanlarından elde edilen proteazlar lens yıkama çözeltilerinde kullanılmakta ve düşük sıcaklıklarda kontak

lenslerin temizlenmesini sağlamaktadırlar (Orhan, 2003; Öztürk, 2004; Aehle, 2004). İdeal deterjan enzimi, yüksek pH da ve 65°C sıcaklıklarda çalışmalı ve deterjanın daha kısa sürede bozulmasına neden olan oksitlenmeye karşı dayanıklı olmalıdır. Ayrıca deterjan çözeltisi içinde düşük miktarlarda bile etkili olmalı ve substrat özgüllüğü yönünden geniş olmalıdır. Bu bağlamda günümüzde deterjan sanayinde kullanılan proteazlar, pH 8-10 değerleri arasında etkili ve protein lekelerine özgül olmalıdır (Demain and Solomon, 1981).

1.1.4.5. Gıda sanayisinde proteazlar

Gıda endüstrisinde proteazların kullanımı oldukça eski zamanlara dayanmaktadır. Günümüzde proteazlar rutin olarak peynir yapımı, fırıncılık, soya hidrolizatlarının hazırlanması ve et yumuşatma gibi çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Enzimler tarafından üretilen protein hidrolisatları genellikle acı bir tada sahiptir. Aminoasit türüne ve peptidin uzunluğuna göre bu hidrolisatların acılığı az veya çok olabilir. Acı peptidler, hidrofobik aminoasit içeriğinin yüksek olmasıyla, tatlı peptidler ise hidrofilik aminoasit içeriğinin yüksek olmasıyla karakterize edilirler. Kazein ve hemoglobinden üretilen hidrolisatlar; et, balık ve jelatinden elde edilen hidrolisatlardan daha acı olmaktadır (Aehle, 2004). Özellikle *Bacillus subtilis* proteazları kek, bisküvi ve kraker yapımında kullanılmaktadır. Bu proteazlar hamurların yumuşamasını geciktirmek için kullanılır ve özellikle kraker üretiminde çok önemlidir (Fadıloğlu ve Erkmén 2004; Çelik, 2006). Bu alanda asidik mantar proteazlar amilazlarla birlikte kullanılarak ürünün tadına ve aromasına da etki etmektedir (Uhlí, 1998; Krajewska, 2003).

1.1.4.6. Kozmetik ve ilaç sanayisinde proteazlar

Proteazlar, kozmetikte saç bakımı ürünlerinde, diş macunlarında, istenmeyen tüylerin yok edilmesini sağlayan ürünlerde ve kontak lens solüsyonlarında kullanılmaktadır. Cilt ve saç bakım ürünlerinde kullanılan kolajenoz hidrolizat ve elastin maddeleri sığır tendonlarının proteolitik hidroliziyle elde edilmektedir (Langmaier et al., 2002).

Proteazların geniş spesifisitesi ve çeşitliliği tedavi edici ajanların gelişiminde büyük bir avantaj olarak kullanılır. Subtilisin ya da kollejenaz yanık ve yara tedavisinde, antibiyotiklerin geniş bir aralıkta kullanımıyla kombine edilerek kullanılmaktadır. *E. coli*'den izole edilen asparajinaz lemfositik lösemilerin çeşitli formlarında kan akışından asparajini elimine etmek için kullanılmaktadır (Rao et al., 1998; Kurdya and Simonenko 1994; Gupta et al., 2002). Şeker hastalarında yaraların geç iyileşmesine karşı proteaz absorban ortu tedavisinde metalloproteaz inhibitorleri kullanılarak, yaraların kronik halden akut hale geçmesi sağlanmıştır (Lobmann et al., 2005).

1.1.5. Tez çalışmasında kullanılan *Bacillus subtilis*'in özellikleri

Kirpikli bir basil olduğu için hareketli, sporları oval ve subterminaldir. Kapsülsüz, gram pozitif, aerop, oda sıcaklığı ve zenginleşmemiş besiyerinde rahatlıkla üreyebilen, R tipi koloniler yapan saprofit yani doğada yaygın olarak bulunan bir basildir. Vejetatif şekilleri dayanıksız olup, sporları bazen kaynama derecelerinde birkaç saat dayanabilirler. Toz, toprak, su gibi temel alanlarda yerleştiklerinden besin maddelerine kolaylıkla bulaşırlar. Saprofit bir bakteri olmakla beraber doku içine veya göz içine bulaşarak enfeksiyonlara ve bazı besin zehirlenmelerine neden olabilir (Coleman and Elliott, 1962; Demain and Solomon, 1981). Özellikle sütte çoğaldıkları zaman kazeini parçalayarak zehirli maddeler açığa çıkarırlar. Diğer besin maddelerinde üredikleri zaman toksin oluştururlar. 2-18 saat arasında ekmekte ipliklenmeye neden olan bir bakteridir. Özellikle ekşi mayayla yapılan ekmeklerde görülür (Demain and Solomon, 1981; Gessesse, 1998).

1.2.Schiff Bazları

İlk kez 1864'te Schiff tarafından bir primer amin ve bir aktif karbonil grubunun kondenzasyonundan elde edilen ve azometin grubu içeren bileşiklere “Schiff Bazları” denir (Orgel, 1960). Genel olarak yapılarında C=N bulunan bileşiklere “azometin ya da

imin bileşikleri” ve C=N bağından oluşan fonksiyonel gruba da “Azometin grubu” denir (Beyer, 1980; Atakol, 1986).

Schiff bazları ilk defa 1864 yılında Alman kimyager H. Schiff tarafından sentezlenmiştir (Schiff, 1869). 1933 yılında ise Pfeiffer tarafından ligand olarak kullanılmıştır (Patai, 1970). Salisilaldehit ile stokiyometrik orandan biraz fazla alınan herhangi bir alifatik primer aminle, alkollü veya sulu-alkollü ortamda, az miktardaki sodyum hidroksit veya sodyum asetat varlığında geçiş metalleri ile geri soğutucu altında ısıtılması sonucu N-alkil salisilaldiminlerin metal kompleksleri elde edilmiştir (Schiff, 1869; Köksal, 1999).

Ligand olarak Schiff bazlarının geçiş metalleri ve ana grup elementleri ile oluşturdukları komplekslerin analitik uygulamaları literatürde çok sık rastlanılan bir durumdur. Schiff bazları ve bunların biyolojik olarak aktif kompleksleri üzerine son yıllarda çalışmalar yapılmaktadır. Schiff bazlarının yapılarında bulunan gruplardan dolayı bunlardan elde edilen metal kompleksleri renkli maddeler olduğundan boya endüstrisinde özellikle tekstil boyacılığında pigment olarak kullanılmaktadır (Serin, 1980).

Yakın zamanda Schiff bazlarının yapısal modifikasyonlu türevlerinin metal koordinasyonlu kompleksleri ilaçlarda biyoaktif madde olarak ilaç sanayiinde kullanılabilecektir (Gaur et al., 2007). Schiff bazı komplekslerinin antikanser aktivitesi göstermesi özelliğinden dolayı tıp dünyasındaki önemi giderek artmaktadır ve kanserle mücadelede reaktif olarak kullanılması araştırılmaktadır (Scovill et al., 1982; West and Panel, 1989).

1.2.1. Schiff bazlarının metal kompleksleri

Bir merkezi atomun, ligand adı verilen değişik sayıda atom veya atom gruplarınca koordine edilmesi ile oluşan bileşiğe koordinasyon bileşiği veya kompleks denir. Koordinasyon bileşiklerinin yapısı konusundaki ilk çalışmalar 1866–1919 yılları arasında İsviçreli bilim adamı A. Werner tarafından yapılmış ve koordinasyon

kimyasının esas temelleri bu bilim adamının 1910'lu yıllardaki başarılı çalışmaları üzerine kurulmuştur (West and Panel, 1989).

Ligandın türüne, verici atomların sayısına, ligand ile metal tuzunun molar oranlarına bağlı olarak çeşitli yapılarda çok farklı kompleksler elde edebilmek mümkündür. Kompleksleşmeye giren metal atomlarının sayısına bağlı olarak elde edilen kompleksler tek merkezli (mononükleer), çift merkezli (dinükleer) veya çok merkezli (polinükleer) olarak tanımlanır. Kompleksleşmenin birden fazla metal atomu üzerinden olduğu durumlarda eğer farklı metal atomları üzerinden kompleks oluşmuşsa hetero çift merkezli kompleks; eğer tek tür metal atomu üzerinden kompleksleşme gerçekleşmişse homo çift merkezli kompleks şeklinde tanımlar kullanılmaktadır (Çelebier, 2004).

Ligandlar, merkezi atoma elektron çiftleri verebilen Lewis bazlarıdır. İmin bağındaki azot atomu çiftleşmemiş elektron bulundurduğu için elektron verici olup bazik karakterdedir. Azometin azotu olarak da tanımlanabilen bu atom bir Schiff bazı için öncelikli koordinasyon noktasıdır. Azot atomunun bir çift bağ ile bağlanmış olduğu azometin sistemi de dış orbitalleri sayesinde geri bağlanmaya uygun d-metal iyonları için koordinasyon bölgesi olabilir. Sonuç olarak, azot atomunun da bulunduğu bu grup hem donör hem de donör akseptör fonksiyonu gösterebilmektedir. Bu durum, Schiff bazlarının oluşturduğu metal komplekslerinin yüksek kararlılıklarının nedenidir (Canpolat, 2003).

Azometin grubunun ligand olarak kararlı kompleksler oluşturabilmesinde ikinci önemli faktör, molekülde hidrojen atomunun kolay uzaklaştırılabildiği azometin bağına yakın bir fonksiyonel grup (tercihen fenolik -OH grubu) bulunmasıdır. Böylece meydana gelen beşli veya altılı selat halkaları ortaya çıkar ki, bu kompleksler metalin kantitatif bağlandığı yapılardır (Öztürk, 1998).

1.2.2. Schiff bazı komplekslerinin kullanım alanları

Koordinasyon bileşikleri sentezinde ligand olarak kullanılan Schiff bazları konusuyla birçok bilim adamı ilgilenmiş ve çeşitli kompleksler elde etmişlerdir. Schiff bazlarının yapılarında bulunan gruplardan dolayı bunlardan elde edilen metal kompleksleri renkli maddeler olduklarından boya endüstrisinde özellikle tekstil sektöründe boyarmadde olarak kullanılmaktadır (Serin, 1980). Schiff bazları, koordinasyon kimyasında şelat ligandları olarak termotropik likit kristalize polimerler elde edilmesinde, metal komplekslerinin radyofarmakolojikler olarak kanser tedavilerinde, dioksijen taşıyıcı olarak, biyolojik makromoleküller için modelleme sistemleri olarak ve katalitik reaksiyonlarda kullanılmaktadır. Ayrıca; asidik ortamda (HCl'li ortamda) aldehit veya amin yapılarında fenil içeren Schiff bazları alüminyum için korozyon engelleyicidir (Ünaleroğlu vd., 2001).

Elektron çekici grup içeren ligandların metal komplekslerinin biyolojik aktivitelerinin fazla olduğu, bütün bakır komplekslerinin antibakteriyel aktivite gösterdiği, özellikle hidroksi süstitüe Schiff bazı ve komplekslerinin daha fazla aktivite gösterdiği, platin komplekslerinin anti-tümör aktivite gösterdiği, kobalt komplekslerinin oksijen ayrılması-taşınması reaksiyonları için, oksijen taşıyıcı model olarak kullanıldığı, Mn ve Ru komplekslerinin suyun fotolizini katalizlediği, demir komplekslerinin oksijenin elektrokimyasal indirgenmesinde katalizör olarak kullanıldığı bilinmektedir (Gökmeşe, 2004).

Metal şelatlarının kansere karşı gösterdikleri iyileştirici etkileri 1963 yılında Furst tarafından belirlendiğinden bu yana, bu bileşikler kanser tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Günümüzde halen kanser ilacı olarak kullanılan platin bileşiklerinin 1969 yılında Rosenberg tarafından anti tümör aktivite gösterdiklerinin belirlenmesiyle, metal komplekslerinin biyolojik aktiviteleri üzerine çalışmalar büyük hız ve önem kazanmıştır (Scovil et al., 1982; West and Pannell, 1989; Çelebier, 2004). Aromatik aminlerin Schiff bazı kompleksleri özellikle kemoterapi alanında (Singh and Rana, 1986), bazı kimyasal

reaksiyonlarda çeşitli substratlara oksijen taşıyıcı olarak (Tarafer and Miah, 1986) kullanılmaktadır. Biyolojik sistemlerde de koordinasyon bileşikleri çok büyük öneme sahiptir. Hemoglobin ve klorofil bunun tipik birer örnekleridir. Bilindiği gibi hemoglobinin oksijen taşımadaki rolü ve klorofilin yeşil bitkilerin oksijen üretmesindeki fonksiyonları hayati derecede önemlidir. Hemoglobin Fe^{2+} iyonunun porfirin ile yaptığı bir komplekstir (Keskin, 1975). Bu yapılarda metal, pirol halka sistemine bağlanarak kompleks bir yapı oluşturmuştur. Miyogloblin, ftalosiyanın ve B_{12} vitamini de benzer öneme sahip koordinasyon bileşikleridir (Köksal, 1996).

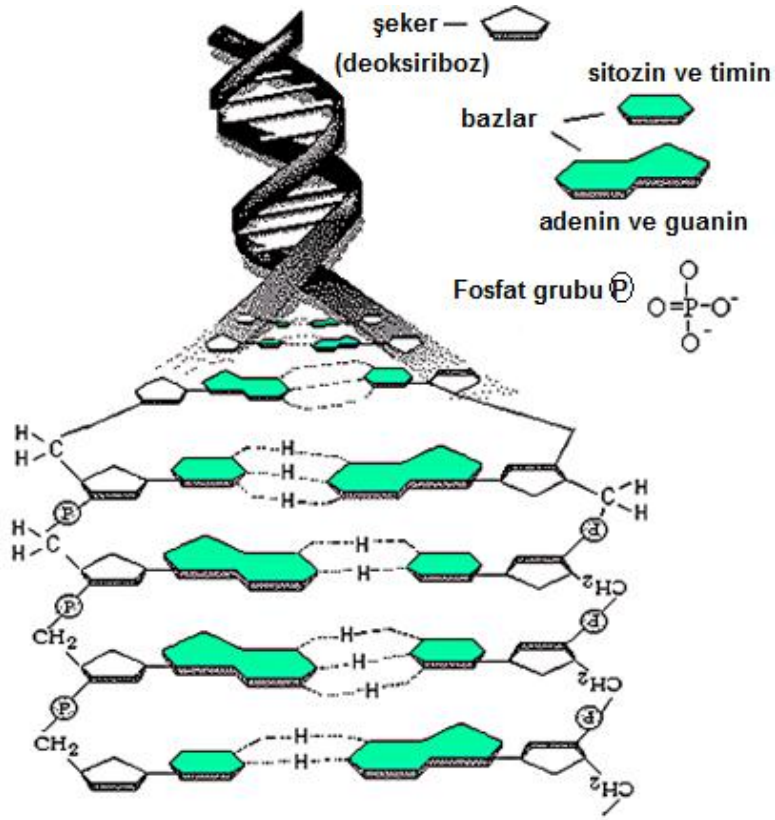
Yapılan çalışmalarda; o-vanilinin çeşitli alkil ve aromatik aminlerle oluşturduğu Schiff bazlarının ve Rutenyum komplekslerinin, Natarajan ve arkadaşları tarafından (Natarajan et al., 2002) *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani* gibi mantarlara karşı anti fungal aktiviteleri incelenmiş ve çalışmalar sonucunda hem ligandın hem de komplekslerin bu tür mantarların büyümesini ve üremesini engelleyici yönde aktivite gösterdiği bulunmuştur. Kumar ve Ramesh tarafından da (Kumar and Ramesh, 2004) aynı tür ligant ve komplekslerin *Escherichia coli*, *Bacillus* gibi bakterilere karşı anti bakteriyel aktiviteleri incelenmiştir. Çalışmalar sonucunda benzer şekilde hem ligandın hem de komplekslerin, bu tür bakterilerin büyümesini ve üremesini engellediği belirtilmiştir.

Ayrıca komplekslerin tarım alanında, polimer teknolojisinde polimerler için antistatik madde olarak (Allan et al., 1992) ve bazı metal komplekslerinde görülen sıvı kristal özelliğinden yararlanılarak uçak sanayinde, televizyon ve bilgisayar ekranlarında, dijital saatlerin göstergelerinde (Öztürk, 1998) ve daha birçok sanayi dalında kullanılırlar. Bazı geçiş metallerinin nükleolitik aktivitelere sahip oldukları bilinmektedir. Bu redoks aktif bileşikler, fizyolojik pH ve sıcaklıkta DNA moleküllerinin fosfodiester iskeletini kırmaktadırlar (Sigman et al., 1979; McLachlan et al., 1996). Cu(II) kompleksleri biyolojik aktivite bakımından oldukça önemlidir ve antitümör, antiviral ve antiinflamatuvar ajanları olarak bilinmektedirler. Özellikle Schiff baz ligandlarından oluşturulan Cu(II) kompleksleri, biyolojik bakır sistemlerinin fiziksel ve kimyasal davranışlarının incelenmesinde önemli model bileşikler olmuşlardır (Reddy and Reddy,

2000). 1,10-Fenantrolin'in Cu(II) kompleksi etkili bir şekilde nükleolitik aktivite gösteren ilk sentetik geçis metal kompleksidir (Pope and Sigman, 1984). Bleomisin (Kane and Hecht, 1994), pirol (Borah et al., 1998), tiyoeter (Dölger et al., 2000), oksim (Sağlam vd., 2002), peptit (Garcia et al., 2003), imidazol (Gonzalez-Alvarez et al., 2002), gibi bazı ligandların da bakır kompleksleri DNA-yarıcı aktivite göstermektedirler.

1.3.Plazmid DNA

Plazmidler, bakteri hücreleri içinde doğal olarak bulunan, kendi kendine replike olabilen, bakteri kromozomunun dışında, bağımsız olarak replikasyona uğrama yeteneğı olan dairesel, çift zincirli DNA molekülleridir (Klug and Cummings, 2000; Levinson and Jawetz, 2008). Çeşitli genetik bilgiler taşırlar (şifreler halinde). Kodladıkları özel enformasyonların konak bakteri için çok lüzumlu veya hayati önemi yoktur. Bunlar olmadan da bakteriler normal yaşamlarını sürdürürler. Çünkü plazmidler bakterilere sonradan transfer olmuşlardır ve özel koşullar altında da bakteriden ayrılabilirler. Plazmidler genellikle kromozom dışı olmalarına karşın, bakteri kromozomu ile bütünleşebilirler. Bunlar bakterinin genomunda bulunmayan (bazen de bulunabilen) bazı özel karakterleri kazandırır ve avantajlar sağlarlar. Hücreye bazı nitelikler kazandırma ve bunları genetik olarak kontrol altında tutabilme gibi özelliklere sahip oldukları bilinmektedir. Bakterilerin, plazmidler tarafından kodlandığı bilinen birtakım fenotipik özellikleri arasında, antibiyotiklere, ağır metal iyonlarına, ultraviyole ışınlarına gösterdikleri direnç, çeşitli enzim ve toksinler oluşturma, konakçı hücreye yapışma, koloni oluşturma, üreaz oluşturma, çeşitli karbonhidratların fermentasyonu sayılabilir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Çift zincirli DNA molekülü yapısı (Wing et al., 1980).

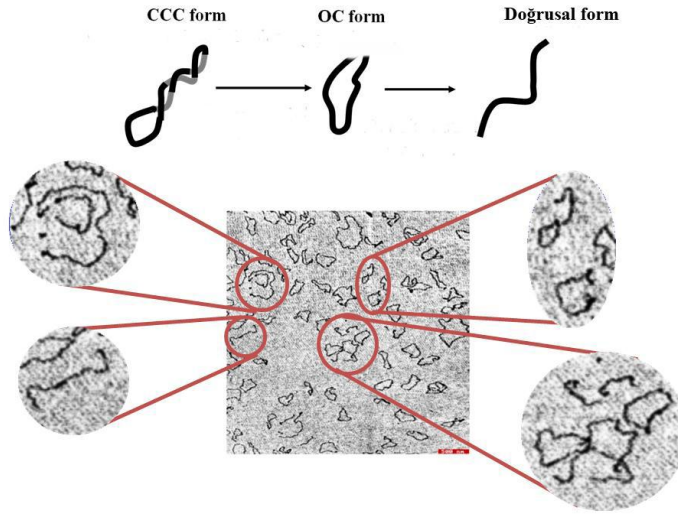
1.3.1. Plazmidlerin yapısı

Plazmid DNA beş farklı yapıda (konformasyonda) bulunur. Çentikli açık (oc) dairesel DNA, doğrusal (linear) DNA, gevşek (relaxed) dairesel DNA, süper sarmal denatüre DNA, süper sarmal (sc) veya kovalent kapalı dairesel (ccc) DNA olarak bilinir. Çentikli açık dairesel DNA'nın bir zinciri kesiktir. Doğrusal DNA'nın iki ucu da açıktır, ya hücre içinde böyle olduğu için ya da dairesel plazmidin iki zinciri de kesilmiş olduğu için bir ucu öbür ucuna takılı olmayan formda bulunur (Funnell and Philips, 2004).

Gevşek dairesel DNA'nın iki zinciri sağlamdır ama enzimler tarafından gevşetilmiş, yani süper sarmal yapısı bozulmuştur. Bir ucu öbürüne takılı formda bulunur. Süper sarmal denatüre (supercoiled denatured) DNA, iki sarmalı da kesilmemiş ama bazı kısımları

eşlenmemiş olduğu için biraz daha az sıkıdır. Bir kablonun kendi etrafında sarıldıktan sonra bir ucunun öbürüne takılmış formuna benzetilebilir (Klug and Cummings, 2000).

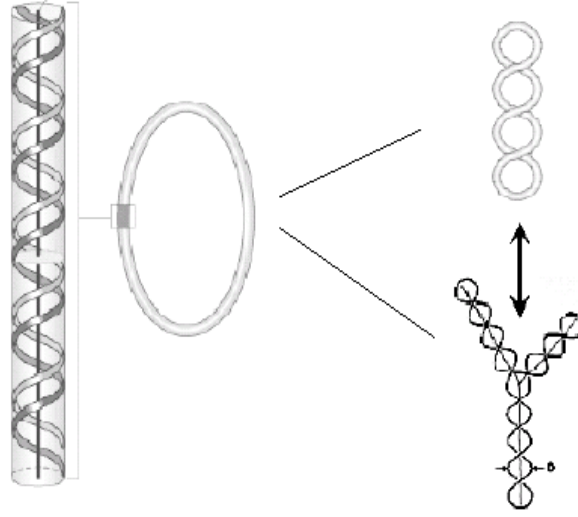
Süper sarmal DNA (veya kovalent kapalı dairesel DNA) her iki zinciri de kesik olmayan ve kendi etrafında sarılı olmak sonucunda sıkı bir yapıya sahip olan DNA'dır. Bir kablonun kendi etrafında sardıktan sonra bir ucunu öbürüne takılmış haline benzetilir. Mekanik etkiyle süper sarmal yapının serbest halkasal forma geçişi mümkündür (Klug and Cummings, 2000).



