



**MİKROBİYAL KÖKENLİ PROTEAZ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE  
KARAKTERİZASYONU**

**MESUT TOLAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI  
DOÇ. DR. BİLGE HİLAL ÇADIRCI  
Ekim - 2015  
Her hakkı saklıdır**

**T.C.  
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MİKROBİYAL KÖKENLİ PROTEAZ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE  
KARAKTERİZASYONU**

**MESUT TOLAN**

**TOKAT  
Ekim - 2015**

**Her hakkı saklıdır**

**Bu tez çalışması;**

**Gaziosmanpaşa Üniversitesi tarafından 2014/35 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Mesut TOLAN tarafından hazırlanan “MİKROBİYAL KÖKENLİ PROTEAZ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 1 EKİM 2015 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / ~~Oy Çoğunluğu~~ İle Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Doç. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI



Üye  
Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ  
Gaziosmanpaşa Üniversitesi



Üye  
Prof. Dr. İhsan YAŞA  
Ege Üniversitesi



Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .....  
tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Mehmet Ali SAKİN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

26.10/2015

## **TEZ BEYANI**

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

**MESUT TOLAN**

**1 Ekim 2015**

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

## MİKROBİYAL KÖKENLİ PROTEAZ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

MESUT TOLAN

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI

Bu çalışmada proteaz üreticisi mikroorganizmalar topraktan izole edilmiş ve kalitatif olarak en yüksek proteolitik aktivite gösterdiği belirlenen suş, 16S rRNA dizi analizi ile *Bacillus* sp. olarak tanılanmış ve *Bacillus* sp. MT01 olarak adlandırılmıştır. Ekstraselüler olarak üretilen proteaz enzimi gradient  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  çöktürmesi yöntemiyle %42.72 verimde 1,12 kat kısmi olarak saflaştırılmıştır. Sonrasında Sephacryl S-200 jel filtrasyon kromatografisi ve daha sonra DEAE Sepharose iyon değişim kromatografisi ile % 0.27 verimde 0,26 kat saflaştırılmıştır. Enziminin molekül kütlesi SDS-PAGE ile 32 kDa olarak tespit edilmiştir. Enziminin optimum reaksiyon sıcaklığı ve pH'sı sırasıyla 50 °C ve pH 7.5 olarak bulunmuştur. Proteaz enzimi 30°C'de 72 saat boyunca aktivitesinin %70,88'ini koruduğu görülmüştür. Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi incelendiğinde,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+1}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$  ve  $\text{Mg}^{+2}$  iyonlarının aktivatör etki gösterdiği,  $\text{Cu}^{+2}$  metal iyonunun ise inhibitör etki gösterdiği görülmüştür. Enzim aktivitesi üzerine organik çözücüler ve yüzey aktif maddelerin etkisi incelenmiş, Aseton, 2-Propanol ve Etil alkol varlığında sırasıyla aktivitede %46.6, 25.8 ve 17.8 oranında, DMSO, Toluen ve Benzen varlığında ise çok az aktivite kaybı gözlemlenmiştir. Artan  $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonu, proteolitik aktiviteyi artırırken, %1'lik Tween-80 ve Triton X-100 konsantrasyonu aktivite kaybına neden olmuştur. Enzim, kazein, BSA ve fibrinojen substratları arasından en yüksek aktiviteyi kazein substratı üzerinde göstermiştir. Enzim aktivitesi EDTA ile tamamen inhibe olurken, serin proteaz inhibitörü 5 mM PMSF ile %86,64 oranında inhibe olmuştur. Bu inhibisyon sonuçları enzimin metallo proteaz olduğunu düşündürmüştür. Enzimin  $K_m$  ve  $V_m$  kinetik sabitleri ise sırasıyla 0.574 mg/ml ve 338.1234  $\mu\text{mol/ml dk}$  şeklinde bulunmuştur.