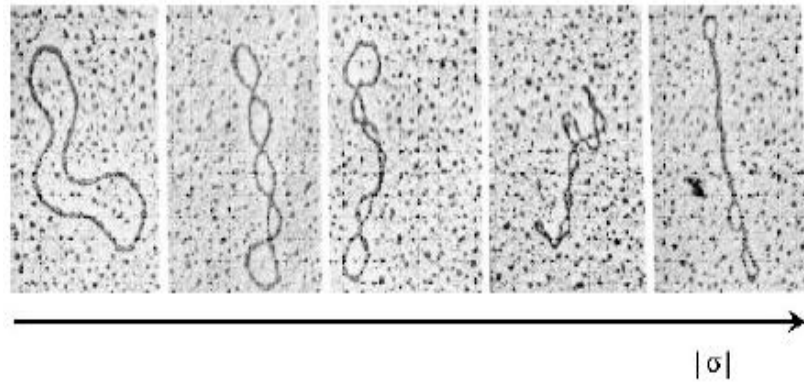
Şekil 1.2. Plazmid DNA konformasyonları ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) görüntüsü (Uji-i and Foubert, 2006)

Değişik morfolojilere sahip plazmidlerin (lineer, sirküler, süper sarmal) gerek agarose gel elektroforezisdeki lokalizasyonları, gerekse santrifüjdeki sedimentasyon katsayıları arasında farklar vardır. Elektroforez jelinde süper sarmal form, karşı uçta, doğrusal form ortada ve sirküler formlar ise başlangıç yerine yakın kısımlarda yerleşirler.

Oldukça büyük hidrodinamik $\text{\AA}$ apa ($>100 \text{ nm}$) sahip olan halkasal plazmid DNA'nın 9-26 nm gözenek boyutuna sahip çekirdeğe girebilmesi oldukça zorken, süper sarmal plazmidin çekirdeğe girme şansı çok daha yüksektir (Liu et al., 2009).



Şekil 1.3. Halkasal formda plazmid DNA ve süpersarmal yapının dallanmış ve dallanmamış formları (Ferreira, 2005).



Şekil 1.4. Farklı σ parametresine sahip süpersarmal plazmid DNA şekilleri (Ferreira, 2005).

1.3.2. Plazmidlerin sınıflandırılması

Bakteri plazmidleri çeşitli özellikleri dikkate alınarak bazı sınıflandırmalara tabi tutulmuştur. Ancak, yine de tam yerleşmiş ve bütün kıstaslara uyabilecek veya cevap verebilecek bir sınıflama yapılmış değildir (Casali and Preston, 2003) (Çizelge 1.3.).

1.3.2.1. Büyüklüklerine göre sınıflandırma

Plazmidler büyüklüklerine veya molekül ağırlıklarına göre 3 gruba ayrılmaktadırlar:

- a) Küçük (mini sirküler) plazmidler: Bunlar $1-10 \times 10^6$ dalton ağırlığındadırlar.
- b) Orta plazmidler: Bunlar, $10-50 \times 10^6$ molekül ağırlığındadırlar.
- c) Büyük plazmidler: Bu ölçülerin üzerinde molekül ağırlığına sahip olanlarıdır.

Çizelge 1.3. Farklı fiziksel karakteristikteki plazmid örnekleri
(Casali and Preston, 2003)

Plazmid	Konakçıl Bakteri	Plazmid Boyutu kbp	Plazmid Geometri	Plazmid Kopya Sayısı
pUB110	<i>Bacillus subtilis</i>	2.3	Silindirik	20-50
ColE1	<i>Escherichia coli</i>	6.6	Silindirik	10-30
lp25	<i>Borrelia burgdorferi</i>	24.2	Doğrusal	1-2
pNOB8	<i>Sulfolobus sp.a</i>	41.2	Silindirik	2-40
F	<i>Escherichia coli</i>	99.2	Silindirik	1-2
SCP1	<i>Streptomyces coelicolor</i>	350.0	Doğrusal	4
pSymA	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	1254.2	Silindirik	2-3

Büyük plazmidler bir bakteride, genellikle, 1-4 kopya halinde bulunmalarına karşın, küçük plazmidlerin kopya sayısı 20-50' ye ulaşmaktadır (multi kopya plazmidler). Küçük plazmidlerin ekserisi, kromozomlarda birleşmediğinden veya sitoplazmada yeterince bulunduklarından, hücrelerden çıkarılmaları oldukça kolay olmaktadır. Bu nedenle gen transferlerinde de genellikle küçük veya orta boy suni plazmidlerden daha fazla yarar sağlanmaktadır. Hücre içinde kopya sayısının fazla olması, ekspresyon yönünden de avantaj olarak kabul edilmektedir. Plazmid DNA'nın konakçıl bakteri genomuna katkısı farklı boyuttaki ve kopya sayısındaki plazmidlere bağlıdır (Casali and Preston, 2003).

1.3.2.2. Uyum durumlarına göre sınıflandırma

Bakteri plazmidleri, aynı hücrede birlikte bulunup bulunmadıklarına göre iki kısma ayrılmaktadır. Eğer, birden fazla plazmid aynı bakteride uyum içinde bulunabiliyorsa bunlar uyumlu grupların içine eklenmektedir. Eğer birlikte uyum içinde olamıyor ve birbirlerini itiyorlarsa bunlar da uyumsuz plazmidler olarak kabul edilmektedirler. Bu grup, aynı zamanda, birbirlerinin üremelerine veya replikasyonuna mani olmaktadır. Plazmidler bu özelliklerine göre gruplara (FI, FII, FIIII, X, PI, Ia, vs.) ayrılmaktadırlar. *E.coli* 'de 20'den fazla, stafilokoklarda 15 ve pseudomonaslarda da 11 uyumsuz grubu belirlenmiştir (Casali and Preston, 2003).

1.3.2.3. Konjugatif özelliklerine göre sınıflandırma

Küçük (1-10 kbp uzunlukta) plazmidler kendilerini bir bakteriden diğerine transfer edebilecek genetik bilgilere sahip değildirler. Bu nedenle nonkonjugatif bir özellik taşırlar. Bunların transferi, aynı bakteri içinde bulunan diğer konjugatif plazmidlerce sağlanır. Bakteri kromozomu ile birleşerek veya genel transdüksiyonla gerçekleştirilir. Bu tür plazmidler, yapılarında seks pilusu formasyonu için de genetik kodlar taşımazlar. Hâlbuki molekül ağırlıkları > 50 Md'den fazla olan büyük plazmidler, hem kendilerini ve hem de taşıdıkları bilgileri ve ayrıca, bazen de konakçı kromozomundan bir segmenti

(veya geni), aynı türden veya çok yakın cinse ait türlere transfer etme yeteneğine (bu amaç için gerekli seks pilusuna, bilgilere veya sekanslara) sahiptirler (konjugatif plazmidler). Konjugatif plazmidlerde bulunan seks pilusu formasyonunu kodlayan genler, konjugatif olmayanlarda bulunmamaktadır. Bu pilusun gen transferinde çok önemli bir fonksiyonu vardır (Casali and Preston, 2003).

1.3.2.4. Taşıdıkları özel sekanslara göre sınıflandırma

Plazmidlerin en önemli özelliklerinden birisi, DNA'larında bazı özel enformasyonların (işaretleyiciler) kodlarına sahip olmalarıdır. Konjugatif plazmidler bu özelliklerini transfer edebilme yeteneğindedirler. Bu işaretleyicilere göre plazmidler 5 gruba ayrılırlar; F faktörü (seks pilusu), Rezistenslik plazmidleri, Virulens plazmidleri, Bakteriyosin plazmidleri, Metabolik plazmidler şeklindedir. F plazmidleri; konjugasyonu sağlayan tra genlerini taşıyan çift iplikli halkasal plazmidlerdir. F faktör, cinsiyeti gösterir ve genetik materyal aktarımı için gerekli genleri taşıdığından, genetik rekombinasyonu sağlar (Klug and Cummings, 2000). F^+ bakteri ile F^- bakteri çaprazlanarak diğer hücrede de F plazmidin sentezlenmesini sağlar. Eğer F faktörü verici bakterinin DNA' sında uygun bir bölgeye yerleşirse F faktörü, bakteri DNA' sı ile bütünleşmektedir. Yüksek sıklıkla rekombinasyon yapan (Hfr = high frequency of recombination) hücreler bu şekilde oluşmaktadır. Bu durumda bakteri kromozomunu harekete geçirerek alıcı bakteriye birçok genetik özellik kazandırabilmektedirler (Klug and Cummings, 2000). R plazmidleri; antibiyotiklere direnci kodlayan (r-belirleyiciler) ve bakteriler arasında plazmidi aktaracak genleri (RTF= direnç transfer faktörü) taşırlar. Tetrasiklin, streptomisin, ampisilin, sülfonamit, kanamisin ve kloramfenikol en çok rastlanan antibiyotik direnç genleridir. Çoklu direnç gösterebilirler ve başka bakterilere de plazmid kolayca taşınabilir. Bu nedenle tıbbi açıdan oldukça önemlidirler (Klug and Cummings, 2000). Col plazmidleri; aynı plazmidi taşımayan bakteri suşlarına karşı öldürücü olan kolisin isimli proteinleri sentezlerler. R plazmidlerinin aksine genellikle diğer bakterilere taşınmazlar (Klug and Cummings, 2000).

1.3.3. Plazmidin boyutsal tanımı ve hücre içindeki miktarı

Plazmidler, boyutsal olarak bakteriyel kromozomun %20'si ile %4'ü arasındaki büyüklüklere sahip küçük moleküller olarak tanımlanabilirler (Kurt, 2003). Toplamda tipik bir bakteri hücresinin (*E.coli*) ağırlıkça < %1'ini oluştururlar (Prazeres and Ferreira, 2004) (Çizelge 1.4.).

Çizelge 1.4. *E.coli* hücresindeki nükleik asitlerin ve diğer bileşenlerin karakterizasyonu (Prazeres and Ferreira, 2004).

Türler	Miktar (%w/w)	Farklı türler/hücre	Ortalama ağırlığı
Su	70	1	18
Nükleik asitler			
Genomik DNA	0,5	1 ^a	2,8x10 ⁶
Transfer RNA	4,8	40	28
Ribosomal RNA	0,9	3	500-1000
Mesajcı RNA	0,3	400-800	660-990

1.3.4. Plazmid DNA'nın fonksiyonları ve kullanım alanları

Saflaştırılmış hazır plazmid DNA, aşı gelişimi açısından yeni bir yaklaşımdır. Plazmid DNA aşıları viral, bakteriyel ya da parazitik hastalıklarda önleyici aşı olarak; hiperimmün globulin ürünlerinde immün ajan olarak; bulaşıcı hastalıklarda terapi amaçlı; ya da kanserin bazı endikasyonlarında uygulama alanı bulabilir (Food and Drug Administration, 1996). Diziliminde gen değişimi yapılan plazmidlerin özellikle gen terapisinde ve ilaç amaçlı (hücre içinde istenilen proteini sentezleyerek) kullanımları araştırılmaktadır. Bu amaçla yapılan çalışmalar kapsamında plazmid DNA; restriksiyon enzim kesimi, bakteri hücre transformasyonu, hayvan hücre transfeksiyonu,

transkripsiyon, ligasyon, sekans analizi, PCR (polimeraz zincir reaksiyonu), klonlama gibi birçok laboratuvar ölçekli genetik uygulamada ve araştırmada kullanılır. Plazmidler rekombinant DNA teknolojisinde vektör olarak kullanım bulmaktadır. Restriksiyon enzimleriyle kesilen belli genetik niteliği taşıyan DNA parçaları vektör adı verilen taşıyıcı ajanlarla birleştirilerek konakçı içerisinde çoğaltılır. Bu klonlama işleminden sonra oluşan DNA'nın mRNA'sı üzerinden istenilen protein yapısı sentezlenebilir ve ürün izole edilerek araştırma ya da ticari amaçlarla satılmak için kullanılır (Klug and Cummings, 2000).

1.3.5. Plazmidlerin bakteride saptanması

Bakteriyel populasyonlarda plazmidlerin varlığını belirlemede fiziksel, morfolojik ve fonksiyonel testlerden yararlanılmaktadır. Bakterilerin, bazı özel karakterleri çabuk kazanması ve bunları nesillere transfer etmesi veya bunları çabuk kaybetmesi, bu özelliklerin plazmidlerce kodlandığının bir işareti olarak kabul edilmektedir. Önceden bazı özelliklere sahip olmadığı bilinen bakterilerin müteakip pasajlarında yeni karakterler kazanması ve bunları yeni nesillere transfer etmesi aynı şekilde bunların plazmidle ilişkili olabileceğini düşündürebilir.

Örneğin, laktoz negatif olan *sal-* monellalarda laktoz pozitif suşların ortaya çıkması gibi. Nonkonjugatif plazmidler veya herhangi bir özel karakter taşımayan plazmidler yüksek tuz konsantrasyonunda sentrifugasyonu kromozomal DNA ile plazmid DNA'sını birbirinden ayırmada faydalı olmaktadır. Şöyle ki, iki DNA densite bakımından farklı özellik gösterdiklerinden, santrifüj tüpünde ayrı yerlerde lokalizasyon gösterirler. DNA ekstraktları eğer dikkatlice hazırlanır ve DNA'nın parçalanması önlenirse, elektroforezde iki DNA molekülü ayrı yerlerde lokalize olurlar. Plazmid DNA'sı karşı uçta yer alırken, büyük olan kromozomal DNA başlangıç yerinde (veya buraya yakın) kalır.

Elektron mikroskopuyla da plazmid DNA kolayca görüntülenebilir. Plazmid DNA kromozomal DNA'dan, büyüklük farkı nedeniyle kolayca ayırt edilebilir. Sitoplazmada serbest bulunan plazmidlerin saptanması, kromozomla integre olmuşlardan daha kolaydır. Ancak, hücre çekirdeğiyle birleşenleri saptamak için spesifik işaretli problardan yararlanılabilir. Etidiyum bromür içeren kalsiyum klorür yoğunluk gradiyenti sentrifugasyonda da sirküler plazmid DNA'sı dibe yakın yerde, kromozomal DNA ise bunun üzerinde bant oluşturur (Food and Drug Administration, 1996).

1.4. Serbest Radikaller

Serbest radikaller atom, nötron ve protonlardan oluşan bir çekirdek ile bu çekirdeğin etrafında dönen elektronlardan meydana gelir. Atomlardaki elektronlar, orbital olarak bilinen belirli enerji seviyelerinde bulunurlar. Her bir orbital, zıt spinli en çok iki elektron tutabilir. Atom, ancak bu şekilde karardır. Atomlar, kararlılıklarını koruyabilmek ya da daha kararlı hale gelmek için yörüngelerindeki elektron sayılarını tamamlarlar. Atom, iyon veya molekül dış yörüngesinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron içeriyorsa “radikal” adını alır. Serbest radikalın eşleşmemiş elektronu baskı olarak bulunduğu atom veya grubun üzerinde ya da yanında bir nokta (.) ile gösterilir (Halliwell, 1991; Bast et al., 1991].

Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması söz konusu kimyasal türün reaktivitesinin olağanüstü arttırdığı için, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir. Elementlerin bir kısmı, atomik yapılarında paylaşılmamış elektron içerdiklerinden, doğada atomları şeklinde değil; molekül şeklinde bulunurlar (Kılınç ve Kılınç, 2002). Oksijen türevi serbest radikaller ve diğer radikal nükleik asitler, serbest aminoasitler, proteinler, lipitler, lipoproteinler, karbonhidratlar ve bağ dokusu makro molekülleri de dahil olmak üzere, canlı organizmaların yapısında bulunan hemen hemen bütün sınıflara dahil bileşiklerle reaksiyona girerek tersinir veya tersinmez hasar meydana getirebilmektedirler (Cross et al.,1987).

Bu etkilerinden dolayı bunlara reaktif oksijen türevleri (ROS, Reactive Oxygen Species) denmektedir. Reaktif Oksijen Türleri, normal vücutta ki oksijenin kullanımıyla, solunum ve immün fonksiyonu aracılığıyla bazı hücrelerde üretilmektedir. ROS' lar serbest radikaller, örneğin; superoksit anyon radikalleri ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikalleri ($OH^{\cdot}$) ve serbest radikal olmayan, tıpkı hidrojen peroksit (H_2O_2) ve singlet oksijen (O_2) içerirler. Bunlar organizmalar tarafından hücre içinde mitokondriyal solunum zincirinde, ya da hücre dışında, özellikle, fagositler tarafından oluşturulur (Gülçin, 2006; Gülçin ve Dastan, 2007).

Serbest radikaller, kısa ömürlüdürler ve elektriksel olarak pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötr olabilirler (Akkuş, 1995; Çevrim, 2000). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan serbest radikallerdir (Akkuş, 1995). Genel olarak serbest oksijen radikalleri, kovalent bağlı bir molekülün her bir parçasının ortak elektronlardan birini alarak bölünmesi, elektron eklenmesi ya da elektron kaybolması ile meydana gelirken, biyolojik sistemlerde daha çok elektron transferi sonucu oluşur (Goodyear-Brunch and Pierce, 2002).

1.4.1. Nükleik asidlere ve DNA' ya etkisi

İyonize edici radyasyona maruz kalınmasıyla oluşan serbest oksijen radikalleri DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyon meydana getirirler. Hidroksi radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer. Aktif olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit, membranlardan kolayca geçip hücre çekirdeğine ulaşarak mutajenez, karsinogenez ve hücre ölümü meydana getirebilir. . Superoksit ($O_2^{\cdot-}$) maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde daha fazla antijenik özellik gösterirler ki bu oldukça önemli bir etkidir, çünkü otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematozusta (SLE) ve romatoid artrit (RA) dolaşımında anti-DNA antikorlar bulunur. Bu yüzden DNA, serbest oksijen radikallerinin kolay zarar verdiği önemli bir hedefdir (Rikans and Hornbrook, 1997; Özkan ve Fışkın, 2004).

1.5. Antioksidanlar

Son yıllarda insanlar sağlıklı yaşam ve sağlıklı yaşlanma konularına büyük ilgi göstermektedirler. Bu nedenle alınan gıdaların ve gıdalara katılan katkı maddelerinin büyük önemi bulunmaktadır. Sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge içindedir. Reaktif oksijen birikimi organizmada bulunan veya gıdalarla alınan antioksidanlarla dengelenmediği durumlarda; oluşan “oksidatif stres” nedeniyle kanser, koroner kalp rahatsızlığı, hücresel yıpranma ve yaşlanma, mutajenizm, bağışıklık sistemi hastalıkları ve lipoprotein (LDL) oksidasyonu ile son bulan, DNA ve hücre membranları gibi duyarlı biyolojik yapıların oksidatif zararını meydana getiren radikalik zincir reaksiyonları oluşmaktadır (Halliwell and Aruoma, 1991).

Kimyasal bileşikler iki veya daha çok elementin aralarında kimyasal bağ oluşturması ile meydana gelir. Bu bağlar negatif yüklü elektronlarla sarılmıştır ve bu elektronların düzeni bileşiğe kararlılık sağlar. Serbest radikallerdeki elektronlar kararlı duruma geçmek ister ve kararlı halde bulunan bir bileşikten elektron alarak, bu bileşiği yeni bir serbest radikal haline dönüştürür. Serbest radikallerin başlattığı bu zincirleme reaksiyonlar dizisi, antioksidanlar tarafından durduruluncaya kadar devam eder (Gökpınar vd., 2006). Antioksidanlar serbest radikalleri nötralize ederek vücudun onlardan etkilenmemesini veya kendini yenilemesini sağlayan maddelerdir. Antioksidanlar hücrelere zarar veren serbest radikalleri, reaktif oksijen türlerini etkin bir şekilde indirgeyerek düşük toksiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler. Antioksidanlar vücuttan üretildikleri gibi, dışarıdan gıda yolu ile de alınabilmektedir. Besin faktörlerinde bulunan antioksidanlar insan sağlığına faydalı olduğu gibi gıda maddelerinin de raf ömrünü uzatarak ve oksidasyonu geciktirerek veya inhibe ederek besin değerlerindeki kaybı azaltmaktadırlar (Nishino, 1999; Kıralan vd. 2004).

Besin maddelerinde bulunan ve insan vücudunu serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, esas olarak vitaminler, flavonidler, karotenoidler ve polifenollerdir.

Antioksidan madde içeren gıda maddelerinin tüketimi sonucunda kanser, kalp ve damar hastalıklarının oranında büyük ölçüde azalma görüldüğü saptanmıştır (Rice-Evans et al., 1997). Ayrıca yaşlanmaya karşı mücadele edilmesinde ve bağışıklık sistemini de olumlu yönde etkilemesi nedeniyle antioksidanlar önemli maddelerdir. Antioksidanlar biyokimyacılar ve diğer sağlık uzmanları için de önemli olan maddelerdir. Vücudu reaktif oksijen maddelerine (ROS), reaktif azot maddelerine (RNS) ve reaktif klor içerikli maddelere karşı korurlar. Piyasada en çok kullanılan sentetik antioksidanlar bütillenmiş hidroksianizol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat (PG) ve tersiyer bütildihidrokinon (TBHQ) dur (Shahidi, 2000). Bu maddeler serbest radikalleri nötralize ederek organizmayı hastalıklara karşı, besin maddelerini ise bozulmaya karşı korumaktadırlar. Ancak bu bileşiklerin toksik mutajenik etkiler göstermeleri nedeni ile bazı Avrupa ülkeleri ve Japonya’da kullanılmalarına izin verilmemiştir. Bu nedenle günümüzde bitkisel kaynaklı doğal antioksidanlar üzerindeki araştırmalar daha da önem kazanmıştır (Nishino, 1999; Kıralan vd., 2004).

1.5.1. Antioksidanların etki mekanizmaları

Antioksidanlar lipit radikallerine hidrojen atomu vererek lipit oksidasyonuna etki ederler. Böylece yüksek enerjili olan lipid radikalleri ile etkileşerek onları daha kararlı ürünlere dönüştürürler. Özellikle antioksidan etkili maddelerin büyük çoğunluğu fenolik yapıda olup, fenolün kendisi antioksidan olarak inaktiftir. Yapıdaki *o*- ve *p*- konumlarındaki protonların, alkil grupları ile yer değiştirmesi sonucunda, hidroksil grubu üzerindeki elektron yoğunluğu artmakta ve bunun sonucu olarak da lipid radikaller üzerindeki etkisi artmaktadır (Shahidi and Naczk, 1995).

Antioksidanlar, oksidanları başlıca dört yolla etkisiz hale getirirler (Gökpınar vd., 2006).

- Süpürme etkisi (Scavenging): Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.

- Söndürme etkisi (Quenching): Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive etmesine denir. Vitaminler, flavanoitler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.
- Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder.
- Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekölü onarırlar.

1.5.2. Antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler

Antioksidan etkili bileşikler; metal iyon bağlayıcı, radikal giderici ve peroksit bozucu olarak çeşitli şekillerde davranış sergilerler. Buna ilaveten, diğer antioksidan etkili maddelerle de sinerjiye (aktivite artırıcı etki) sebep olduklarından dolayı birden fazla mekanizma içerirler (Eryiğit, 2006). Diğer yandan antioksidan etkili maddelerin, serbest radikal zincirini durdurduğuna ve yapısındaki fenolik hidroksil gruplardan hidrojen vererek ve kararlı bir son ürün oluşturarak, ileri lipid yükseltgenmesinin başlamasını ve ilerlemesini engellediğine inanılır (Sherwin, 1978).

Antioksidan kapasiteyi ölçmek için bu güne kadar çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Toplam antioksidan kapasitenin ölçülmesini sağlayan yöntemler, hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonlarına dayanan yöntemler ve electron transferine (ET) dayanan yöntemler olmak üzere ikiye ayrılabilir. HAT temelli yöntemlerin birçoğu azobileşiklerin bozulması ile oluşan peroksil radikalleri için antioksidan ve substratın rekabetine dayanan yarışmacı reaksiyonları kullanmaktadır. Bu yöntemler oksijen radikal absorbans kapasite (ORAC), toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre (TRAP) ve krosin beyazlatma yöntemlerini içermektedir.

ET temelli yöntemler antioksidanın oksidantı indirgeme yeteneğini renk değişimi ile ölçmektedir. Renk değişiminin derecesi örneklerin antioksidan konsantrasyonu ile alakalıdır. ET temelli yöntemler toplam Folin-Ciocalteu ayırıcı ile toplam Fenolik

yöntemi (FCR), Trolox eşiti antioksidan kapasite (TEAC), demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP), oksidan olarak bakır (II) kullanan toplam antioksidan potansiyel yöntemi (CUPRAC) ve DPPH (2,2-difenil- 1-pikrilhidrazil) yöntemini içermektedir (Albayrak vd., 2010).

Bu çalışmada; toplam antioksidan aktivite tayini (β -Karoten-Linoleik asit sistemi) ve DPPH radikal süpürme aktivite tayini metodları kullanıldı.

1.5.1.1. Toplam antioksidan aktivite tayin metodu (β -Karoten-Linoleik asit sistemi)

Bu metot da antioksidan aktivite ölçümü; linoleik asit oksidasyonu sonucunda meydana gelen konjuge dien hidroperoksitlerin ve uçucu organik bileşiklerinin inhibisyonunun ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Dapkevicius et al., 1998). Bu sistem, linoleik asidin inkübasyonu sırasında oluşan peroksit ürünlerinin, β - karotenin karakteristik sarı rengini tepkime vererek gidermesi ve bu renk gideriminin spektroskopik olarak takip edilmesi temeline bağlıdır (Eryiğit, 2006). Reaksiyon sonunda çözeltide β -karotenin kaybolan karakteristik sarı renginin absorbansı 470 nm’de spektrofotometrede ölçülür. Reaksiyon genellikle 50°C civarında başlar. Ortamda antioksidanların bulunması ya da antioksidan içerikli özütlerin ilave edilmesi, linoleik asitten oluşan peroksit ürünlerinin bu antioksidanlarla nötralize edilmesini sağlar ve bunun sonucu olarak da β -karotenin karakteristik sarı rengi korunmuş olur. Dolayısıyla daha yüksek absorbans daha yüksek antioksidan aktiviteyi gösterir (Eryiğit, 2006). Bu yöntemin üstünlüğü; hızlı, basit ve duyarlı bir yöntem olmasıdır (Koleva et al., 2002).

1.5.1.2. Serbest radikal giderim aktivite (DPPH) tayin metodu

Bitkisel ekstraktların serbest radikal giderim aktivitesinin; ekstrakt bünyesinde yer alan ve antioksidan etkili bileşiklerin ortama ilave edilen serbest radikal ajanına protonlarını verebilme yeteneğine ve aynı zamanda yapısal konformasyonlarına göre değiştiği ifade edilmektedir (Fukumoto and Mazza, 2000). Bu yöntem de kullanılan 1,1-difenil-2-

pikrilhidrazil (DPPH•) radikali 517 nm de maksimum dalga boyuna sahip olup, antioksidan etkili maddelerle etkileşerek daha kararlı diamagnetik bir moleküle dönüşür (Soares et al., 1997). 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalının metanolik çözeltisinin rengi koyu violedir. Ortama antioksidan içerikli ekstre ilave edildiğinde bu koyu renk yukarıdaki reaksiyon sonucunda açılır ve bu renk açılımı spektrofotometrik olarak 517 nm de absorbansları ölçülerek tespit edilir (Molyneux, 2004). Bu absorbans değerlerinden faydalananarak % İnhibisyon değerleri ve IC₅₀ değerleri hesaplanır. Numunelerin IC₅₀ değerleri ne kadar düşük olursa, antioksidan aktivite etkisi de o kadar yüksek olur (Pourmorad et al., 2006).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Alkalen proteaz enziminin saflaştırılması ile ilgili çalışmalar

Adinarayana vd. (2003)'in, jel filtrasyon kromatografisi kullanarak yaptıkları çalışmalarında *B. subtilis* PE-11'den alkalen proteazın saflaştırma katsayısı 21,0 en iyi verim %7,5 olarak belirtilmiştir. Patel vd. (2006), DEAE-selüloz ve sefadeks-200 ile *Bacillus sp.*'den saflaştırdığı alkalen proteaz verimini ve katsayısını sırası ile % 6 ve 112 olarak bulmuşlardır. Zambare (2010), *Bacillus subtilis*'den jel filtrasyon kromatografisi ile proteaz enziminin saflaştırdığı çalışmasında saflaştırma katsayısı 9.67 ve en iyi verim % 71.32 olarak belirtmiştir. *B. pumilus* (Lee et al., 1996), *Bacillus sp.* PS719 (Madigan and Mars, 1997) ve *B. pseudofirmus* (Manczinger vd., 2003) soylarından saflaştırılan alkalen proteazlarda iyon değiştirme kromatografisi kullanılmış ve kolon çıkışı itibariyle sırasıyla % 58, % 65 ve % 24 verime ve 3,9; 4,9 ve 21,4 kat saflaştırma derecesine ulaşılmıştır. Beg ve Gupta (2003)'nın *Bacillus mojavensis*'den Q-sefaroze kolon ile saflaştırdığı serin proteazın verimi ve katsayısı sırası ile % 37,2 ve 17,1'dir. Singh vd. (2001a), DEAE-sefadeks ve sefaroze ile *Bacillus sp.* SSRI'den saflaştırdığı serin alkalen proteazın saflaştırma verimini ve katsayısını sırası ile % 36,9 ve 19,3 olarak bulmuşlardır. Öztürk (2007)'ün yapmış olduğu bir çalışmada *Bacillus licheniformis* BA17 alkalen proteazı saflaştırma sonucunda elde edilen en iyi verim ve saflaştırma katsayısı sırası ile %58 ve 5,4' dür. Bal (2005)'in *B. clausii* GMBAE22'den DEAE-Selüloz kolon kromatografisi kullanarak elde ettiği verim ve saflaştırma katsayısı sırası ile %15 ve 2,66' dır. Gupta vd. (2005)'nin *Bacillus sp.*'den hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanarak saflaştırdıkları alkalen proteazın verimi ve saflaştırma katsayısı sırası ile %82 ve 10'dur.

Antioksidan yöntemler ile ilgili çalışmalar

Tarafder vd. (2002)'in yaptıkları çalışmada Schiff bazı ve onun Cu(II), Zn(II), Cd(II) komplekslerinin antioksidan etkileri araştırılmış ve sonuçta ligand ve komplekslerin α -

tocoferol (vitamin E) ile karşılaştırıldığında güçlü bir antioksidan olduğu bulunmuştur. Marek vd. (2008)'in çalışmasında Salisilaldehit ve β -alanin türevi Schiff bazı ve onun Cu(II) ve Zn(II) kompleksleri sentezlenmiş ve antioksidan etkileri incelenmiştir. Sonuçta Cu (II) kompleks'inin antioksidan aktiviteye yarar sağladığı Zn(II) kompleksinin ise in vitro da trozin nitrasyonuna karşı önemsiz derecede koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir. Selçuk (2010), yaptığı çalışmasında Schiff bazı ve metal komplekslerinin DPPH indirgeme metoduyla serbest radikal temizleme özelliğini incelemiş ve bu deneyler sonucunda bileşikler radikal temizleme özelliği göstermediğinden antioksidan aktiviteye sahip olmadıklarını belirtmiştir. Zhang vd. (2011)'in yaptıkları bir çalışmada Schiff bazı ve metal komplekslerinin DPPH indirgeme metoduyla serbest radikal temizleme özelliği incelenmiş ve bileşiklerin radikal temizleme özelliği gösterdiği bulunmuş ve BHA'ya göre kıyaslandığında güçlü bir antioksidan özellik gösterdiği belirtilmiştir. Ceyhan vd. (2011)'in buna benzer bir çalışmasında da Schiff bazı ve metal komplekslerinin DPPH indirgeme metoduyla serbest radikal temizleme özelliği incelenmiş ve bileşiklerin radikal temizleme özelliği gösterdiği ifade edilmiştir. Çakmak (2007), yaptığı çalışmada Cu komplekslerinin ortamda oksidatif stres oluşturarak serbest radikal oluşumunu artırdığını ileri sürmüş ve Cu-kompleksinde Cu(II)'nin indirgenme yükseltgenme potansiyelinin kompleksin indirgenme yükseltgenme potansiyelini etkileyerek serbest radikal üretimini tetiklediğini belirtmiştir

Agaroz jel elektroforezi ile metal komplekslerin ve ligandların plazmid DNA üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar

Rossi vd. (2002), dinükleer bakır komplekslerinin fizyolojik pH ve sıcaklıkta çift sarmal plazmid ve genomik DNA'nın ayrılmasını etkili bir şekilde desteklediğini ifade etmişlerdir. Kim ve Kim (2003), dinükleer bakır komplekslerin plazmid DNA'nın gevşek sarmal ve doğrusal sarmal yapıları açtığını bulmuşlardır. Sissi vd. (2005), bakır komplekslerin plazmid DNA'nın ayrılmasında çok etkili bir katalizör olduğunu belirtmişlerdir. Reddy ve Manjula (2007)'nin çalışmasında da bakır içeren komplekslerin plazmid DNA'nın hidrolitik ayrılması için katalizör etkili olduğu ve

süpersarmal DNA'yı çentikli ve çizgisel formlara dönüştürdüğü belirtilmiştir. Babu vd. (2007), çalışmalarında bakır içeren tüm metal komplekslerin oksidatif ve hidrolitik yollarla süpersarmal DNA'yı ayırdığını göstermişlerdir. Uma vd. (2007)'in mononükleer bakır kompleksleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada da komplekslerin plazmid DNA'yı ayırıcı etki gösterdiği belirtilmiştir. Dede vd. (2009a), yaptıkları bir çalışmada homo ve heterodinükleer bakır komplekslerin süpersarmal DNA'yı çentikli ve çizgisel formlara ayırdığını ve H₂O₂'nin dolaylı oksidasyonuna bağlı olarak phenanthroline içeren dinükleer komplekslerin güçlü ayırıcı aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Dede vd. (2009b), diğer bir çalışmada da agaroz jel elektroforezi ile kompleksler ve DNA arasındaki etkileşimleri araştırmış ve homo ve heterodinükleer bakır komplekslerinin H₂O₂ varlığında süpersarmal DNA'yı çentikli ve çizgisel şekillere ayırdığını bulmuşlardır. Tian vd. (2010)'in çalışmalarında bakır içerikli komplekslerin DNA'nın bozulmasında etkili olduğu ve bunun için ek olarak bir ayıraca gerek olmadığı ifade edilmiştir. Kumar vd. (2011), bakır ve kobalt içeren mononükleer komplekslerin H₂O₂ varlığında ve yokluğunda DNA yarıcı aktivite gösterdiğini ifade etmişlerdir. Massoud vd. (2011), dinükleer bakır komplekslerin plazmid DNA'da önemli açılmalar meydana getirdiğini H₂O₂ varlığında ve yokluğunda da aynı özelliği gösterdiğini bulmuşlardır. Tjioet vd. (2011), ligandların ve bakır komplekslerin süpersarmal DNA'yı gevşek sarmal ve doğrusal formlara ayırdığını bulmuşlardır.

SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile alkalen proteaz enzimin moleküler ağırlığının tayini ile ilgili çalışmalar

Takami vd. (1989), *Bacillus* sp. no AH-101'den elde ettikleri alkalen proteaz enziminin molekül ağırlığını 29 kDa olarak bulmuşlardır. Ferrero vd. (1996), çalışmalarında *Bacillus licheniformis* MIR29'dan elde ettikleri iki alkalen proteazın molekül ağırlığını 25 kDa ve 40 kDa olarak bildirmişlerdir. Yang ve arkadaşlarının (2000) yaptıkları bir çalışmada, *B. subtilis*'den saflaştırılan proteaz enziminin moleküler ağırlığı 44 kDa olarak ifade edilmiştir. Singh vd. (2001b), *Bacillus* sp. SSR1'den elde ettikleri alkalen proteaz enziminin molekül ağırlığını 29 kDa olarak belirtmişlerdir. Huang vd. (2003),

Bacillus pumilus'den elde ettikleri enzim için molekül ağırlığı 32 kDa olarak bildirmişlerdir. Beg ve Gupta (2003), *Bacillus mojavensis*'den saflaştırdıkları serin alkalen proteaz enziminin molekül ağırlığını 30 kDa olarak yayınlamışlardır. Joo ve Chang (2005), halotolerant *Bacillus clausii* I-52'den elde ettikleri alkalen proteaz enziminin molekül ağırlığı 28 kDa olarak bildirilmiştir. Kazan vd. (2005), *Bacillus clausii* GMBAE42'den saflaştırdıkları serin alkalen proteaz enziminin molekül ağırlığını 26.55 kDa olarak yayınlamışlardır. Bal (2005), *Bacillus clausii* GMBA22'den saflaştırdığı alkalen proteazın molekül ağırlığını 25,4 kDa olarak bulmuştur. Gupta vd. (2005), *Bacillus sp.*'den saflaştırdıkları alkalen proteaz enziminin molekül ağırlığını 29 kDa olarak belirlemişlerdir. Zambare (2010), *Bacillus sp.*'den elde ettiği proteaz enziminin molekül ağırlığını 35 kDa olarak bulmuştur. Sevinç ve Demirkan (2011), yaptıkları çalışmada *Bacillus sp.* no. N-40'dan elde ettikleri alkalen proteaz enziminin molekül ağırlığını 52 kDa olarak bulmuşlardır.

Proteaz enzimi üzerine in vitro polinükleer metal kompleksleri çalışmaları

Nilegaonkar et al. (2007)'ın yaptıkları bir çalışmada Cu^{2+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarının proteaz aktivitesinde artışa neden olduğu belirtilmiştir. Yine benzer birçok çalışmada bu iyonların proteaz aktivitesini artırdığı ortaya konulmuştur (Johnvesly and Naik, 2001; Gupta vd. 2005; Beg and Gupta, 2003; Singh vd. 2001a; Rahman vd. 2006; Mei ve Jiang, 2005). Karipcin vd. (2010) çalışmasında da bu tür komplekslerin katalaz ve katekolaz enzimleri üzerinde aktive edici bir özelliğe sahip olduğu gösterilmektedir. Dede vd. (2011)'nin yaptıkları bir çalışmada, bakır içeren komplekslerin katalaz ve katekolaz enzimleri üzerinde aktive edici bir özelliğe sahip oldukları belirtilmiştir. Uyar vd. (2011)'in çeşitli metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'ın aktivite gösterdiği görülmüştür.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

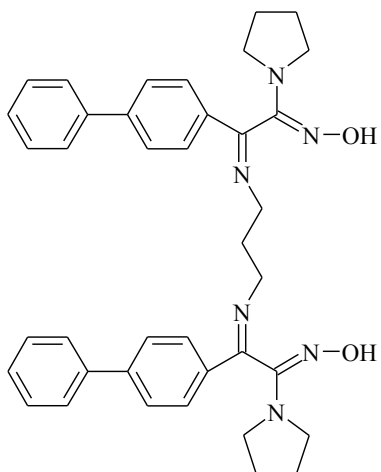
3.1 Kullanılan Maddeler

Bu çalışmada analitik saflıkta kimyasal maddeler kullanılmıştır. Deneylerde Glukoz, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu, Pepton, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, HCl, NaOH, Azokazein, $HClO_4$, Hammersten kazein, TCA, Na_2CO_3 , Folin-Ciocalteu, Glisin, Tirozin, Kazein, $(NH_4)_2SO_4$, Sephadex G – 100, Sephadex G – 200, Sephacryl S – 200, Tris, DEAE – Cellulose, DEAE – Sepharose, CM – Cellulose, NaCl, SDS, Akrilamid, Bis – akrilamid, Gliserol, Betamerkaptoetanol, Bromofenol Blue, TEMED, Etanol, Asetik Asit, Sodyum Tiosülfat, Sodyum Asetat. $3H_2O$, Gümüş nitrat, Sodyum hidrojen karbonat, Formaldehit, EDTA, Thimerosol, Coomassie Blue R – 250, Maya (yeast), Formaldehit, Metanol ve 2-(N-Morfolino) etansülfonik asit kullanılmıştır. Ayrıca kullanılan Schiff bazları kompleksleri Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nden temin edilmiştir.

3.2. Kullanılan Metal Kompleks ve Ligandlar

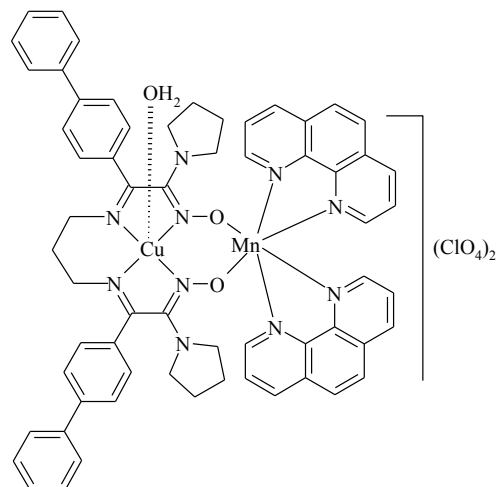
N,N'-Bis [1-(4-fenilfenil)-2-hidroksiimino-2-(pirolidino)-1-etiliden]-1,3-propandiamin (A_1), N,N'-bis[1-(4-fenilfenil)-2-hidroksiimino-2-(pirolidino)-1-etiliden]-1,3 propan diamin'in heterodinükleer Cu(II)-Mn(II) kompleksi (A_2), N,N'-bis[1-(4-fenilfenil)-2-hidroksiimino-2-(pirolidino)-1-etiliden]-1,3-propandiamin'in heterodinükleer Cu(II)-Co(II) kompleksi (A_3), N,N'-bis[1-(4-fenilfenil)-2-hidroksiimino-2-(4-kloroanilino)-1-etiliden]-1,3-propandiamin(B_1),N,N'-bis[1-(4-fenilfenil)-2-hidroksiimino-2-(4-kloroanilino)-1-etiliden]-1,3-propandiamin'in homodinükleer Cu(II) kompleksi (B_2) ve N,N'-bis[1-(4-fenilfenil)-2-hidroksiimino-2-(4-kloroanilino)-1-etiliden]-1,3 propandiamin'in homotrinükleer Cu(II) kompleksi (B_3)' dir.

A₁



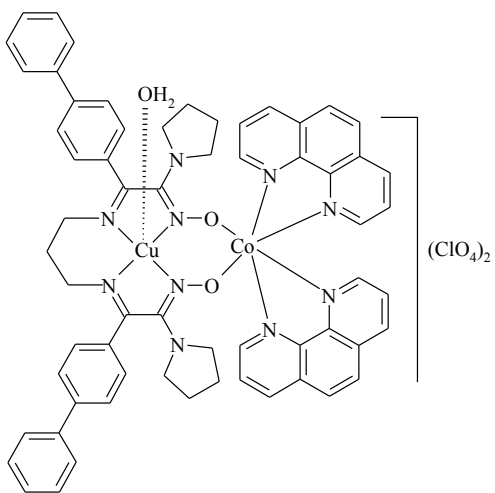
MA= 626,799 g/mol

A₂



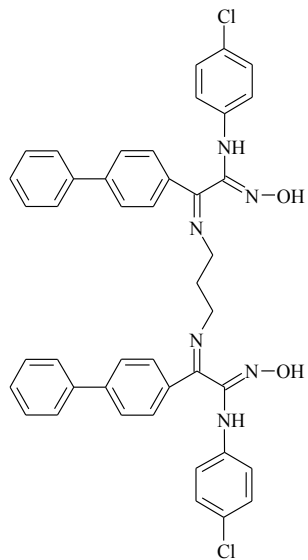
MA= 1320,59 g/mol

A₃



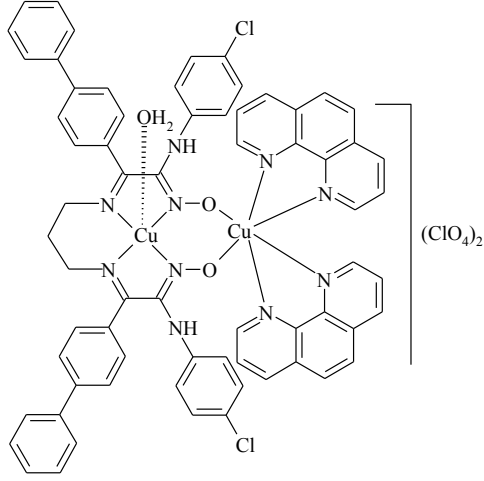
MA= 1324,58 g/mol

B₁



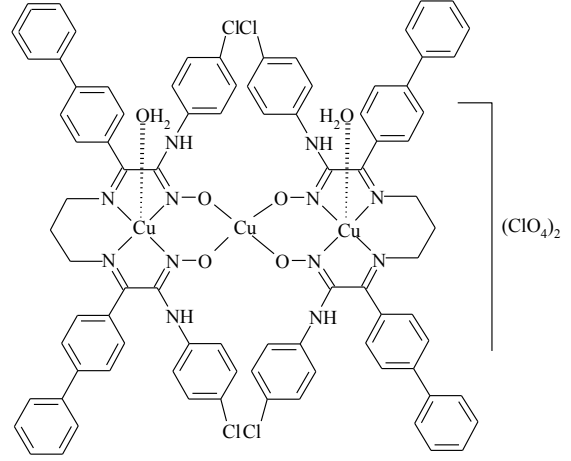
MA= 739,702 g/mol

B₂



MA= 1442,09 g/mol

B₃



MA= 1900,92 g/mol

Bu metal kompleksleri ile proteaz enzimi üzerine in vitro çalışmalar yapılarak enzim aktivitesindeki etkileri incelenmiştir.

3.3. Kullanılan Aletler

Gradientli Elüsyon Tankı, UV Spektrofotometresi, Soğutmalı Santrifüj, İnkübatör, Su Banyosu, Steril Kabin, Derin dondurucu, Kromotografi Soğutma Düzenegi, İspirto Ocağı ve pH metre SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden temin edilmiştir.

3.4. Deneysel Bölüm

3.4.1. Proteaz enziminin saflaştırılması

3.4.1.1. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşunun büyütülmesi

Besiyerin hazırlanması

0,25 g Et ekstraktı

1,25 g Pepton

0,5 g Yeast

1,25 g NaCl

250 mL Saf su

pH=7,50

Sıcaklık 37 °C

Yukarıdaki maddeleri içeren çözelti ortamı hazırlandı. 121 °C sıcaklıkta 15 dk süre ile otoklavlandı.

Bakteri ekimi

Stok bakteri çözeltisinden 250 µl alınarak 250 mL besiyer içerisine uygun şekilde ekildi.

İnkübasyon

İnkübasyon işlemi 72 saat süre ile 140 rpm dönüş hızında ve 37 °C sıcaklıkta gerçekleştirildi. Bu işlemten sonra besiyer 0,45 µm filtre kâğıdından süzüldü. Bakteriler 3mL'lik sıvı besi ortamında büyütüldü. 6000 rpm'de santrifüj edildi. Alt kısmı alınarak, sıvı kısmı saklandı. Daha sonra alt kısım 250-300 ml pH: 7-8 olan Tris tamponunda (bizim tampon asetat tamponu) çözüldü. Santrifüj edilerek çözelti alındı.