2015, 105 SAYFA

ANAHTAR KELİMELER: *Bacillus* sp., Metalloproteaz, Proteaz, SDS-PAGE

## ABSTRACT

### MASTER THESIS

#### THE PRODUCTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF MICROBIAL ORIGINATED PROTEASE

MESUT TOLAN

GAZIOSMANPASA UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

(SUPERVISOR:) Assoc. Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI

In this study, protease producing microorganisms were isolated from soil and the strain which has the highest proteolytic activity by qualitative screening methods was identified as *Bacillus sp.* by 16S rRNA sequence analysis and called *Bacillus sp.* MT01. Extracellular protease was partially purified 1,12 fold by gradient  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation method with 42.72 % efficiency. Protease was purified chromatographically 0,26 fold by Sephacryl S-200 gel filtration and then DEAE Sepharose ion exchange chromatography with a yield of 0.27%. The molecular mass of the enzyme was determined as 32 kDa by SDS-PAGE. Optimum reaction temperature and pH of the enzyme was found to be 50 ° C and pH 7.5, respectively. Protease enzyme showed its 70,88% of activity for 72 hours at 30 ° C. When the effect of metal ions on enzyme activity is analyzed,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{N}^{+1}$ ,  $\text{C}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$  and  $\text{Mg}^{+2}$  ions were detected as activators, and  $\text{Cu}^{+2}$  metal ions was observed as inhibitors. Effects of organic solvents and surfactants on enzyme activity were examined. In the presence of acetone, 2-propanol and ethanol, enzyme loses its activity by 46.6%, 25.8 % and 17.8 %, respectively. But, it is observed that presence of DMSO, toluene and benzene have very small activity lost. While the higher concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  increased the activity Tween-80 and Triton X-100 has caused the loss of activity. Through the substrates like casein, BSA and fibrinogen, protease showed the highest activity against casein. While EDTA completely inhibits enzyme activity, the serine protease inhibitor PMSF inhibited the 86,64% of the activity. The results of this inhibition suggests that the *Bacillus sp.* MT01 protease is a metallo protease. The kinetic constants of the enzyme  $K_m$  and  $V_m$  is measured as 0.574 mg/ml, 338.1234  $\mu\text{mol/ml.min}$ , respectively.

2015, 105 PAGE

**KEYWORDS:** *Bacillus sp.*, Metalloprotease, Protease, SDS-PAGE

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve tecrübesi ile bana her konuda yardımcı olan ve yol gösteren tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI'ya, lisans eğitimimiz süresince bizden emek ve bilgilerini esirgemeyen, karakter ve düsturlarını örnek aldığımız hocalarımızdan başta Sayın Prof. Dr. Metin YILDIRIM ve eşi Sayın Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM olmak üzere G.O.Ü Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyeleri'ne, ayrıca her daim telkin, motivasyon, kahve ve güzel sohbetleri için Sayın Yard. Doç. Dr. Şeniz KARABIYIKLI'ya, tez çalışmam kapsamında Lineweaver Burk Grafiğinin çıkarılmasında yardımcı olan Sayın Yard. Doç. Dr. Mehmet TOKATLI'ya ve filogenetik soy ağacı çıkarmamda yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Sema BİLGİN ŞENTÜRK hocama, adlarını ve emeklerini burada saymadığım nice dostlarıma ve de haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, beni bu günlere getiren, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen başta Annem Huriye TOLAN ve Babam Ünal TOLAN'a ve her daim dertlerimi anlattığım, durum kritikleri yaptığım, bana hem kardeş hem de arkadaşlık yapan canım ablalarım Fevziye TOLAN ve eşi Fatih TOLAN'a, Gülsüm UÇAR ve eşi Erkan UÇAR'a ve de Sevcan TOLAN'a teşekkürü bir borç bilir ve de şükranlarımı sunarım.

**MESUT TOLAN**

**1 Ekim 2015**

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Proteazlar ve sınıflandırılması .....	<b>5</b>
2.1.1. Ekzopeptidazlar .....	<b>7</b>
2.1.2. Endopeptidazlar .....	<b>9</b>
2.1.2.1. Serin proteazlar .....	<b>10</b>
2.1.2.1.1. Serin alkale proteazlar .....	<b>10</b>
2.1.2.1.2. Subtilisinler .....	<b>11</b>
2.1.2.2. Aspartik proteazlar .....	<b>11</b>
2.1.2.3. Sistein/Tiyol proteazlar .....	<b>12</b>
2.1.2.4. Metalloproteazlar .....	<b>12</b>
2.3. Proteazların katalitik etki mekanizmaları .....	<b>13</b>
2.3.1. Serin proteazın katalitik etki mekanizması .....	<b>14</b>
2.3.2. Aspartik proteazların katalitik etki mekanizması .....	<b>16</b>
2.3.3. Sistein proteazın katalitik etki mekanizması .....	<b>17</b>
2.3.4. Metalloproteazın katalitik etki mekanizması .....	<b>18</b>
2.4. Proteaz kaynakları .....	<b>20</b>
2.4.1. Bitkisel proteazlar .....	<b>20</b>
2.4.1.1. Papain .....	<b>21</b>
2.4.1.2. Bromelin .....	<b>21</b>
2.4.1.3. Keratinazlar .....	<b>22</b>