3.4.2. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Tuzla çöktürme (salting-out) proteinlerin konsantre edilmesinde ve saflaştırılmasında geniş çapta kullanılan bir yöntemdir. Ortama eklenecek nötral tuz, genellikle denatürasyona yol açmadan, proteinlerin agregasyonuna (bir araya gelmelerine) ve

çözeltiden ayrılarak çökmelerine yol açar. Proteinler farklı tuz konsantrasyonlarında çöktürülerek birbirlerinden ve çözeltideki diğer moleküllerden ayrılabilir. Çöktürme işleminde genellikle etkinliği ve çözünürlüğü yüksek, pH'yı fazla etkilemeyen, çözeltide fazla ısınmaya yol açmayan, ucuz ve etkin bir tuz olan amonyum sülfat $[(NH_4)_2SO_4]$ kullanıldı.

Birçok protein %55 amonyum sülfat doygunluğunda çöker. % 70 doygunluk genelde tümünün çökmesini sağlar. Çözeltinin istenilen tuz miktarı ayarlandı. Bu ayar aşağıdaki formülden hesaplandı:

$$X = \frac{505.(S_2 - S_1)}{1 - 0.285S_2} \quad (3.1)$$

X= 1 litre çözeltiye eklenecek gram amonyum sülfat miktarı

S_1 = Amonyum sülfatın başlangıç konsantrasyonu (%)

S_2 = Amonyum sülfatın son konsantrasyonu (%)

Yöntem

20-50 ml protein çözeltisi içeren beher, manyetik karıştırıcı üzerindeki buz dolu bir kabın içine yerleştirildi. Çözeltiye eklenecek amonyum sülfat miktarı belirlendi ve sürekli karıştırılarak yavaş yavaş ortama katıldı. Tuz ilavesi bittikten sonra, 10-60 dakika daha karıştırmaya devam edildi. 10.000 x g' de 10 dakika veya 3.000 x g' de 30 dakika santrifüjlenerek üst sıvı alındı. Çökelti, kendi hacminin 1-2 katı tamponda (örneğin, 50 mM Tris-HCl, pH 8) çözündürüldü. Protein katı amonyum sülfat kullanılarak diyaliz yöntemi ile çöktürüldü (0,80 %). Çöktürülen protein pH=7,5 olan 50mM fosfat tamponu içinde çözüldü ve aynı tampon gecede üç değişimle diyaliz edildi. Ortamdaki amonyum sülfat diyaliz ile uzaklaştırıldı.

3.4.3. Jel filtrasyon kromatografisi

Kolon dolgu materyalinin seçimi

Literatür bilgileri ışığı altında endo- β -1,4-glukanaz enziminin *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşundan jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılmasında Sephadex G-100 maddesinden yararlanılmıştır. Çalışmamızda 30 cm uzunluğunda 1,5 cm çapında cam kolon kullanılmıştır.

Sephadex G-100 maddesinin ve jel filtrasyon kolonunun hazırlanması

Sephadex G-100 120 °C sıcaklıkta 30 dakika süre ile otoklavda steril edildi. Daha sonra Sephadex G-100 içerisinde 20 mM Tris-HCl (pH=8,0) tamponu bulunan bir Nuche erlenine eklendi. 20 °C sıcaklıkta 12 saat ya da 100 °C sıcaklıkta 4 saat bekletildi. Üst kısımdaki tamponun büyük bir kısmı boşaltıldıktan sonra bir vakum pompası yardımıyla havası alındı. Bu işlemler tamamlandıktan sonra madde kolona tatbik edildi.

Kolonun dengelenmesi

Sephadex G-100 kolona doldurulduktan sonra kolonun dengelenmesi işlemi yapıldı. Bu amaçla 20 mM Tris-HCl (pH=8,0) tamponundan yararlanıldı. Dengeleme işlemine kolonun üst kısmından verilen çözeltiyle alt kısmından alınan çözeltinin hem 280 nm dalga boyundaki absorbans değeri hem de pH değeri aynı olana kadar devam edildi.

İşlemin uygulanması

İyon değişim kromatografisinde aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirildikten sonra jel filtrasyon kolonuna yüklendi. İlk olarak numunenin tamamının Sephadex G-100 içerisine emdirilmesi sağlandı. Sonra 20 mM Tris-HCl (pH=8,0) tamponu ve 0-0,5 M

NaCl çözeltisi gradientli bir elüsyon tankı yardımıyla akış hızı saatte 9 ml olacak şekilde kolondan geçirildi. Çalışma 4 °C sıcaklıkta gerçekleştirildi. Fraksiyonlar 3 ml olacak şekilde toplandı. Her birinin 280 nm dalga boyundaki absorbansı kontrol edilerek uygun tüplerdeki fraksiyonların selüloz aktivite testleri yapıldı (Yin et al., 2010).

3.4.4. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile alkalin proteaz enzimin moleküler ağırlığının tayini

Enzimin saflaştırılmasından sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat (SDS-PAGE) poliakrilamid jel elektroforezi Laemmli tarafından anlatıldığı gibi yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli, 1970). Bunun için elektroforez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren mikalara vazelin ince tabaka halinde sürüldü. İki cam plaka birbiri üstüne konuldu ve kısıkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konuldu. Cam plakaların altı, kaynama sıcaklığına getirilerek çözülüp daha sonra 40-50°C'ye getirilmiş agar dökülerek kapatıldı. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle döküldü. Hava olmamasına dikkat edildi.

Jel yüzeyinin düzgün olması için %0,1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşıncaya kadar (yaklaşık yarım saat) beklendi. Katılaştıktan sonra üstündeki %0,1'lik SDS döküldü. Daha sonra yığma jel üst yüzeye kadar ilave edildi. Üzerine tarak dikkatlice yerleştirildi. Tarağın da üstüne nemli süzgeç kâğıdı konularak bir gece bekletildi. Ertesi gün tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Numuneler her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı.

Toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. 3 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulularak, elektroforeze çok ince bir enjektör yardımıyla uygulandı. Tank kapağı kapatılarak alt tarafından (+) kablo (anot), üstten (-) kablo (katod) yerleştirildi. Önce 80 voltta yarım saat bekletildi. Daha sonra

150 volta ayarlanarak 4-5 saat oda sıcaklığında tatbik edildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Bu yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere saklandı ve sabitleştirme çözeltisinde (%50 izopropanol + %10 triklor asetik asit + %40 saf su) 30-40 dakika bekletildi. Daha sonra fikse çözeltisinden çıkarılan jel özel kabına konularak, renklendirme çözeltisi üstünü örtünceye kadar eklendi. 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılarak, renksizleştirme çözeltisine alındı. Belirli aralıklarla değiştirilmek sureti ile jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalandı. Renksizleştirme çözeltisi, aktif karbon üzerinden geçirilerek tekrar tekrar kullanıldı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi.

Elektroforezde kullanılan ayıraçlar

Renklendirme çözeltisi; %0,1 Coomassie brilliant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit, %40 saf su ile hazırlandı.

Renksizleştirme çözeltisi: %50 metanol, %10 asetik asit, %40 saf sudan ibarettir.

Ayırma jeli: 15 ml 1 M Tris-HCl (pH=8,8), 10,66 ml %30'luk akrilamid- %0,8'lik bisakrilamid, 0,61 ml %10'luk SDS, 0,4 ml %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin) ve 11,94 ml su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 ml %1,5'luk amonyum persülfat $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (PER) ilave edildi. Burada kullanılan PER kullanılmadan önce taze olarak hazırlandı.

Yığma jeli: 1 M'lık Tris-HCl (pH=8,8)'den 1,24 ml, %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1ml %10'luk SDS'den 0,1 ml %5'lik TEMED'den 0,1 ml ve saf sudan 7,36 ml alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış %1,5'luk PER'den 0,2 ml ilave edildi.

3.4.5. Alkalen proteaz aktivitesi ölçümü

Proteaz aktivitesi substrat olarak kazein kullanılarak, Anson'a göre tayin edildi. Reaksiyon karışımının içeriği pH'ı 7,5 olan fosfat tamponu ve 5ml %0,65'lik kazein ve 1,0 ml enzimdir. 37°C'de 30 dakikalık inkübasyondan sonra reaksiyon karışımı 5 ml %10'luk TCA eklenerek sonlandırıldı ve 10 dakika buz içinde bekletildi, içindekiler Wattman No-50 filtre kâğıdından süzüldü. 2ml' lik süzüntüye 5,0 ml 0,2 M' lik bazik sodyum karbonat ve 1,0 ml Folin & ciocalteu'nun fenol ayırıcı ilave edildi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi ve absorbans UV spektrofotometrede 660nm de ölçüldü (TG-80+). Enzim aktivitesi önceden oluşturulmuş tirozin standart grafiğinin eğimi kullanılarak aşağıda verilen formül ile hesaplandı.

$$\text{Aktivite} = \frac{(\mu\text{g Tirozin})}{(\text{ml Çözelti}) \times (\text{İnkübasyon süresi})} \times \frac{(\text{Deneyin toplam hacmi})}{(\text{Kolorimetrik tayinde kullanılan hacim})} = \frac{\text{EU}}{\text{ml}}$$
$$\text{Spesifik Aktivite} = \frac{\text{AKTİVİTE} \left[\frac{(\mu\text{g Tirozin})}{(\text{ml Çözelti}) \times (\text{İnkübasyon süresi})} \times \frac{\text{Deneyin toplam hacmi}}{\text{Kolorimetrik tayinde kullanılan hacim}} \right]}{\frac{(\text{mg Protein})}{(\text{ml Çözelti})}} = \frac{\text{EU}}{\text{mg}}$$

(3.2.)

Bir ünite alkalen proteaz aktivitesi, kazeinin hidrolizi sonunda, 30 °C'de, 1 dakikada % 0,6 kazeinden 1µg tirozin oluşturan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir. (1U/ml=1µg tirozin / dak. x ml) Tirozin standartı tirozinin TCA solüsyonunda farklı konsantrasyonlarda (0,1-0,5 µmol/L) çözülmesiyle hazırlandı.

3.4.6. Lowry yöntemi ile protein tayini

Bu yöntem, fosfomolibdotungstik asit çözeltisinin (Folin-Ciocalteu belirteci) tirozin bakiyeleri ile reaksiyona girerek mavi bir renk oluşturması esasına dayanır. Reaksiyon, bakır ile protein arasında kompleks oluşumu ile başlar; alkali çözeltide, oda sıcaklığında

5-10 dakika içinde tamamlanır. Bakırın varlığı yöntemin duyarlılığını 3-15 kat artırmaktadır, çünkü Cu ile yapılan kompleks, Folin belirtecindeki molibden ve tungsten ile birleşerek yeni bir kompleks ortaya koyar.

Ancak analiz edilen örnekteki fenolik maddeler hatalara yol açabilir. Bu yöntemin kullanılabilmesi için, 6 ml reaksiyon karışımında 10-200 µg protein bulunmalıdır. Bu sınırlara göre, 6 ml reaksiyon ortamına katılacak olan 0,5 ml örneğin 10-200 µg protein içermesi gerekir. Ayrıca ilgili protein özütünün hazırlanmasında kullanılan tamponun da olumsuz etkisi olabilir. Örneğin, Tris gibi primer aminler proteinlerin Lowry (1951), yöntemi ile analizinde hatalara yol açarlar veya bazı enzimleri inhibe edebilirler.

Çözeltiler

Bu yöntemde kullanılacak tüm cam eşyalar çok temiz olmalı ve çıplak elle tutulmamalıdır.

- A)** N NaOH içinde %2 (w/v) Na_2CO_3
- B)** %1 (w/v) Na- veya K-tartarat içinde %0,5 (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- C)** 50 ml **A** belirteci ile 1 ml **B** belirteci karışımından oluşur. Taze hazırlanır.
- D)** 1 hacim Folin belirteci: 2 hacim sudan oluşan karışımdır. Taze hazırlanır ve ışıktan korunur; Folin zehirli olduğundan mikropipet kullanılmalıdır.

Yöntem

Çalışma aralığına uygun konsantrasyonda 0,5'er ml standartlar (örneğin, 20, 80, 140, 200, 280, 340, 400 µg/ml), kör örnek ve protein örnekleri, 5' er ml **C** belirteci ile karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir. 0.5 ml **D** belirteci hızla ve vorteks ile karıştırılarak eklendi. **D** çözeltisinin ortama katılması ve homojen bir şekilde karıştırma işlemi 2-3 saniye içinde tamamlanmalıdır. Bunun için eklemenin yapılacağı tüp vorteks üzerinde tutulur ve tam ekleme sırasında hızla karıştırıldı. 30 dakika karanlıkta

bekletildi. 660 nm’de absorbanslar ölçülür. Standart eğri grafiği hazırlanarak protein derişimi bulundu.

3.4.7. Antioksidan yöntemler

3.4.7.1. DPPH radikali süpürme aktivitesi

Bu yöntemde DPPH radikali bir antioksidan tarafından radikal olmayan DPPH-H formuna dönüştürülür. DPPH radikali süpürme aktivitesi tayini Brand – Williams, Cuvelier, Berset (1995), tarafından geliştirilen ve Fukumoto and Mazza (2000) tarafından modifiye edilen metoda göre uygulandı. DPPH radikali süpürme aktivitesi tayininde ilk olarak DPPH (2,2 – difenil – 1 – pikrilhidrazil) radikalinin 40 mg/l konsantrasyonunda uygun bir alkol ile çözeltisi hazırlandı. Daha sonra radikal süpürme aktivitesine bakılacak bileşiklerin değişik konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı. Bu bileşiklere ait çözeltilerden 500 µl alınarak bir deney tüpüne eklendi. Ardından 3000 µl DPPH çözeltisi (40 mg/l) ilave edildi. Karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında 2 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra 515 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Çalışma esnasında her bir konsantrasyon değeri 3 tekerrür olacak şekilde uygulandı. Reaksiyon ortamındaki DPPH radikali miktarı, DPPH kalibrasyon grafiğinden hesaplandı.

3.4.7.2. β-karoten-linoleik asit yöntemi

β-karoten-linoleik asit emülsiyon çözeltisi:

1 mg β-Karoten hassas olarak tartılır. 5 ml kloroform içinde çözüldü. Bu çözeltilerden 1 ml alınarak içerisine 25 µl linoleik asit ve 200 mg Tween-40 ilave edilerek karıştırıldı. Evaporatör yarımıyla 40⁰C sıcaklıkta kloroform uzaklaştırıldı.

β -karoten-linoleik asit yöntemi

β -Karoten-Linoleik asit emülsiyonundan 200 μ l alınarak bir erlen içerisine koyuldu. Üzerine 50 μ l aktivitesine bakılacak bileşik çözeltisinden ilave edildi. Daha sonra 10 ml oksijen ile doyurulmuş saf su erlene eklenerek kuvvetli bir şekilde karıştırıldı ve hemen 450 nm dalga boyunda alkolden oluşan köre karşı absorbansı ölçüldü. 50⁰C sıcaklıkta su banyosunda inkübasyona bırakılarak her 20 dakikada bir 2 saat süre ile absorbans ölçüldü. Bileşiklerin ve sentetik antioksidanların toplam antioksidan aktivitesi (%İnhibisyon) aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Koleva et al., 2002).

$$\text{Toplam Antioksidan Aktivite (\% İnhibisyon)} = [(R_{\text{kontrol}} - R_{\text{örnek}}) / R_{\text{kontrol}}] \times 100 \quad (3.3)$$

$$R = [\ln (a/b)]/t$$

t= zaman (dakika)

a= başlangıç absorbansı

b= t zaman inkübasyonundan sonraki absorbans.

3.4.8. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz, bir kırmızı alg türü olan Agar Agar'dan izole edilen doğrusal bir polisakkariddir. Agaroz sıcak suda çözünür ve soğutulduğu zaman polimerde karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile jel yapısı oluşur. Bu oluşum geri dönüşümlüdür. Ticari olarak üretilen agarozların saflık dereceleri farklı olabilmektedir. Bu durum DNA'nın göç hızını etkiler. Ayrıca, kimyasal yapısı değiştirilerek düşük sıcaklıkla eriyebilen agaroz tipleri de geliştirilmiştir; bu agarozların ayırım gücü çok fazladır. DNA jelden geri kazanılacaksa veya doğrudan (jel parçası ile birlikte) restriksiyon enzimlerinin etkisinde bırakılacaksa bu tip agaroz kullanımı uygun olur.

Agaroz konsantrasyonu % 0,5 – 1,5 arasında değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilir. Böylece, küçük DNA fragmentleri için yüksek, büyük DNA fragmentleri için düşük agaroz konsantrasyonu kullanılarak DNA'nın jelde en uygun şekilde yürümesi sağlanabilir. DNA'nın jelde görünür hale gelebilmesi etidyum bromürün DNA bağları arasına bağlanarak 300 veya 360 nm'de ışığı absorblaması sonucu fluoresan etki göstermesi ile olur. Bu etki DNA konsantrasyonuna bağlı olarak kuvvetli veya zayıf olabilir.

İzole edilen DNA'nın genomik ya da plazmid DNA'sı olmasına göre jeldeki görünüşleri farklılık gösterir. Genomik DNA keskin bir bant ile bu bantın aşağı ve yukarı kısmına doğru biraz yayılan bir görüntü verir. Plazmid DNA'sının jeldeki görüntüsünde ise genellikle DNA'nın 3 farklı biçimi gözlenir: plazmid DNA'sına ait süper sarmal biçim (form I), gevşek sarmal biçim (form II) ve doğrusal biçim (form III). Doğrusal biçim izolasyon sırasındaki kırılmalarından dolayı oluşur. Eğer saflaştırma işlemi doğru bir biçimde yapılmış ise jelde sadece süper sarmal ve gevşek sarmal formlar gözükcektir. Molekül ağırlıkları aynı olmasına karşın bu üç formun jeldeki göçleri farklıdır. Bu farklılık temelde agaroz konsantrasyonuna bağlı olmakla beraber uygulanan akıma, tamponun iyonik kuvvetine ve form I'in yoğunluğuna da bağlıdır. Bazı koşullarda form I, form III'den daha hızlı göç ederken diğer bazı koşullarda tersi olabilir. Optimize olmuş koşullarda genellikle form I, diğer formlara göre daha hızlı hareket eder. Etidyum bromür (EB) konsantrasyonu artırıldığı zaman DNA'ya göre daha fazla boya bağlandığı için form I maksimum düzeyde görünür hale geçer. Uygulamalarda genellikle 0,1 – 0,5 µg/ml EB konsantrasyonu kullanıldı.

Jele fazla miktarda DNA yüklenmesi sonucunda kenar ve hız etkisi ile jelde yanlış yorumlara yol açabilecek görüntüler ortaya çıkabilir. Örneğin, eğer fazla DNA yüklenirse keskin bir bant yerine yaygın bir görünüm meydana gelir. Bazen de jelin tamamında elektrik akımının aynı olmaması nedeniyle aynı DNA molekülleri jelin farklı bölgelerinde değişik hızda göç edebilir. Bu durum, düşük voltaj uygulamasıyla bir ölçüde ortadan kaldırılabilir.

Ayrıca, örneğin içinde bulunduğu solüsyonun tuz konsantrasyonu da DNA'nın jelde yürümesini etkilemektedir. İyonik kuvvetin artışı küçük fragmentlerin göç hızını yavaşlatır. Çünkü ekstra iyon varlığı DNA parçalarını siper gibi sararak elektriksel alanda hareketlerini engeller.

Sonuçta, DNA'nın boyutunun belirlenmesi çalışmalarında yanıltıcı sonuçlar ortaya çıkarabilir. Bu problemi önlemek için boyutu bilinen standart DNA molekülleri ile bilinmeyen örneklerin yaklaşık aynı tuz konsantrasyonunda olması sağlanmalıdır.

Gerekli malzemeler

Agaroz

Tris-borat (TBE) tamponu, pH 8,0 (5x/litre)

54g	Trizma-base
27.5g	Borik asit
20ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)

Yükleme tamponu: ("bromophenol blue", BB)

4 M	Üre
0.025 M	EDTA
%60	Sukroz
%0.025	Bromophenol blue
%0.025	Ksilen

TE tamponu, pH 8,0

10m/M	Tris-HCL pH 8,0
1mM	EDTA pH 8,0

Etidyum bromür (10 mg/ml)

Reaksiyon karışımı 37⁰C'da 60 dakika ya da bir gece bırakıldı. Jele yükleme yapılmadan önce karışımın 5µl'si 65⁰C'da 5-10 dakika tutulduktan sonra buzda 2-3 dakika bekletilerek kesim sonucu oluşan yapışkan uçların birbirine bağlanması önlendi. Daha sonra yükleme tamponundan 2 µl eklenerek jele yüklendi.

Yöntem

% 1'lik Agaroze jelin hazırlanması;

Kullanılacak jelin büyüklüğüne göre tartılan agaroz TBE veya TAE tampon içerisinde kaynatma yolu ile (mikrodalga, otoklavlama veya ateş üzerinde) çözündürüldü. Elle tutulabilecek sıcaklığa (55-50⁰C) düştüğünde 0,5 µg/ml etidyum bromür ilave edildi. Kenarları kapatılmış cam veya özel yüzeyler üzerine, sızıntı olmamasına dikkat edilerek, döküldü. Cepleri oluşturacak tarak yerleştirilerek donması bekledi. Tarak dikkatlice uzaklaştırıldı ve jel elektroforez tankına geçirildi. Jeldeki cebin büyüklüğüne göre izole edilen ve TE içinde bulunan DNA solüsyonundan alınarak üzerine BB eklendi (genellikle 1/6 hacminde) ve 10 saniye mikrosantrifüjde sıvının tüp dibine toplanması sağlandı. Tüm sıvı mikropipet yardımıyla jele yüklendi.

5 V/cm olacak şekilde akım geçirildi. Akım miktarı, birbirine yakın boyuttaki fragmentlerin ayrılmasına bağlı olarak değiştirilebilir. Sürenin sonunda jel bir transilüminatör üzerine alındı ve UV ışığı (304nm) altında fragmentlerin boyutları standartlarla karşılaştırılarak belirlendi. Spektral yöntemler kadar kesin olmamakla beraber jel elektroforezi ile DNA miktarı tayini de yapılabilir.

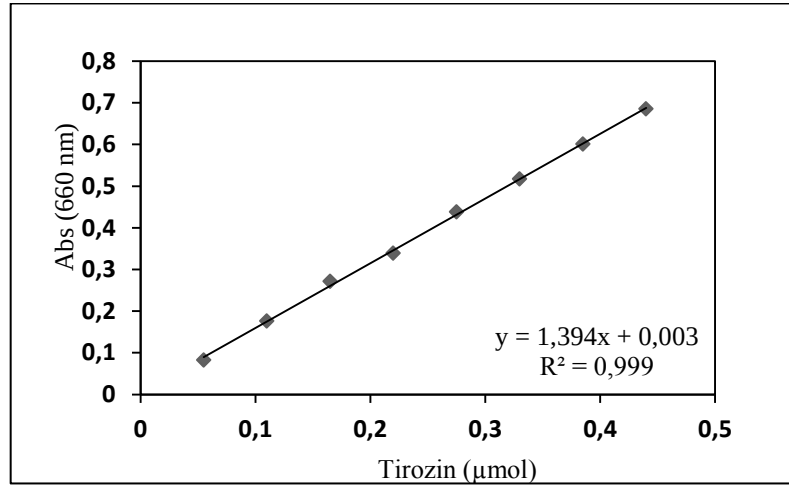
4.ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *Basillus subtilis* ATCC 6633 Suşundan Alkalen Proteazın Saflaştırılması

Çizelge 4.1. Amonyum sülfat çöktürmesi (% 80) ve jel filtrasyon kromatografi sonucu çökelek ve süpernatantda bulunan enzim aktivitesi ve protein içeriği

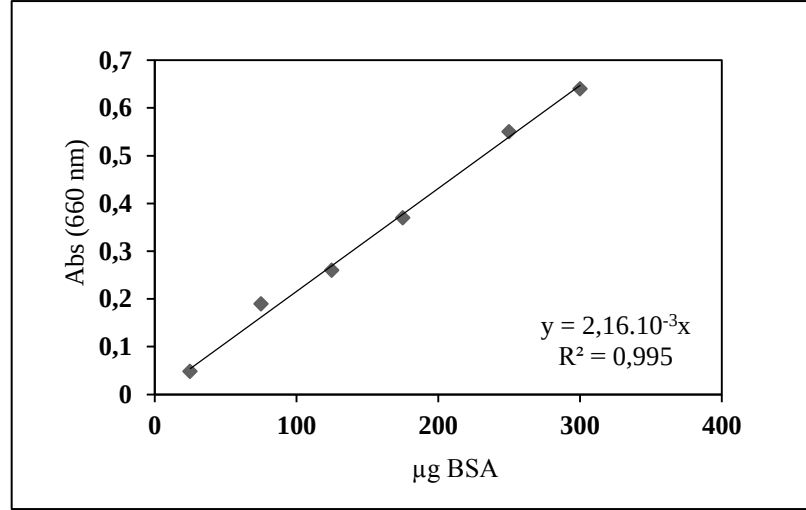
Enzim Fraksiyonu	Hacim (ml)	Aktivite (EU/ml)	Toplam Aktivite (EU)	Protein Miktarı (mg/ml)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Besiyer Supernatant	220	0,0435	9,57	0,7295	0,0596	100	1
Amonyum Sülfat Çöktürmesi (%0-80)	15	0,4003	6,0045	0,3552	1,1269	62,7	18,9
Jel Filtrasyon Kromatografisi	5	0,1897	0,9485	0,0457	4,1509	9,9	69,6

4.2. Alkalen proteaz aktivitesi ölçümü



Şekil 4.1. Tirozin standart grafiği

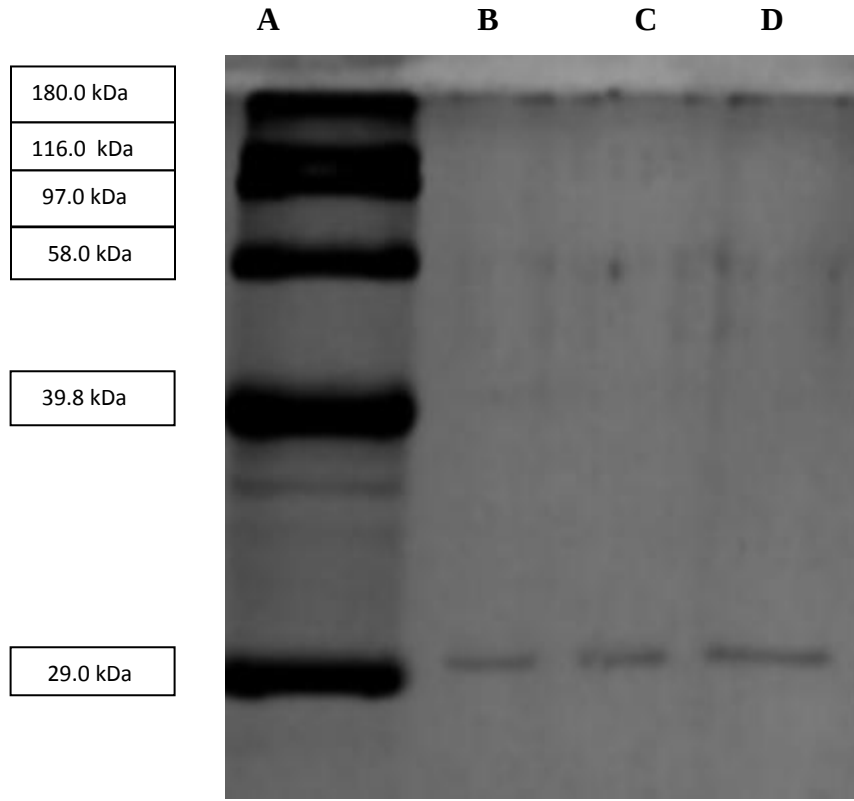
4.3. Lowry Yöntemi İle Protein Tayini



Şekil 4.2. Lowry metodu bovin serum albumin (BSA) standart grafiği

4.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS-PAGE)

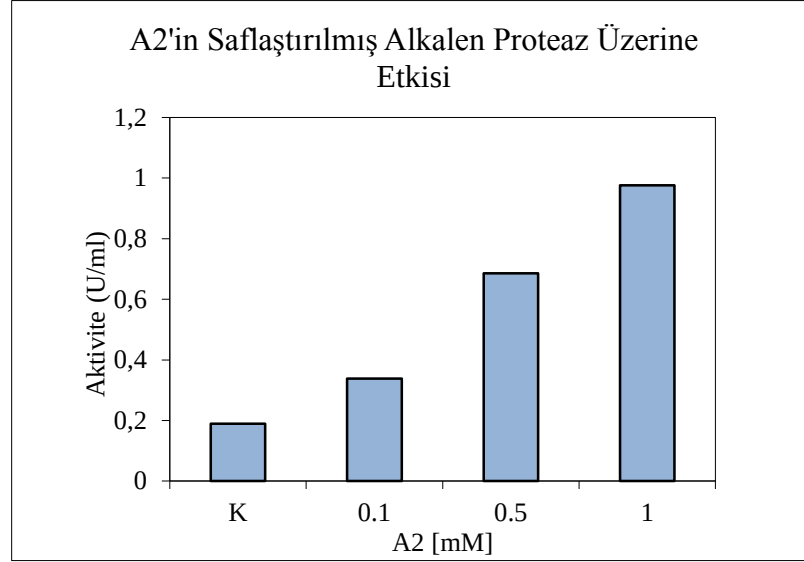
Bacillus subtilis ATCC 6633 suşundan saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile belirlendi (Şekil 4.3.) Saflaştırılan enzim 1:3, 1:4, 1:5 oranında örnek çözeltiyle dilüe edilerek hazırlandı. Marker protein olarak Sigma B-2787 kullanıldı. Kit içinde bulunan standart proteinler α 2-Makroglobulin (MA; 180,0 kDa), β -Galaktosidaz (MA; 116,0 kDa), Fosforilaz B (MA; 97,0 kDa), Katalaz (MA; 58,0 kDa), Alkol dehidrogenaz (MA; 39,8 kDa), Karbonik anhidraz (MA; 29,0 kDa), Tripsin inhibitörü (MA; 21,0 kDa), Lizozim (MA; 14,3 kDa) ve Aprotinin (MA; 6,5 kDa)' dir. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşundan saflaştırılan enzimin molekül ağırlığını belirlemek amacı ile yapılan %3-8 kesikli SDS-PAGE elektroforez çalışmalarında kolon sonrasında elde edilen enzim çözeltisinin %0,1 Coomassie brilliant blue R-250 boyama sonucu tek bant olduğu gözlenmiştir ve protein molekülünün 30,0 kDa ağırlığında olduğu tespit edilmiştir.



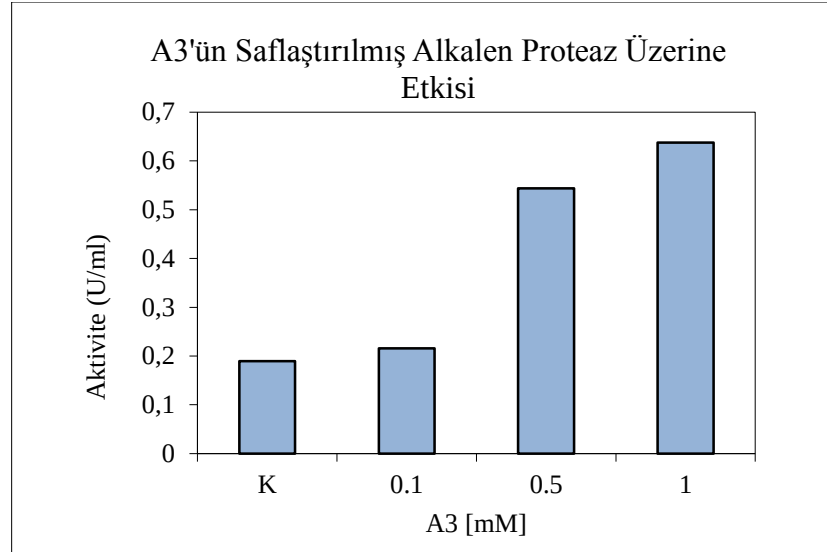
Şekil 4.3. *B. subtilis* ATCC 6633 suşundan alkalen proteaz enziminin %3-8 kesikli SDS-PAGE elektroforez analizi. A:Protein Marker, B: Kolon sonrasında elde edilen proteaz elüsyonu (1:3), C: Kolon sonrasında elde edilen proteaz elüsyonu (1:4), D: Kolon sonrasında elde edilen proteaz elüsyonu (1:5)

4.5. Proteaz Enzimi Üzerine İn Vitro Polinükleer Metal Kompleksleri Çalışmaları

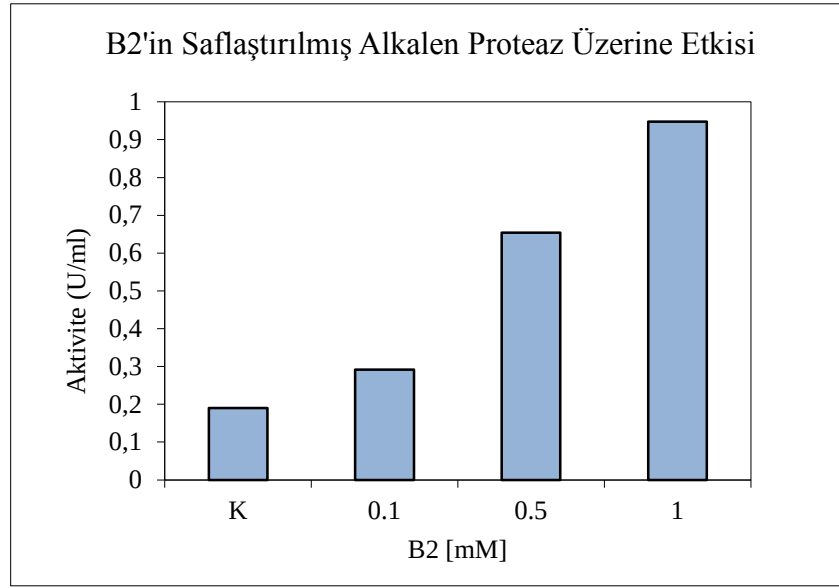
Komplekslerin, enzim aktivitesi üzerinde aktive edici bir etki gösterdiği tespit edilmiştir.



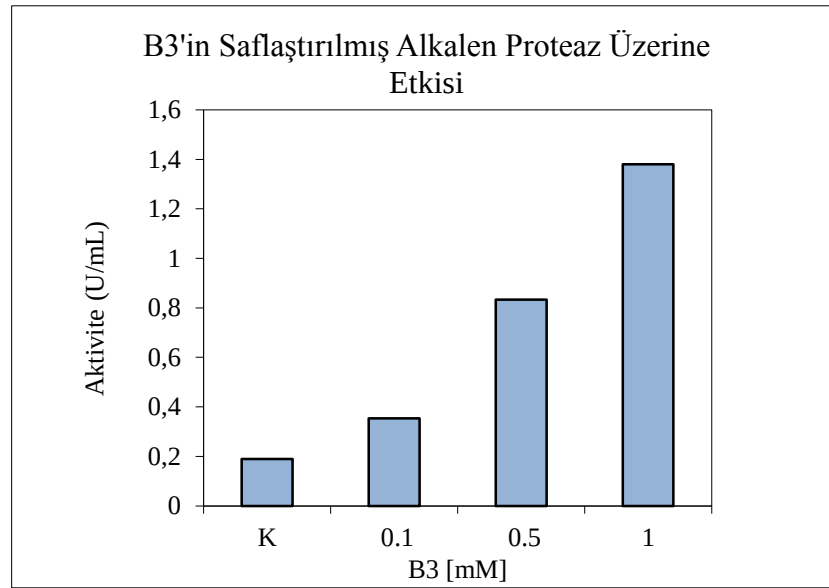
Şekil 4.4. A₂'nin saflaştırılmış alkalen proteaz üzerine etkisi



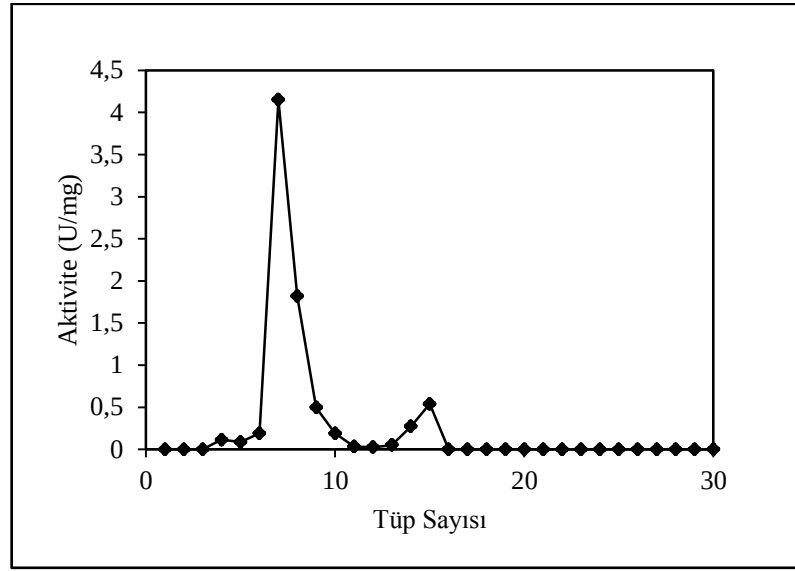
Şekil 4.5. A₃'ün saflaştırılmış alkalen proteaz üzerine etkisi



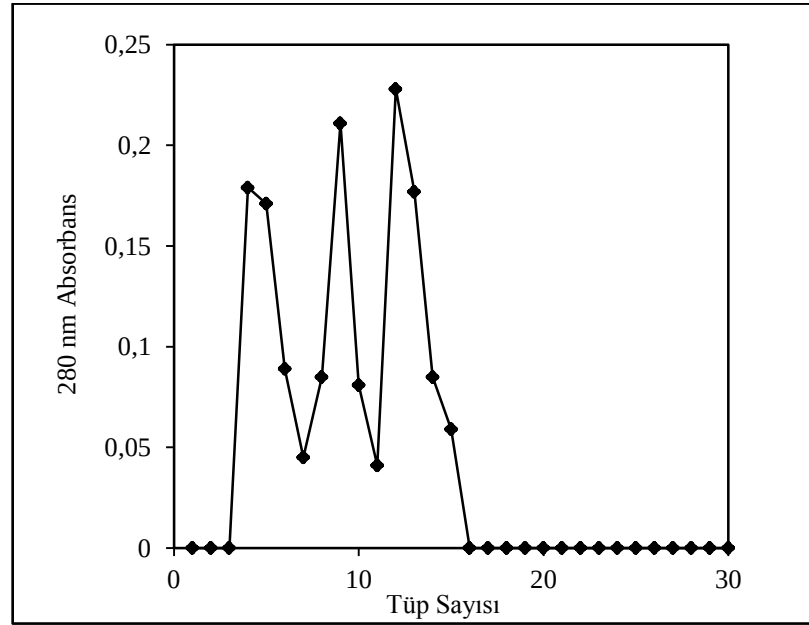
şekil 4.6. B₂'nin saflaştırılmış alkalen proteaz üzerine etkisi



şekil 4.7. B₃'ün saflaştırılmış alkalen proteaz üzerine etkisi



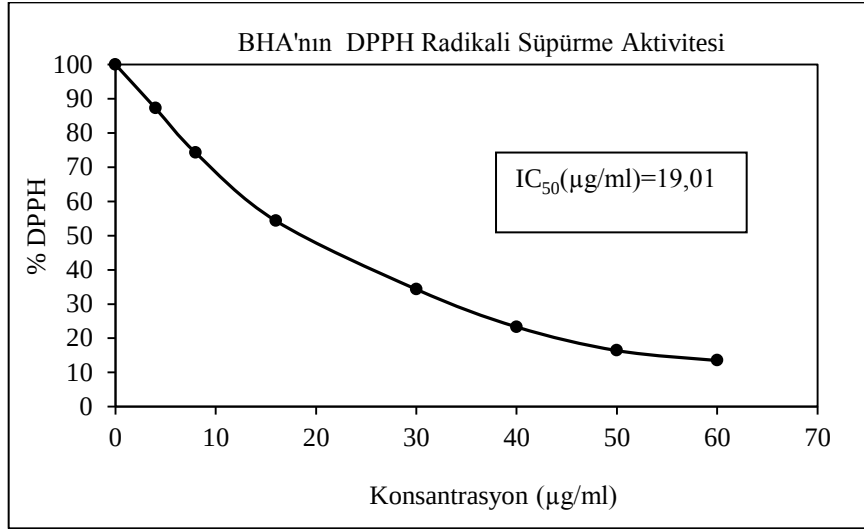
Şekil 4.8. Proteaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmasında kullanılan elüsyon grafiği



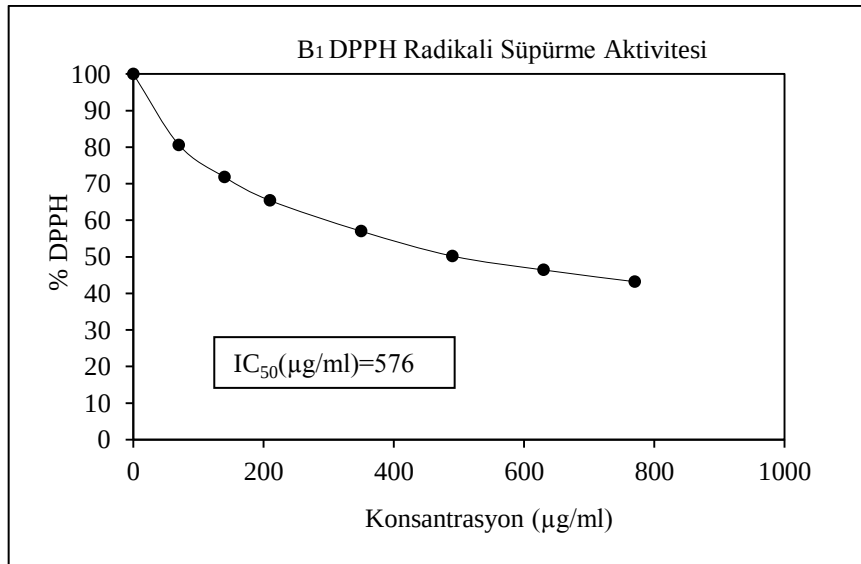
Şekil 4.9. Jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan proteaz enziminin elüsyondan elde edilen protein grafiği

4.6. Antioksidan Yöntemler

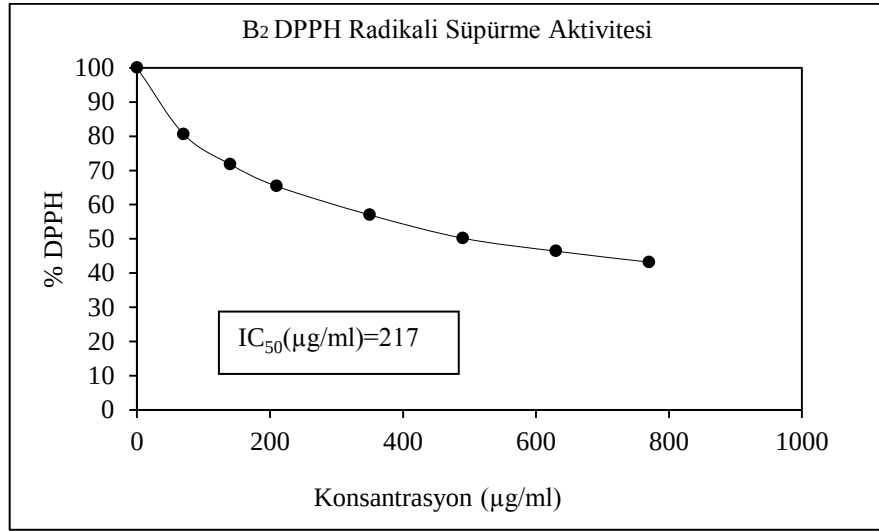
4.6.1. DPPH radikali süpürme aktivitesi



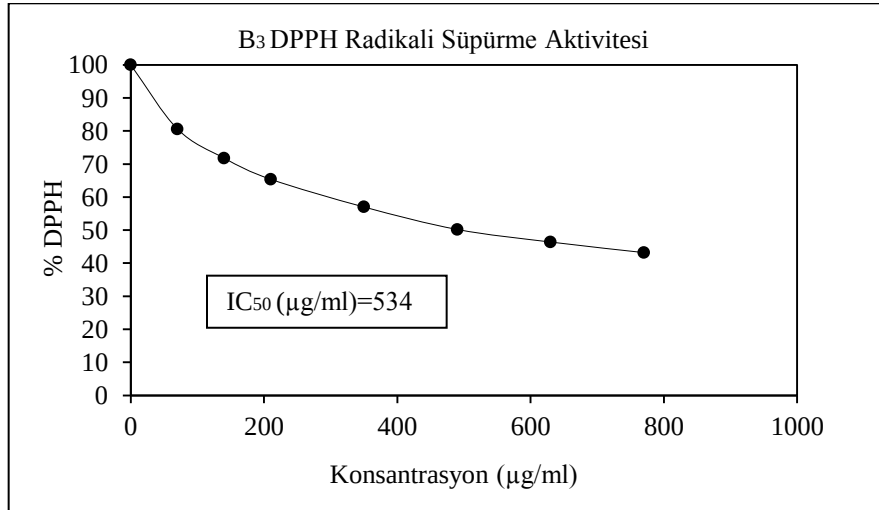
Şekil 4.10. BHA'nın DPPH radikali süpürme aktivitesi



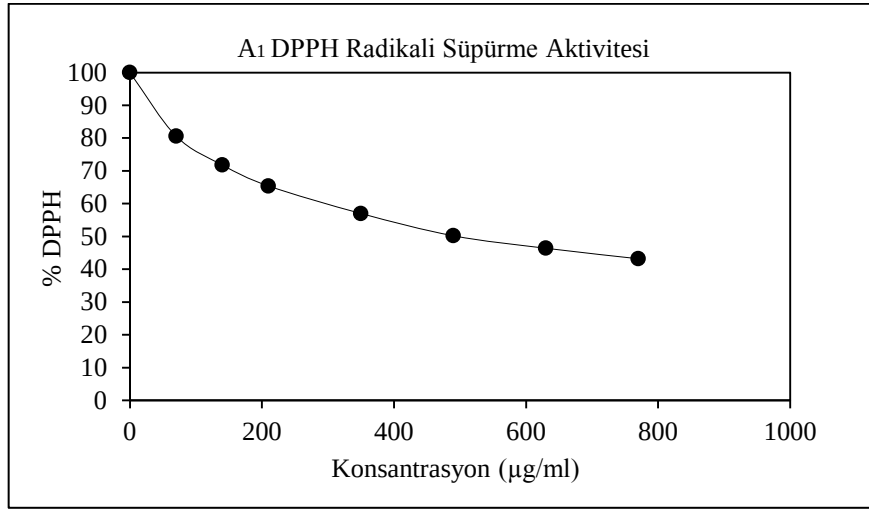
Şekil 4.11. B₁'in DPPH radikali süpürme aktivitesi



 ekil 4.12. B₂'nin DPPH radikali süpürme aktivitesi

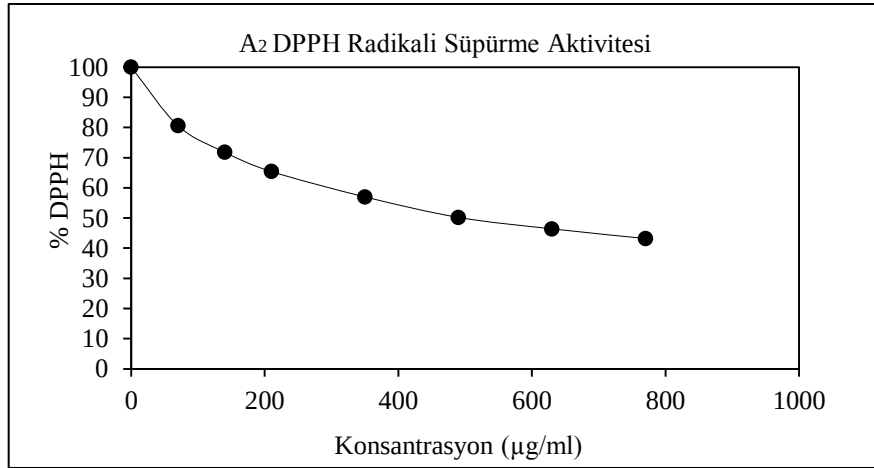


Şekil 4.13. B₃' n DPPH radikali süpürme aktivitesi



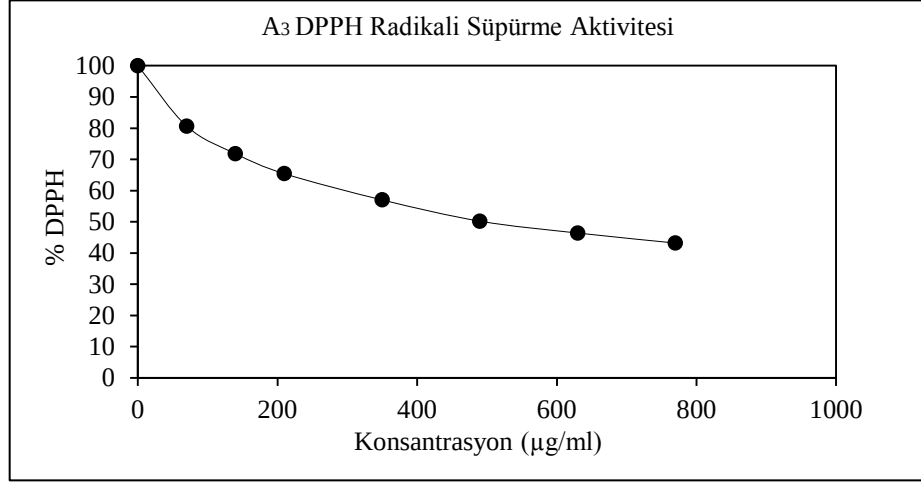
Şekil 4.14. A₁'in DPPH radikali süpürme aktivitesi

1600 µg/ml' den sonra konsantrasyonu artırmamıza rağmen DPPH'ın süpürülme miktarında herhangi bir artma gözlenmemiştir. Bu nedenle IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır.



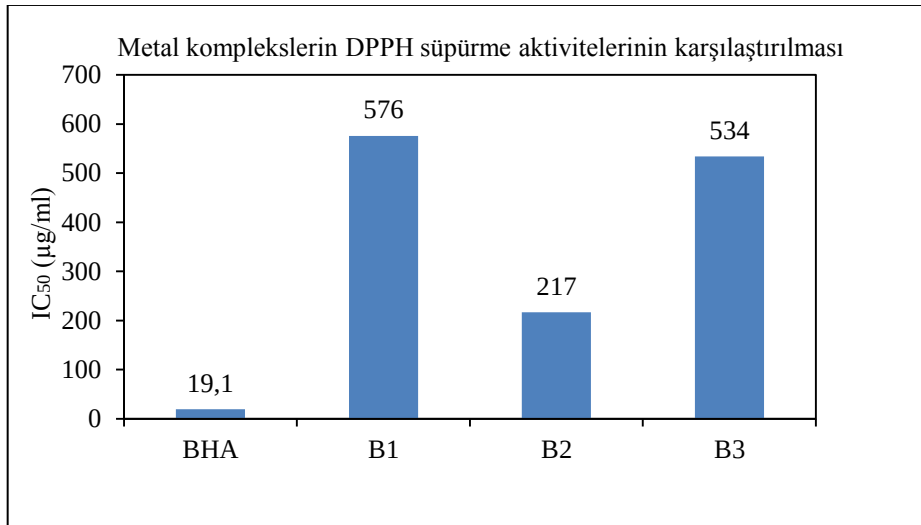
Şekil 4.15. A₂'nin DPPH radikali süpürme aktivitesi

A₂ numunesinin metanolde çözünen maksimum miktarı ortamdaki DPPH'ın %50'sini süpürmeye yetmemiştir. Bu nedenle IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır.



Şekil 4.16. A₃'ün DPPH radikali süpürme aktivitesi

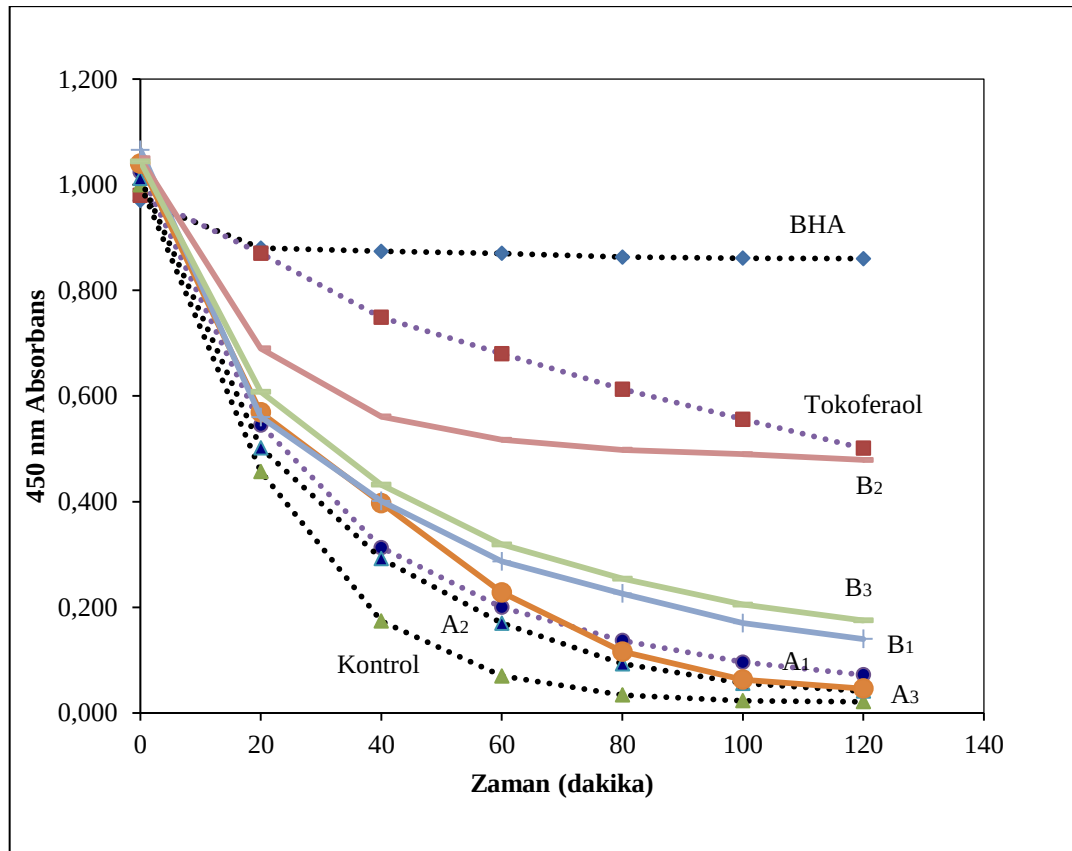
A₃ numunesinin metanolde çözünen maksimum miktarı ortamdaki DPPH'ın %50'sini süpürmeye yetmemiştir. Bu nedenle IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır.



Şekil 4.17. Metal komplekslerin DPPH süpürme aktivitelerinin karşılaştırılması

BHA'ya göre kıyaslandığında B₂'nin DPPH süpürme aktivitesi diğerlerinden daha fazladır. A₁, A₂ ve A₃ komplekslerinin metanoldeki maksimum çözünen miktarlarının gösterdiği DPPH süpürme aktivitesi diğer metal komplekslere ve BHA'ya göre çok daha düşük olduğu için IC₅₀ değerleri hesaplanamamıştır.

4.6.2. β -karoten-linoleik asit yöntemi

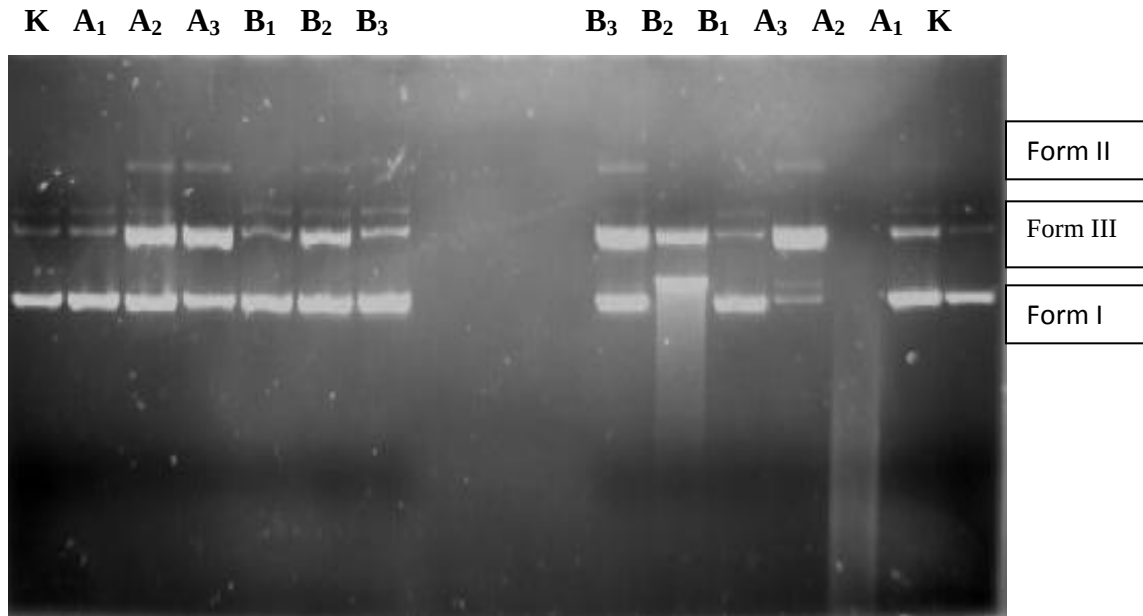


Şekil 4.18. β -Karoten-Linoleik asit yöntemi ile metal komplekslerin antioksidan özelliklerinin karşılaştırılması

BHA'ya göre kıyaslandığında B₂'nin antioksidan aktivitesi diğer metal kompleksleri ve ligandlardan daha fazladır. B₂' den sonra en iyi antioksidan aktivite gösteren metal kompleksi B₃ ligand B₁'dir.

4.7. Agaroz Jel Elektroforezi İle Metal Komplekslerin Ve Ligandların Plazmid DNA Üzerine Etkileri

Çalışmamızda; A₂, A₃, B₂ ve B₃ numaralı bileşikler DNA'nın doğrusal formunu arttırmaktadır. Ortama hidrojen peroksidin ilave edilmesi ile A₃ ve B₃ numaralı bileşiğin etkinliği artmış ve süper sarmal yapının oldukça açıldığı gözlenmiştir. A₂ bileşiğinin DNA'yı tamamen parçaladığı gözlenmiştir. B₂ numaralı bileşik hidrojen peroksit ilavesi ile süper sarmal yapıyı tamamen parçalamıştır. A₃ numaralı bileşik ise hidrojen peroksit ilavesi ile süper sarmal yapı konsantrasyonu azaltmıştır.



Şekil 4.19. Agaroz jel elektroforezi ile metal komplekslerin ve ligandların plazmid DNA üzerine etkileri (1.Basamak: H₂O₂·siz, 2.Basamak: H₂O₂·li; K: 05 µl DNA, A₁: A₁ ligandı+05 µl DNA, A₂: A₂ kompleksi+05 µl DNA, A₃: A₃ kompleksi+05 µl DNA, B₁: B₁ ligandı+05 µl DNA, B₂: B₂ kompleksi+05 µl DNA, B₃: B₃ kompleksi+05 µl DNA ; Form I: Süper sarmal biçim, Form II: Gevşek sarmal biçim, Form III: Doğrusal biçim)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırılması

Saflaştırma sonucunda elde edilen en iyi verim ve saflaştırma katsayısı sırası ile % 9,9 ve 69,6' dır. Patel vd. (2006)'in yaptıkları çalışmada DEAE-selüloz ve sefadeks-200 ile *Bacillus sp.*'den saflaştırdığı alkalen proteaz verimini ve katsayısını sırası ile % 6 ve 112 olarak belirtilmiştir. Bu sonuçlar çalışmamız ile karşılaştırıldığında verimimizin yüksek fakat saflaştırma katsayımızın düşük olduğu görülmektedir. *Bacillus subtilis* 'den jel filtrasyon kromatografisi ile proteaz enziminin saflaştırıldığı çalışmada saflaştırma katsayısı 9,67 ve en iyi verim %71,32 olarak bulunmuştur (Zambare, 2010). Çalışmamızda bulunan değerlerle karşılaştırıldığında çalışmamızın saflaştırma katsayısının yüksek, verimin düşük olduğu görülmektedir. Jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada *B. subtilis* PE-11'den alkalen proteazın saflaştırma katsayısı 21,0 ve en iyi verimin %7,5 olarak bildirilmiştir (Adinarayana et.al., 2003). Saflaştırma katsayısının ve verimin çalışmamızda daha yüksek olduğu görülmektedir. Diğer kromatografik yöntemlerle yapılan çalışmalarla bizim çalışmamızı karşılaştıracak olursak; *B. pumilus* (Lee et al., 1996), *Bacillus sp.* PS719 (Madigan and Mars, 1997) ve *B. pseudofirmus* (Manczinger vd., 2003) soylarından saflaştırılan alkalen proteazlarda iyon değiştirme kromatografisi kolon çıkışı itibariyle sırasıyla %58, %65 ve %24 verime ve 3,9; 4,9 ve 21,4 kat saflaştırma derecesine ulaşılmıştır. Bizim saflaştırma verimimiz *B. pumilus*, *Bacillus sp.* PS719 ve *B. pseudofirmus* alkalen proteazlarından daha düşük olmakla birlikte saflaştırma katsayımız *B. pumilus*, *Bacillus sp.* PS719 ve *B. Pseudofirmus*' dan daha yüksektir. Beg ve Gupta (2003)'nın *Bacillus mojavensis* 'den Q-sefaroze kolon ile saflaştırdığı serin proteazın verimi ve katsayısı sırası ile %37,2 ve 17,1'dir. Bu sonuçlar *B. subtilis* ATCC 6633 suşundan ürettiğimiz alkalen proteaz enzimi ile karşılaştırıldığında verimin daha düşük olduğu fakat saflaştırma katsayısının yüksek olduğu görülmektedir. Diğer bir çalışmada Singh vd. (2001a) DEAE-sefadeks ve sefaroze ile *Bacillus sp.* SSRI'den saflaştırdığı serin alkalen proteazın saflaştırma verimini ve katsayısını sırası ile %36,9 ve 19,3 olarak bulmuşlardır. *B. Subtilis* ATCC

6633 suşundan elde ettiğimiz proteaz bu sonuçla karşılaştırıldığında, verimimizin düşük fakat katsayımızın yüksek olduğu görülmektedir. Öztürk (2007)'ün yapmış olduğu bir çalışmada *Bacillus licheniformis* BA17 alkalen proteazı saflaştırma sonucunda elde edilen en iyi verim ve saflaştırma katsayısı sırası ile %58 ve 5,4'dür. Çalışmamızla karşılaştırıldığında verimin yüksek fakat katsayısının oldukça düşük olduğu görülmektedir. *B. subtilis* ATCC 6633 suşundan elde edilen alkalen proteaz enzimi Bal (2005) 'ın *B. clausii* GMBAE22'den DEAE-Selüloz kolon kromatografisi kullanarak elde ettiği sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Bal yaptığı çalışmalar sonucu verim ve saflaştırma katsayısını sırası ile %15 ve 2,66 olarak tespit etmiştir ve bu tezde elde edilen sonuçlar Bal'ın ulaştığı sonuçlara göre verimi düşük fakat katsayısı daha yüksektir. Diğer bir çalışmada ise *Bacillus sp.*'den hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmış olan alkalen proteazın verimi ve saflaştırma katsayısı sırası ile %82 ve 10'dur (Gupta vd. 2005). *B. subtilis* ATCC 6633 suşundan elde edilen alkalen proteaz bu çalışma ile karşılaştırıldığında verimin düşük katsayının yüksek olduğu görülmektedir.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar ile literatür bilgileri karşılaştırıldığında elde edilen saflaştırma kat sayısının oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

5.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) İle Alkalen Proteaz Enzimin Moleküler Ağırlığının Tayini

Enzimin moleköl ağırlığını belirlemek amacı ile *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşundan saflaştırılan enzimin SDS-PAGE elektrofrez sonrası %0,1 Coomassie brilliant blue R-250 boyama ile tek bant gözlenmiş ve protein molekölünün 30,0 kDa ağırlığında olduğu tespit edilmiştir. Sevinç ve Demirkan (2011), yaptıkları çalışmada *Bacillus sp.* no. N-40'dan elde ettikleri alkalen proteaz enziminin moleköl ağırlığını 52 kDa olarak bulmuşlardır. Zambare (2010), *Bacillus sp.*' den elde ettiği proteaz enziminin moleküler ağırlığını 35 kDa olarak bulmuştur. Yang et al. (2000) yaptıkları bir çalışmada *B.subtilis*'den saflaştırılan proteaz enziminin moleküler ağırlığı 44 kDa olarak ifade

edilmiştir. Joo ve Chang (2005) 'ın halotolerant *Bacillus clausii* I-52'den elde ettikleri alkalen proteaz enziminin molekül ağırlığını 28 kDa olarak belirlemişlerdir. *Bacillus sp.* no. AH-101'den elde edilen alkalen proteaz enziminin molekül ağırlığı 29 kDa olarak bulunmuştur (Takami vd. 1989). Beg ve Gupta (2003), *Bacillus mojavensis*'den saflaştırdıkları serin alkalen proteaz enziminin molekül ağırlığını 30 kDa olarak yayınlamışlardır. Gupta vd. (2005), *Bacillus sp.*'den saflaştırdıkları alkalen proteazının molekül ağırlığını 29 kDa olarak belirlemişlerdir. *Bacillus licheniformis* MIR29'dan elde edilen iki alkalen proteazın molekül ağırlığı Ferrero vd. (1996), tarafından 25 kDa ve 40 kDa olarak bulunmuştur. Kazan vd. (2005), *Bacillus clausii* GMBAE42'den saflaştırdıkları serin alkalen proteazının molekül ağırlığını 26.55 kDa olarak yayınlamışlardır. Bal (2005), *Bacillus clausii* GMBAE22'den saflaştırdığı alkalen proteazın molekül ağırlığını 25,4 kDa olarak bulmuştur. *Bacillus sp.* SSRI'den elde edilen alkalen proteaz için molekül ağırlığını 29 kDa olduğu (Singh et al., 2001b) ve *Bacillus pumilus*'den elde edilen enzim için 32 kDa olduğu (Huang et al., 2003) belirtilmiştir.

Çalışmamızda *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşundan elde edilen alkalen proteazın molekül ağırlığı literatür bilgileri ile karşılaştırıldığında uyumlu olduğu görülmektedir.

5.3. Proteaz Enzimi Üzerine İn Vitro Polinükleer Metal Kompleksleri Çalışmaları

Dede vd. (2011)'nin yaptıkları bir çalışmada, bakır içeren komplekslerin katalaz ve katekolaz enzimleri üzerinde aktive edici bir özelliğe sahip oldukları belirtilmiştir. Diğer bir çalışmada da bu tür komplekslerin katalaz ve katekolaz enzimleri üzerinde aktive edici bir özelliğe sahip olduğu gösterilmektedir (Karipcin vd., 2010). Çeşitli metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada $MgCl_2 \cdot 7H_2O$ 'ın aktivite ettiği görülmektedir (Uyar vd., 2011). Nilegaonkar et al. (2007), yaptıkları bir çalışmada Cu^{2+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarının proteaz aktivitesinde artışa neden olduğu belirtilmiştir. Yine benzer birçok çalışmada bu iyonların proteaz aktivitesini artırdığı

ortaya konulmuştur (Johnvesly and Naik, 2001; Gupta et al., 2005; Beg and Gupta, 2003; Singh et al., 2001a; Rahman et al., 2006; Mei and Jiang, 2005).

Çalışmamızda da kullanılan Schiff bazı kompleksleri bakır içermektedir. Bu tür kompleksler paramanyetik kompleksler olup azitli yapıları bulunmamaktadır. Dinükleer yapıya sahip oldukları için de enzimler üzerinde aktive edici bir özelliğe sahiptir. Çalışmamızda, komplekslerin proteaz enzim aktivitesi üzerinde aktive edici bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Aktive etmesi komplekslerin kullanım alanlarına göre olumlu bir sonuçtur. Literatürde bu tür komplekslerin proteaz enzimi üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

5.4. Antioksidan Yöntemler

BHA'ya göre kıyaslandığında homo ve heterodinükleer bakır içeren komplekslerden B₂'nin antioksidan aktivitesi diğer metal kompleksler ve ligandlardan daha fazladır. B₂'den sonra en iyi antioksidan aktivite gösteren metal kompleksi B₃, ligand B₁'dir. Yapılan bir çalışmada Schiff bazı ve onun Cu(II), Zn(II), Cd(II) komplekslerinin antioksidan etkileri araştırılmış ve sonuçta ligand ve komplekslerin α -tokoferol (vitamin E) ile karşılaştırıldığında güçlü bir antioksidan olduğu bulunmuştur (Tarafder et al., 2002). Diğer bir çalışmada Salisilaldehit ve β -alanin türevi Schiff bazı ve onun Cu(II) ve Zn(II) kompleksleri sentezlenmiş ve antioksidan etkileri incelenmiştir. Sonuçta Cu (II) kompleks'inin antioksidan aktiviteye yarar sağladığı Zn (II) kompleksinin ise in vitro da trozin nitrasyonuna karşı önemsiz derecede koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir (Marek et al., 2008). Diğer bir çalışmada Schiff bazı ve metal komplekslerinin DPPH indirgeme metoduyla serbest radikal temizleme özelliği incelenmiş ve bu deneyler sonucunda bileşikler radikal temizleme özelliği göstermediğinden antioksidan aktiviteye sahip olmadıkları belirtilmiştir (Selçuk, 2010). Zhang ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada Schiff bazı ve metal komplekslerinin DPPH indirgeme metoduyla serbest radikal temizleme özelliği incelenmiş ve bileşiklerin radikal temizleme özelliği gösterdiği bulunmuş ve BHA'ya göre kıyaslandığında güçlü bir antioksidan özellik

gösterdiği belirtilmiştir (Zhang et al., 2011). Buna benzer bir çalışmada da Schiff bazı ve metal komplekslerinin DPPH indirgeme metoduyla serbest radikal temizleme özelliği incelenmiş ve bileşiklerin radikal temizleme özelliği gösterdiği ifade edilmiştir (Ceyhan vd., 2011). Çakmak yaptığı çalışmada Cu komplekslerinin ortamda oksidatif stres oluşturarak serbest radikal oluşumunu artırdığı ileri sürmüştür. Cu-kompleksinde Cu(II)'nin indirgenme yükseltgenme potansiyelinin kompleksin indirgenme yükseltgenme potansiyelini etkileyerek serbest radikal üretimini tetiklediğini belirtmiştir (Çakmak, 2007).

Çalışmamızda bazı komplekslerin antioksidan kapasiteleri diğerlerine göre yüksek bulunmuştur. Kullandığımız kompleksler gıda sektöründe antioksidan koruyucu olarak, tıpta ve eczacılıkta savunma sistemi ilaçları olarak kullanılabilir.

5.5. Agaroz Jel Elektroferezi İle Metal Komplekslerin Ve Ligandların Plazmid DNA Üzerine Etkileri

Çalışmamızda homo ve heterodinükleer bakır içeren komplekslerin DNA'nın doğrusal formunu arttırdığı ve ortama hidrojen peroksidin ilave edilmesi ile bu komplekslerin etkinliklerinin arttığı ve süper sarmal yapının oldukça açıldığı gözlenmiştir. Bunlardan bazılarının DNA'yı parçaladığı bazılarının ise hidrojen peroksit ilavesi ile süper sarmal yapıyı parçaladığı gözlenmiştir. Dede vd. (2009a)' in yaptıkları bir çalışmada homo ve heterodinükleer bakır komplekslerin süpersarmal DNA'yı çentikli ve çizgisel formlara ayırdığını ve H₂O₂'nin dolaylı oksidasyonuna bağlı olarak Phenanthroline içeren dinükleer komplekslerin güçlü ayırıcı aktivite gösterdiğini ifade etmişlerdir. Reddy ve Manjula (2007)'nin çalışmasında da bakır içeren komplekslerin plazmid DNA'nın hidrolitik ayrılması için katalizör etkili olduğu ve süpersarmal DNA'yı çentikli ve çizgisel formlara dönüştürdüğü belirtilmiştir. Yine benzer bir çalışmada bakır içerikli komplekslerin DNA'nın bozulmasında etkili olduğu ve bunun için ek olarak bir ayırıcı gerek olmadığı ifade edilmiştir (Tian et al., 2010). Dede vd. (2009b)'nin diğer bir çalışmasında da agaroz jel elektroferezi ile kompleksler ve DNA arasındaki etkileşim

araştırmışlar ve homo ve heterodinükleer bakır komplekslerin H_2O_2 varlığında süpersarmal DNA'yı çentikli ve çizgisel formlara ayırdığını bulmuşlardır. Babu et al. (2007), çalışmalarında bakır içeren tüm metal komplekslerin oksidatif ve hidrolitik yollarla süpersarmal DNA'yı ayırdığını göstermişlerdir. Rossi et al. (2002) dinükleer bakır komplekslerin etkileriyle genomik ve çift iplikli DNA'nın ayrıldığını desteklemişlerdir. Mononükleer bakır kompleksler üzerinde yapılan bir çalışmada da komplekslerin plazmid DNA'yı ayırıcı etki gösterdiği bulmuşlardır (Uma et al., 2007). Kumar vd. (2011), bakır ve kobalt içeren mononükleer komplekslerin H_2O_2 varlığında ve yokluğunda DNA yarıcı aktivite gösterdiğini ifade etmişlerdir. Kim ve Kim (2003), dinükleer bakır komplekslerin plazmid DNA'nın gevşek sarmal ve doğrusal sarmal yapıları açtığını bulmuşlardır. Massoud et al. (2011), dinükleer bakır komplekslerin plazmid DNA'da önemli açılmalar meydana getirdiğini H_2O_2 varlığında ve yokluğunda da aynı özelliği gösterdiğini bulmuşlardır. Sissi et al. (2005) bakır komplekslerin plazmid DNA'nın ayrılmasında çok etkili bir katalizör olduğunu belirtmişlerdir. Tjioet et al. (2011) ligandların ve bakır komplekslerin süpersarmal DNA'yı gevşek sarmal ve doğrusal formlara ayırdığını bulmuşlardır.

Literatürde bulunan sonuçlar ile çalışmamızda bulunan sonuçlar uyum göstermektedir. Çalışmamızda bulunan sonuçlara göre homo ve heterodinükleer bakır içeren komplekslerin sarmalın açılması yönünde etki ettiği görülmektedir. Bu etki kullandığımız komplekslerin hem antibakteriyel olarak hem de moleküler çalışmalarda nükleaz olarak kullanılabileceğini gösterir.

6. KAYNAKLAR

- Adinarayana, K., Ellaiah, P., Prasad, D.S., 2003. Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE-11. AAPS PharmSciTech, 4, 4.
- Aehle, W., 2004. Enzymes in Industry Production and Applications. Wiley- VCH, Weinheim, 28, 335- 340.
- Afşar, A., 2008. A Research on Increasing The Effectiveness Of Degreasing Process By Using Enzymes. Research in Microbiology. 45-53.
- Akkuş, I., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, 5. Sağlık Dizisi.
- Albayrak, S., Sağdıç O., Aksoy A., 2010. Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 26(4):401-40.
- Allan, J.R., Gardner, A.R., Mecloy, B., Smith W.E., 1992. Structural and Thermal Studies of the Chlorocomplexes of Cobalt, Nickel and Copper with 2,6- Diaminopyridine and an Assessment of Their Suitability as Antistatic Additives for Polyethylene. Thermochimica. Acta, 208, 125-131.
- Anwar, A., Saleemuddin, M., 1998. Alkalene Proteases: A Review. Bioresource Technology, 64, 175-183.
- Aoki, K., Miyamoto, S., Murakami, R., Shinke, R., 1995. Anaerobic Synthesis of Extracellular Proteases by The Soil Bacterium *Bacillus* sp. AM-23: Purification and Characterization of The Enzymes. Soil Biology and Biochemistry, vol. 27, no. 11, P: 1377-1382.
- Atakol, O. 1986. O,O`-Dihidroksi Schiff Bazlarının Komplekslerinin Elde Edilmesi ve Analitik İncelenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Babe, L.M., Craik C.S., 1997. Viral Proteases: Evolution Of Diverse Structural Motifs To Optimize Function, Cell, 91, 427-430.
- Babu, M.S.S., Reddy, K.H., Krishna, P.G., 2007. Synthesis, Characterization, DNA İnteraction And Cleavage Activity Of New Mixed Ligand Copper(II) Complexes With Heterocyclic Bases. Polyhedron. 26 (3), 572-580.
- Bal H., 2005. Yerel Ekosistemlerden izole Edilen ve Endüstriyel Önemi Olan Proteinleri Üreten Bakterilerin İzolasyonu, Tanımlanması ve İlgili Proteinlerin Taranması. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 1-7.

- Banerjee, R., Agnihotri, R., Bhattacharyya, B.C. 1993. Purification Of Alkaline Protease Of *Rhizopus Oryzae* By Foam Fractionation. 9, 245-248.
- Banerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W., 1999. Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus brevis* and its Characterization as a Laundry Detergent Additive. *Process Biochemistry*, 35:213-219.
- Bast, A., Haenen, G. R. M. M., Doelman, C. J. A., 1991. Oxidant And Antioksidant Stace Of The Art. *The American Journal of Medicine*, 91(3C), 2-12.
- Beg, K.Q., 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.
- Beyer, H. 1980. *Lehrbuch der Organischen Chemie*, S. Hirzel Verlag, 18. Auflage, 16-17,174-177, Stuttgart.
- Borah, S., Melvin, M.S., Lindquist, N., Manderville, R.A., 1998. Copper-Mediated Nuclease Activity of a Tambjamine Alkaloid. *Journal of the American Chemical society*. 120(19), 4557-4562.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use Of A Free Radical Method To Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology*. Volume 28:1, 25-30.
- Canpolat, E., 2003. Amin ve Oksim İçeren Ligandların Sentezi, Karakterizasyonu ve Bu Ligandların Bazı Metal Komplekslerinin İncelenmesi. F.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 128 sayfa, Elazığ.
- Casali, N., and Preston, A., 2003. *E. Coli* Plasmid Vectors. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press. 235: 49-53.
- Ceyhan, G., Çelik, C., Uruş, S., Demirtaş, İ., Elmastaş, M., Tümer, M., 2011. Antioxidant, Electrochemical, Thermal, Antimicrobial And Alkane Oxidation Properties Of Tridentate Schiff Base Ligands And Their Metal Complexes. *Spectrochimica Acta Part A* 81, 184– 198.
- Coleman, G., and Elliott, W.H., 1962. Studies On A-Amylase Formation By *Bacillus subtilis*. *Biochemical Journal*. 83,256-263.
- Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., Mccord, J.M., Harman, D., 1987. Oxygen Radicals and Human Disease. *Annals of Internal Medicine*, 107, 526-545.

- Çakmak, H., 2007. 1,2-bis(p-aminofenoksi) Etan Türevi Schiff Bazları ve Metal Komplekslerinin Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Elazığ.
- Çelebier, M., 2004. Schiff Bazlarının Organokalay(IV) Komplekslerinin Sentezi ve Spektroskopik Olarak İncelenmeleri. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 90s., Ankara.
- Çelik, N., 2006. *Bacillus clausii* GMBAE 42'den Saflaştırılan Alkalın Proteazın Termal İnaktivasyon Kinetiğinin Belirlenmesi ve Cu^{2+} İyonları İle Termostabilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli. 11-56.
- Çevrim, E., 2000. Sigara İçenlerde Antioksidan Enzimler, Ferritin Ve Hemoglobin Düzeylerinin Değerlendirilmesi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı, s: 105, Kütahya.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T.A., Linssen, P.H. 1998. Antioxidant Of Extracts Obtained By Different İsolation Procedures From Some Aromatic Herbs Grown İn Lithuania. Journal of the Science of Food and Agriculture 77: 10-146.
- Dede, B., Özmen, İ., Karipçin, F., 2009a. Synthesis, Characterization, Catalase Functions And DNA Cleavage Studies Of New Homo And Heteronuclear Schiff Base Copper(II) Complexes. Polyhedron, 28 (18), 3967-3974.
- Dede, B., Özmen, İ., Karipcin, F., Cengiz, M., 2009b. Homo- And Heteropolynuclear Copper(II) Complexes Containing A New Diimine–Dioxime Ligand And 1,10-Phenanthroline: Synthesis, Characterization, Solvent-Extraction Studies, Catalase-Like Functions And DNA Cleavage Abilities. Appl. Organometal Chemical, 23(12), 512-519.
- Dede, B., Aydın, A., Gündoğdu, S., Oskay, R., Karipcin, F., 2011. İki Yeni Simetrik İmin-Oksim Bileşiği Ve Bunların Polinükleer Komplekslerinin Sentezi, Karakterizasyonu, Katekolaz Ve Katalaz-Benzeri Aktivitelerinin İncelenmesi. III. Ulusal Anorganik Kimya Kongresi, Çanakkale.
- Demain, A.L., Solomon, N.A., 1981. In Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering, Scientific American, Freeman&Comp., San Francisco, 3-14.
- Dinçbaş, S., 2009. Alginat Kapsüllerinde Tutuklanan *Bacillus Amyloliquefaciens* A-Amylase Enziminin Farklı Nişasta Kaynaklarını Hidrolizleme Yeteneğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, BURSA, S: 6-8.
- Dülger, S., Sağlam, N., Beldüz A.O., Güner, S., Karaböcek, S., 2000. DNA Cleavage by Homo- and Heterotetranuclear Cu(II) and Mn(II) Complexes with Tetrathioether-Tetrathiol Moiety. Biometals, 13(3), 261-265.

- Eren Kıran, Özlem., 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(1).
- Eryiğit, F. 2006. *Mentha pulegium* L. ve *Salvia tomentosa* Miller Bitkilerinin Metanol Özütlерinin İn Vitro Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Fadıloğlu, S., O., Erkmén N, 2004. Gıda Sanayinde Enzimlerin Önemi. Gaziantep Üniversitesi, Bilimsel yayınlar kataloğu. s: 1-16.
- Fankhauser, D.B., 2007. Fankhauser's Cheese Page. Enzyme biotechnology, P:1-25.
- Ferrari, B.M., Capacchi S., Pelosi G., 1999. Synthesis, Structural Characterization and Biological Activity of Helicin Thiosemicarbazone Monohydrate and a Copper (II) Complex of Salicylaldehyde Thiosemicarbazone. Inorganica Chemical Acta, 286: 134-141.
- Ferreira., G.N.M., Chromatographic Approaches in the Purification of Plasmid DNA for Therapy and Vaccination. Chemical Engineering&Technology. Volume 28, 11;1285-1294.
- Ferrero M.A., Castro G.R., Abate C.M., Baigori M.D., Sineriz F., 1996. Thermostable Alkaline Protease Of *Bacillus* Licheniformis MIR 29: Isolation, Production And Characterization. Applied Microbiology and Biotechnology, 45, 327–332
- Food and Drug Administration, 1996. Points to Consider on Plasmid DNA Vaccines For Preventive Infectious Disease Indications. Docket No. 96N-0400, Rockville, USA, 39 p.
- Funnell, E. Barbara, Philips, J.G., 2004. Plasmid Biology. ASM Press, Washington
- Garcia-Raso, A., Fiol, J.J., Adrover, B., Moreno, V., Mata, I., Espinosa, E., Molins, E., 2003. Synthesis, Structure and Nuclease Properties of Several Ternary Copper(II) Peptide Complexes with 1,10-Phenanthroline. Journal of Inorganic. Biochemistry., 95(2-3) 77-86.
- Gaur, S., Fahmi, N., Agarwal, M., Singh R.V. 2007. Intramolecular Phenylborane Complexes with Monobasic Bidentate Schiff Bases. Applied Organometallic Chemistry., 21; 89-97.
- Gençkal, H.; Tari, C., 2006. Alkaline Protease Production from Alkalophilic *Bacillus* sp. Isolated from Natural Habitats. Enzyme and Microbial Technology, 39, 703-710.
- Gessesse, A., 1998. Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases From an Alkaliphilic *Bacillus* sp. Applied and Enviromental Microbiology, 3533-3535.

- Gessesse, A. , 1999. Purification And Characterization Of Two Raw-Starch-Digesting Thermostable A-Amylase From A Thermophilic *Bacillus*. Enzyme microbial technology. 25: 433-438.
- Gheorghiu Alpan, L. 2008. Bazı Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin Alkali Proteazlarının Özelliklerinin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Godfrey, T., & West, S., 1996. Industrial Enzymology. 2nd edn. p. 3. Macmillan Publishers, Inc., NY. ISBN 0-33359464-9.
- Gonzalez-Alvarez, M., Alzuet, G., Borrás, J., Macías, B., del Olmo, M., Liu- Gonzalez, M., Sanz F., 2002. Nuclease Activity of [Cu(sulfathiazolato)2(benzimidazole)2] 2MeOH. Synthesis, Properties and Crystal Structure. Journal of Inorganic Biochemistry, 89 (1-2), 29-35.
- Goodyear-Brunch, C., Pierce, J. D., 2002. Oxidative Stress In Critically Ill Patient. American Journal of Critical Care, 11(6):543-51.
- Gökmeşe, F. 2004. Bazı Naftaldimin Ve Salisilaldiminlerin Çeşitli Voltametrik Tekniklerle Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 97 s, Ankara.
- Gökpinar S., Koray T., Akçiçek, E., Göksan T., Durmaz Y. 2006. Algal Antioksidanlar. E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 23: 85-89.
- Gripon, J.C., 2003. Encyclopedia of Dairy Sciences. Academic Press, P: 410- 406.
- Gupta, R., Beg, Q. K., Khan, S., Chauhan, B., 2002. An Overview On Fermentation, Downstream Processing And Properties Of Microbial Alkaline Proteases. Applied Microbial Biotechnology 60: 381 –395.
- Gupta, R., Roy, I., Patel, R.K., Singh, S.P., Khare, S.K., Gupta, M.N., 2005. One-Step Purification and Characterization of an Alkaline Protease from Haloalkaliphilic *Bacillus* sp., Journal of Chromatography A., 1075, 103-108.
- Gülçin, İ., 2006. Antioxidant and Antiradical Activities of L-Carnitine. Life Science, 78, 803-11.
- Gülçin, İ., Dastan, A., 2007. Synthesis of Dimeric Phenol Derivates and Determination of in Vitro Antioxidant and Radical Scavenging Activities. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 22, 685-95.
- Halliwell, B., 1991. Reactive Oxygen Species In Living Systems. The American Journal of Medicine, 91(3C), 14-21.

- Halliwell B., Aruoma O. 1991. DNA Damage By Oxygen-Derived Species: Its Mechanisms And Measurement In Mammalian Systems. FEBS Lett. 281: 9-19
- Huang Q., Yong P., Xin L., Haifeng W., Zhang Y., 2003 Purification and Characterization of an Extracellular Alkaline Serine Protease with Dehairing Function from *Bacillus pumilus* Current Microbiology 46: 169–173
- Johnvesly, B., Naik, G.R., 2001. Studies On Production Of Thermostable Alkaline Protease From Thermophilic And Alkaliphilic *Bacillus Sp.* JB-99 In O Chemically Defined Medium. Process Biochemistry, 37, 139-144.
- Joo, H., Chang, C., 2005. Production Of Protease From A New Alkalophilic *Bacillus Sp.* I-312 Grown On Soybean Meal: Optimization And Some Properties. Process Biochemistry, 40, 1263-1270.
- Kalisz, H.M., 1988. Microbial enzymes. Advances in Biochemical engineering, Biotechnology, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 36:3-61.
- Kane, S.A., Hecht, M.S., 1994. Polynucleotide Recognition and Degradation by Bleomycin. Progress in Nucleic Acid Research & Molecular Biology. 49, 313-352.
- Karipçin, F., Dede, B., Çelik, M., Özkan, E. 2010. Synthesis, Characterization, Catalase, Catecholase-Like Activities Of Mono-, Trinuclear Nickel(II) And Copper(II) Dioxime Complexes. 2nd Pak-Turk Seminar On Chemical Sciences, Jamshoro, Pakistan.
- Kasavi, C., 2006. Kovalent bağlanma ve fiziksel adsorbsiyon metodları ile proteaz enziminin immobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Kaur, S., Vohra, R.M., Kapoor, M., Beg, Q.K., Hoodal, G.S., 2001. Enhanced Production And Characterization Of An Highly Thermostable Alkaline Protease Horn *Bacillus Sp.* P-2. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 17, 125-129.
- Kazan, D., Denizci, A.A., Öner, M.N.K., Erarslan, A., 2005. Purification and Characterisation of a Serine Alkaline Protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 32: 335-344.
- Kenny, A.J, 1999. Nomenclature and Classes of Peptidases, In Proteolytic Enzymes Tools and Targets, edited by E.E. Sterchi and W. Stocker, (Springer- Verlag, Germany, P:1-8.
- Keskin, H., 1975. Gıda Kimyası, İstanbul Üniversitesi Yayınları, 3. Baskı, İstanbul.
- Khalil, A. B., GhandI, H., Anfoka, H., Bdour, S., 2003. Isolation Of Plasmids Present In Thermophilic Strains From Hot Springs In Jordan. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 19:239-241.

- Kılınç K., Kılınç A., 2002. Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi, 33(2): 110-118.
- Kıralan, M., Ercoşkun, H., Işıksal, S., 2004, Gıda Antioksidanları Ve Etki Mekanizmaları. Akademik Gıda, 2, 5-14.
- Kıran, E.O., U., Çömlekçioğlu, N., Dostbil, 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler Ve Endüstrideki Kullanım Alanları. KSU. Journal of Science and Engineering, 9(1):12-19.
- Kim, J.H., and Kim, S.H., 2003. Double Strand DNA Cleavage by a Dinuclear Cu(II) Complex. Chemistry Letters. 32 (6), 490.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., 2000. Genetik Kavramlar. (çev. Prof. Dr. Cihan Öner), Palme yayıncılık, Ankara.
- Koleva, I. I., Van Beek, T. A., Linssen, J. P. H., Groot, A., & Evstatieva, L. N., 2002. Screening Of Plant Extracts For Antioxidant Activity: A Comparative Study On Three Testing Methods. Phytochemical Analysis, 13, 8–17.
- Köksal, H., 1996. Geçiş Metallerinin Naftilsalisilaldiminlerle Kompleks Bilesiklerinin Sentezi, Yapı ve Spektral Özelliklerinin İncelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, K.S.Ü. 86s, Kahramanmaraş.
- Köksal, H., 1999. Yeni İmin-Oksim Ligandlarının ve Metal Komplekslerinin Sentezi ve Yapılarının Aydınlatılması. F.Ü. Doktora Tezi, Elazığ, 105s.
- Krajewska, B., 2003. Application of Chitin and Chitosan Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review. Enzyme and Microbial Technology, 35:126-139.
- Kumar, C.G., Takagi, H., 1999. Microbial Alkaline Proteases: a Bioindustrial Viewpoint. Biotechnology Advances, 17: 561-594.
- Kumar, K. N., Ramesh, R., 2004. Synthesis, Characterization, Redox Property and Biological Activity of Ru(II) Carbonyl Complexes Containing O,N-donor Ligands and Heterocyclic Bases. Spectrochimica Acta Part A 60, 2913–2918.
- Kumar, L.S., Prasad, K.S., Revanasiddappa, H.D., 2011. Synthesis, Characterization, Antioxidant, Antimicrobial, DNA Binding And Cleavage Studies Of Mononuclear Cu(II) And Co(II) Complexes Of 3-Hydroxy-N'-(2-Hydroxybenzylidene)-2-Naphthohydrazide. European Journal of Chemistry. 2 (3), 394-403.
- Kurdy, V.A, I.A., Simonenko, 1994. Alkaline Serine Proteinase And Lectin İsolation From The Culture Fluid Of *Bacillus subtilis*. Applied Microbiology and Biotechnology, P:41-505.

- Kurt, D., 2003. Plazmid DNA Saflaştırılması İçin Silika Bazlı Sorbentler. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Mühendislik Tezi, Ankara.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage Of Structural Proteins During The Assembly Of The Head Of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Langmaier, F., M., Mladek, K., Kolomaznik, S., Sukop, 2002. Isolation Of Elastin And Collagen Polypeptides From Long Cattle tendons As Raw Material For The Cosmetic Industry. Czech Republic. P:1-9.
- Lee, J.K., Kim, Y.O., Kim, H.K., Park, Y.S., Oh, T.K., 1996. Purification and Characterization of a Thermostable Alkaline Protease from *Thermoactinomyces* sp. E79 and the DNA Sequence of the Encoding gene. *Biosci Biotechnol Biochemistry*. 60, 840-46.
- Levinson, W., Jawetz E., 2008. Medical Microbiology and Immunology. The McGraw -Hill Companies, ISBN 978-0-07-149620-9, United States, 11p.
- Liu, P., Shi, J., Tong, Q., Feng, Y., Huang, H. ve Jia, L., 2009. Synthesis and characterization of a chiral Schiff base containing a D-altropyranoside unit and its zinc(II) complex. *Inorganica Chimica Acta*, 362, 229–232.
- Lobmann, R., C., Zemlin, M. Motzkau, K. Reschke, H., Lehnert, 2005. Proteaz Absorban Ortu İle Tedavi Edilmiş Diyabetik Ayak Yaralarında Matriks Metalloproteinazlar Ve Büyüme Faktörlerinin Ekspresyonu. Department of Endocrinology and Metabolism, Published by Magdeburg University Medical School, Germany. 1-4.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Mabrouk, S.S., Hashem, A.M., EL-Shayeb, A., Ismail, M.S., Abdel- Fattah, A.F., 1998. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresource Technology*, 69:155-159.
- Madigan, M.T., Mars, B.L., 1997. Extremophiles. *Scientific American*, 276, 66-71.
- Mahler, R.H., H., Cordes, 1966. *Biological Chemistry*. New York, 346- 411.
- Manczinger, L., Rozs, M., Vágvölgyi, Cs., Kevei, F., 2003. Isolation and Characterization of a New Keratinolytic *Bacillus licheniformis* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 35-39.
- Marek, J., Travnicek, Z., Racanska, E., Musselik, J., Svajlenova, O., 2008. Synthesis, Characterization and Antiradical and Antidiabetic Activity of Copper(II) and Zinc(II) Schiff Base Complexes Derived from Salicylaldehyde and β -alanine, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102; 595-605.

- Massoud, S.S., Louka, F.R., Xu, W., Perkins, R.S., Vicente, R., Albering, J.H., Mautner, F.A., 2011. DNA Cleavage by Structurally Characterized Dinuclear Copper (II) Complexes Based on Triazine. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2011 (23), 3469–3479.
- Maurer, K.H. 2004. Detergent Proteases. *Current opinion in biotechnology*, 15: 1-5. Morikawa.
- McLachlan, G.A., Muller, J.G., Rokita, S.E., Burrows, C., 1996. Metal-Mediated Oxidation of Guanines in DNA and RNA: A Comparison of Cobalt(II), Nickel(II) and Copper(II) Complexes. *Inorganica Chimica Acta*. 251(1-2), 193-199.
- Mei, C., Jiang, X., 2005. A Novel Surfactant- and Oxidation- Stable Alkaline Protease from *Vibrio metschnikovii* DL 33-51. *Process Biochemistry*, 40; 2167-2172.
- Molyneux, P., 2004. The Use Of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 26(2) : 211-219.
- Natarajan, K., Jayabalakrishnan, C. and Karvembu, R., 2002. Catalytic and Antimicrobial Activities of New Ruthenium(II) Unsymmetrical Schiff Base Complexes. *Transition Metal Chemistry* 27, 790–794.
- Nelson, D., M.M., Cox, 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri* , N. Kılıç (Editor), 3. Baskıdan Ceviri, Palme Yayıncılık, Sayfa: 243-290.
- Niehaus F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G., 1999. Extremophiles As A Source Of Novel Enzymes For Industrial Application. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 5: 711-729.
- Nilegaonkar, S.S., Zambare, V.P., Kanekar, P.P.; Dhakephalkar, P.K., Sarnaik, S.S., 2007. Production And Partial Characterization Of Dehairing Protease From *Bacillus Cereus* MCM B-326. *Bioresource Technology*, 98: 1238-1245.
- Nishino, H., 1999. Cancer Prevention By Natural Carotenoids, Antioxidant Food Supplements In Human Health. Ed. By Packer, L., Hiramastu, M., Yoshikawa, T., Academic Press, USA.
- Novel, J.J., W.J., Nickerson, R.S., Robinson, 1963. Screening For A New Streptomyces Strain Capable Of Efficient Keratin Degradation. *Biochimica Acta*, 77, 73.
- Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., Saxena, R.K., Gupta, R. 2001. Characterization And Wash Performance Analysis Of An SDS-Resistant Alkaline Protease From A *Bacillus Sp.* *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 493-497.
- Onat, T., Emerk, K., 1997. *Temel Biyokimya*, Saray Medikal Yayıncılık, (2.Baskı), İzmir.

- Orhan, E., 2003. *Bacillus subtilis* Ve *Bacillus cereus* Bakterilerinden Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması Ve Özelliklerinin İncelenmesi. İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, s: 24-38, İstanbul.
- Orgel, L. E., 1960. An Introduction to The Transition-Metal Chemistry Ligand Field. 300s.
- Ottrup, H., Jorgensen, S.T., 2002. The Importance Of *Bacillus* Species İn The Production Of Industrial Enzymes. In: Berkley, R. (Ed.) Applications and systems of *Bacillus* and Relatives. Blackwell Science, Malden, Mass. P: 206-208.
- Özkan A., Fışkın K., 2004. Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez Ve Antioksidant Enzimler. Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi, 1, 14: 52-60.
- Öztürk, N.S., 1998. Değişik Piridin Aldehitler ile Çeşitli Anilinlerden Türeyen Schiff Bazlarının Sentezi ve Bazı Geçiş Metal Komplekslerinin Hazırlanması. İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul.
- Öztürk, M.H., 2004. Partial Purification and Characterization of Alkaline Proteases from Isolated *Bacillus* Strains. İ.T.U. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- 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.
- Patai, S. 1970. Chemistry of the Carbon-Nitrogen Double Bond. Wiley, 238-247, New York.
- Patel, R.K., Dodia, M.S., Joshi, R.H., Singh, S.P., (2006). Purification and Characterization of Alkaline Protease from a Newly Isolated Haloalkaliphilic *Bacillus* sp. Process Biochemistry, 41, 2002-2009.
- Polaina, J., Maccabe, A.P., 2007. Industrial Enzymes: Structure, Function And Application, Springer Netherlands. P: 747 -842.
- Pope, L.E., Sigman, D.S., 1984. Secondary Structure Specificity of the Nuclease Activity of the 1,10-Phenanthroline-Copper Complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 81(1), 3-7.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., Shahabimajd, N. 2006. Antioxidant Activity, Phenol And Flavonoid Contents Of Some Selected Iranian Medicinal Plants. African Journal of Biotechnology 5(11): 1142-1145.
- Prazeres, D.M.F., Ferreira G.N.M., 2004. Design Of Flowsheets For The Recovery And Purification Of Plasmids For Gene Therapy And DNA Vaccination. Chemical Engineering and Processing, 43, 615-630.

- Rahman, R.N.Z., Geok, L.P., Basri, M., Salleh, A.B., 2006. An Organic Solvent- Stable Alkaline Protease From *Pseudomonas Aeruginosa* Strain K: Enzyme Purification And Characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 39; 1484-1491.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 597-635.
- Reddy, K.H., Reddy, P.S., 2000. Nuclease Activity of Mixed Ligand Complexes of Copper(II) with Heteroaromatic Derivatives and Picoline. *Transition Metal Chemistry*, 25 (5), 505-510.
- Reddy, P.R., Manjula, P., 2007. Mixed-Ligand Copper(II)–Phenanthroline–Dipeptide Complexes: Synthesis, Characterization, and DNA-Cleavage Properties. *Chemistry & Biodiversity*. 4 (3), 468–480.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganda, G., 1997. Antioxidant Properties Of Fenolic Compunds. *Trends in Plant Science*, 2 , 152-159.
- Rikans, L. E., Hornbrook, K. R., 1997. Lipid Peroxidation, Antioxidant Protection And Aging. *Biochimica Biophysica Acta*, 1362, 116-127.
- Rossi, M.L., Neves, A., Hörner, R., Terenzi, H., Szpoganicz, B., Sugai, J., 2002. Hydrolytic Activity Of A Dinuclear Copper(II,II) Complex İn Phosphate Diester And DNA Cleavage. *Inorganica Chimica Acta*. 337, 366-370.
- Sağlam, N., Çolak, A., Serbest, K., Dülger, S., Güner, S., Karaböcek, S., Beldüz, A.O., 2002. Oxidative Cleavage of DNA by Homo- and Heteronuclear Cu(II)-Mn(II) Complexes of an Oxime-Type Ligand. *Biometals*, 15(4), 357- 365.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P., 2004. Development İn The Use Of *Bacillus* Species For Industrial Production. *Can Journal of Microbiology*. 50:1-17
- Schiff, H. 1869. Über die Aldehyd und Amin Reaktionen. *Liebigs Annalen Chemie*, 150-197.
- Scovill, J.P., Klayman, D.L., Franchino, C.F., 1982. 2-Acetylpyridine Thiosemicarbazones 4. Complexes with Transition-Metals as Antimalarial and Antileukemic Agents. *Jornal of Medicine Chemistry*, 25(10), 1261-1264.
- Selçuk, S., 2010. Bazı Schiff Bazı Türevleri ve Metal Komplekslerinin Antioksidan ve Antitümör Özelliklerinin İncelenmesi Fırat Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Elazığ.
- Serin, S., 1980. 1,3-Difenil-2-To-5-Bis(Hidroksimino)-1, 2, 4, 5-Tetrahidroimidazol Eldesi. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Trabzon.

- Sevinç, N., Demirkan, E., 2011. Production of Protease by *Bacillus* sp. N-40 Isolated from Soil and Its Enzymatic Properties. *Jornal of Biology of the Environ. SCI.*, 5(14), 95-103.
- Shahidi, F., Nazck, M. 1995. Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects And Applications. A Technomic Publishing Company, Lancaster, Basel.
- Shahidi, F., 2000. Antioxidants In Foods And Food Antioxidants. *Nahrung*, 44, 158-163.
- Sherwin, E.R. 1978. Oxidation And Antioxidants In Fat And Oil Processing. *Journal of the American Oil Chemists Society* 55: 809-814.
- Sigman, D.S., Graham, D.R., D'Aurura, V., Stern, A.M., 1979. Oxygen-Dependent Cleavage of DNA by the 1,10-Phenanthroline Cuprous Complex. Inhibition of *Escherichia coli* DNA Polymerase I. *Jounal of Biological Chemistry.*, 254 (24), 12269-12272.
- Silverthorn, C.F., 2004, Parsons T.L., *Biomedical Chromotography*, P:23-27.
- Singh, D.P., Rana, V.B., 1986. Dinuclear Trivalent Chromium, Manganese, Iron and Cobalt Complexes Bridges by Aromatic Diamines. *Transition Metal Chemistry*, 11(1), 23-26.
- Singh, J.; Batra, N.; Sobti, R.C. 2000. Serine Alkaline Protease from Newly Isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochemistry*, 36, 781-785.
- Singh, J., Vohra, R.M., Sahoo, D.K., 2001a. Purification And Characterization Of Two Extracellular Alkaline Protease From A Newly Isolated Obligate Alkalophilic *Bacillus* Sphaericus. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 26, 387-393,
- Singh, J., Batra, N., Sobti, R. C., 2001b. Serine Alkaline Protease From Newly Isolated *Bacillus* sp. SSR 1. *Process Biochemistry*, 36, 781-785.
- Sissi, C., Mancin, F., Gatos, M., Palumba, M., Tecilla, P., Tonellato, U., 2005. Efficient Plasmid DNA Cleavage by a Mononuclear Copper(II) Complex. *Inorganic Chemistry*, 44 (7), 2310–2317.
- Szececi, P., Koch, C., Foltmann, B., 1992. Seminal Pepsinogen C is Not Identical With, But is Very Similar to Gastric Pepsinogen , *FEBS Lett*, P:238, 101.
- Takami, H., Akiba, T. and Horikoshi, K., 1989. Production of Extremely Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30, 120-124.
- Tanksale, M.A. 2001. Molecular Aspects Of A Fungal Alkaline Protease. Ph.D. Thesis, University of Pune, India, P:1-209.

- Tarafder, M.T.H., Miah, M.A.L., 1986. Novel Peroxo Complexes of Zirconium Containing Organic-Ligands. *Inorganic Chemistry*, 25(13), 2265-2268.
- Tarafder, M.T.H., Kasbollah, A. Crause, K.A., Ali, A.M., Yamin, B.M., Fun, H.K., 2002. Synthesis and Chelation of Zn(II) and Cd(II) Complexes of S-benzyl- β -N (2-pyridyl) methylendithiocarbamate(HHNS) biactivity of HNNS Schiff base and its Zn(II), Cu(II) and Cd(II) Complexes and the X-ray Structure of the [Zn(NNS)₂] Complexes, *Polyhedron*, 20(18);2363-2370.
- Taş, E., Kılıç, A., Aslanoğlu, M., Kaplan, Ö., Ulusoy, M., 2005. Dört Dişli Salisilaldimin Schiff Bazı Ligandları ile Bunların Co(II) ve Cu(II) Komplekslerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Redoks Özellikleri. XIX. Ulusal Kimya Kongresi, 30 Eylül-04 Ekim 2005, Kuşadası, ANP94, 328.
- Thomas, T.D., Mills, O.E., 1981. Proteolytic Enzymes of Starter Bacteria. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 35, 255-273.
- Tian, M., Ihmels, H., Brötz, E., 2010. DNA Cleavage By The Cu(II) Complex Of The DNA-Intercalating 9-Bis(Pyridin-2-Ylmethyl)Aminobenzo[B]Quinolizinium. *Dalton Transactions*, 39, 8195-8202.
- Tjioet, L., Meiningert, A., Joshit, T., Spiccia, L., Graham, B., 2011. Efficient Plasmid DNA Cleavage by Copper(II) Complexes of 1,4,7-Triazacyclononane Ligands Featuring Xylyl-Linked Guanidinium Groups. *Inorganic Chemistry*, 50 (10), 4327–4339.
- Topal, S., Pembeci, C., Borcaklı, M., 2000. Türkiye'nin Tarımsal Mikoflorasının Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I:Amilaz, Proteaz, Lipaz. *Journal of Biology*. 24:79-93.
- Uhlig, H., 1998. *Industrial Enzymes and Their Applications*, John Wiley & Sons, USA, P: 116-144.
- Uji-i and Foubert, 2006. Biosystems, Topological Modifications Of Plasmid DNA Adsorbed On Mica As Investigated By Atomic Force Microscopy (AFM).<http://www.chem.kuleuven.be/research/mds/biosystems.htm>
- Uludağ, Y.B., 2000. İmmobilize Glukomilaz ile Maltodekstrinden Glukoz Üretimi. Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, s: 25-39, Kocaeli.
- Uma, V., Castineiras, A., Nair, B. U., 2007. Copper(II) Complexes Of N₄ Tetradentate Ligands With Flexible Alkyl Spacers: Crystal Structure, DNA Binding And Cleavage Studies. *Polyhedron*. 26 (13), 3008-3016.

- Uyar, F., Porsuk, İ., Kızıl, G., Yılmaz, E.İ., 2011. Optimal Conditions For Production Of Extracellular Protease From Newly Isolated *Bacillus Cereus* Strain CA15. Eurasian Journal of Biosciences, 5:1-9.
- Ünaleroğlu, C., Temelli, B., Hökelek, T. 2001. Conformational and Structural Analysis of N-N'-bis (4-metoxybenzylidene) etylenediamine. Journal of Molecular Structure, 570, 91-95.
- Ward, O.P, 1985. Proteolytic Enzymes. In Comprehensive Biotechnology, Edited by M. Moo-Young, Pergamon Press, Great Britain, 789-818.
- West, D.X., Pannell, L.K., 1989. Transition-Metal Ion Complexes of Thiosemicarbazones Derived from 2-Acetrypyridine N-Oxide 2. the N-4- Dimethyl Derivative. Transition Metal Chemistry, 14(6), 457-462.
- Wing, R., Drew, H., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura, K., Dickerson, R., 1980. Crystal Structure Analysis of A Complete Turn of B-DNA. 287 (5784); 755-8.
- Wiseman, A., 1987. Handbook of Enzyme Biotechnology. 2. ed. New York, EUA John Wiley sons.
- Yang, J., Shih, I., Tzeng, Y., Wang, S., 2000. Production And Purification of Protease From a *Bacillus subtilis* That Can Deproteinize Crustacean Wastes. Enzyme And Microbial Technology. 26, 406-413.
- Yin, L.J., Lin, H.H., Xiao, Z.R., 2010. Purification And Characterization Of A Cellulase From *Bacillus subtilis* YJ1 . Journal of Marine Science and Technology, 18 (3), 466-471.
- Zakaria, A.Q., 2006. Production And Characterization Of Thermostable A-Amylase By Thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. Journal of Biotechnology, 1: 850-857.
- Zambare, V., 2010. Purification And Characterization Of Neutral Serine Protease From *Bacillus* sp. Asiatic Journal of Biotechnology Resources. 03, 183-192.
- Zeman, N.W, J.M., Mcree, 1985. α -Amylase production using a recombinant DNA organism. Cereal Foods World, 30 (1):777-780.
- Zhang, Y., Zou, B., Chen, Z., Pan, Y., Wang, H., Liang, H., Yi, X., 2011. Synthesis And Antioxidant Activities Of Novel 4-Schiff Base-7-Benzoyloxy-Coumarin Derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 21; 6811-6815.

ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı : Şevkinaz KONAK

Doğum Yeri ve Yılı : Burdur-1976

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Burdur Sağlık Meslek Lisesi

Lisans : Akdeniz Üniversitesi Sağlık Y.O.

Yüksek Lisans : S.D.Ü. Sağlık Bilimler Enstitüsü

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Kemer Yaşam Hastanesi (1995-1996)

İlgi Polikliniği (1996-1998)

Antalya SSK Bölge Hastanesi (1998-2000)

S.D.Ü. Burdur Sağlık Yüksek Okulu (2001-2006)

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu (2006-Devam Ediyor)

Yayınları (SCI ve diğer makaleler)

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler (SCI: *Science Citation Index*; SSCI: *Social Science Citation Index*; AHCI: *Arts&Humanities Citation Index*'te Yer Alan Dergiler)

- 1- Fetal development of the hand, digits and digit ratio (2D:4D). Early Hum Dev. 82(7):469-75. Atıf Sayısı: 123

Hakemli dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar dışındaki makale

- 1- Fetal dönemde üst ve alt ekstremitte arasındaki büyüme oranları, SDÜ.Tıp Fakültesi Dergisi, Haziran (2) (2005)
- 2- Yaşlılarda Tedaviye Uyum Turkish Journal of Geriatrics 2006, Cilt 9, Sayı 3, Sayfa(lar) 177-181 (2006) Atıf Sayısı: 10
- 3- Öğretim Elemanlarının Tükenmişlik Düzeyleri: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Örneği, Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi, Cilt 2, Sayı 5, Ağustos 2007 (2007) Atıf Sayısı: 12
- 4- Burdur Devlet Hastanesinde Çalışan Hemşirelerin, Öğrenci Hemşirelerin Klinik Uygulamalarına ve Öğretim Elemanlarıyla İşbirliği Yapmaya İlişkin Görüşleri, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2008 Mart; 15(1) (2008) Atıf Sayısı: 4
- 5- Yenidoğan - Beş Yaş Arası Çocuklarda ve 16-60 Yaş Arası Erişkinlerde 2.-4. Parmak Oranının Araştırılması, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2008 Mart; 15(1)(2008)177-181.

Ulusal kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda sunularak, programda yer alan, tam metin olarak yayımlanan bildiri

- 1- Burdur Devlet Hastanesi'nde çalışan hemşirelerin, öğrenci hemşirelerin klinik uygulamalarına ve öğretim elemanlarıyla işbirliği yapmaya ilişkin görüşleri Harran Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, V. Ulusal Hemşirelik Öğrencileri Kongresi , Şanlıurfa. 20-21 Nisan 2006.
- 2- Cerrahi Kliniklerde Çalışan Hemşirelerin Cerrahi Alan Enfeksiyonları Hakkındaki Bilgi Düzeyleri" 17. Ulusal Cerrahi Kongresi 26-29 Mayıs 2010, Ankara (2010)

Ulusal kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda sunularak, programda yer alan, özet metin olarak yayımlanan bildiri

- 1- Burdur Ana Çocuk Sağlığı Merkezine Ekim 2005'te başvuran 62 evli kadının doğurganlık özellikleri ve gebeliği önleyici yöntem kullanımları IV.Temel Sağlık Hizmetleri Sempozyumu, 13-14 Nisan 2006 ,Manisa (2006)
- 2- Fetal dönem boyunca üst ve alt ekstremitte arasındaki büyüme oranları. Uluslararası Katılımlı VIII. Ulusal Anatomi Kongresi Konya 2004; S 47: 126. (2004)
- 3- 0-6 Yaş Grubu Çocuğa Sahip Annelerin Ev Kazalarına Yönelik Güvenlik Önlemlerini Tanılama Durumu; V.Temel Sağlık Hizmetleri Sempozyumu; 10-11 Mayıs 2007; Manisa (2007) Atıf Sayısı: 1
- 4- Burdur Kadın Doğum ve Çocuk Hastanesi'ne Başvuran Gebelerin Gebelik Süreci İle İlgili Davranışları; V.Temel Sağlık Hizmetleri Sempozyumu; 10-11 Mayıs 2007; Manisa.

Uluslararası kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda sunulurak, programda yer alan, özet metin olarak yayımlanan bildiri

- 1- The Point of Views of the 4th and 5th Grade Students a Tending to a Central Primary School in Burdur I. European Nursing Student Congrees , 25-26 May 2006,İZMİR (2006)
- 2- Burdur Devlet Hastanesi'nde 2005 Yılında Alınan Kültür Örneklerinin İncelenmesi I.Ulusal Sağlığı Geliştirme ve Sağlık Eğitimi Kongresi (Uluslararası Katılımlı); 9-12 Kasım 2006, Marmaris (2006)

Uluslararası kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda sunulurak, programda yer alan poster bildiri

- 1- Özbek, S., Özdemir, F., Konak, Ş., Özmen, İ., İleri-Büyükoğlu, T., Genç, H., “The Effects of Extacts Obtained from *Nepeta italica* L. Species on the Antioxidant Enzymes.” 3rd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. Cell Membranes and Free Radical Research Vol. 2, No.1, Isparta, Türkiye (June, 2010) P.71, Poster 89.
- 2- Özbek, S., Özdemir, F., Özmen, İ., Konak, Ş., İleri- Büyükoğlu, T., Özçelik, H., “The Effects of the Extracts Obtained from the *Nepeta cilicia* Boiss on the Antioxidant Enzymes.” 3rd nternational Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. Cell Membranes and Free Radical Research. Vol. 2, No. 1, Isparta, Türkiye (June,2010) P.72, Poster 90.

Projeler

- 1- İleribüyükoğlu, T.,Konak, Ş.,Özbek, S.,Özmen, İ., "Nepeta Cadmea Boiss. İle Nepeta Sulfuriflora .H. Davis Türlerinin Ratlarda Antioksidan Enzimler Üzerine Etkileri" MAKÜ-BAP, 043-NAP-08, 2009.
- 2- İleribüyükoğlu, T., Konak, Ş.,Özbek, S.,Özmen, İ.,"Basillus subtilis' den Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Schiff Bazlarının Etkisinin İncelenmesi" MAKÜ BAP, 0080-NAP-09, 2012.