	<u>Sayfa</u>
2.4.2. Hayvansal proteazlar .....	22
2.4.2.1. Tripsin .....	23
2.4.2.2. Kimotripsin .....	23
2.4.2.3. Pepsin .....	23
2.4.2.4. Renin .....	24
2.4.3. Mikrobiyal proteazlar .....	24
2.4.3.1. Bakteriyal proteazlar .....	25
2.4.3.2. Fungal proteazlar .....	27
2.4.3.3. Viral proteazlar .....	27
2.5. Proteazların endüstrideki önemi ve kullanım alanları .....	28
2.5.1. Deri endüstrisi .....	30
2.5.2. Deterjan endüstrisi .....	31
2.5.3. İlaç endüstrisi .....	32
2.5.4. Bakım ürünleri .....	32
2.5.5. Tekstil sanayi .....	32
2.5.6. Gümüşün geri kazanımı .....	33
2.5.7. Gıda endüstrisi .....	33
2.5.8. Atık işleme .....	34
2.5.9. Peptid sentezi, D,L-amino asitlerin sentezi ve çözündürülmesi .....	34
2.6. Konu ile ilgili yapılan çalışmalar .....	35
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>39</b>
3.1. Materyal .....	39
3.1.1. Proteaz üretici mikroorganizma .....	39
3.1.2. Ekipman .....	39
3.1.3. Kimyasallar .....	39
3.1.4. Besiyerleri ve substratlar .....	40
3.1.5. Tampon ve çözeltiler .....	41
3.2. Yöntem .....	45
3.2.1. Proteaz üretici mikroorganizma izolasyonu ve karakterizasyonu .....	45
3.2.2. Proteaz enzimi üretimi için aktif kültürün hazırlanması .....	45
3.2.3. Optimum proteaz üretim zamanının belirlenmesi ve büyüme eğrisi.....	45

	<b><u>Sayfa</u></b>
3.2.4. Proteaz enzim aktivitesinin kantitatif olarak belirlenmesi .....	46
3.2.5. Tirozin standart eğrisinin hazırlanması .....	47
3.2.6. Enzim üretimi .....	48
3.2.7. Ekstraselüler proteaz enziminin saflaştırılması .....	48
3.2.7.1. Amonyum sülfat ile çöktürme .....	48
3.2.7.2. Diyaliz .....	50
3.2.8. Kısmi olarak saflaştırılan enzim karışımının termal aktivite ve termal stabilitesinin belirlenmesi .....	51
3.2.9. Kısmi olarak saflaştırılan enzim karışımının optimum pH ve pH stabilitesinin belirlenmesi .....	52
3.2.10. Kromotografik yöntemler ile ileri saflaştırma .....	53
3.2.10.1. Jel filtrasyon kromatografisi .....	53
3.2.10.1.1. Sephacryl S-200 kolon dolgu maddesinin hazırlanması ve kolonun doldurulması .....	53
3.2.10.1.2. Kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzim karışımının kolona yüklenmesi .....	53
3.2.10.2. İyon değişim kromatografisi .....	54
3.2.10.2.1. DEAE Sepharose iyon değişim kolonunun hazırlanması ve kolonun doldurulması .....	54
3.2.10.2.2. Jel filtrasyon kolonu ile elde edilen fraksiyonların kolona yüklenmesi .....	55
3.2.11. Bradford yöntemi ile protein miktarının belirlenmesi .....	56
3.2.12. BSA standart eğrisinin hazırlanması .....	56
3.2.13. SDS-PAGE yöntemi ile molekül ağırlığın belirlenmesi .....	57
3.3. Saflaştırılmış proteaz enziminin karakterizasyonu .....	59
3.3.1. Optimum sıcaklık ve termal stabilite.....	59
3.3.2. Optimum pH .....	60
3.3.3. İnhibitör ve metal iyonlarının proteaz enzimi üzerine etkisi .....	60
3.3.4. Organik çözücülerin proteaz enzimi üzerine etkisi .....	61
3.3.5. Hidrojen peroksit ve yüzey aktif maddelerin proteaz enzimi üzerine etkisi .....	61

	<u>Sayfa</u>
3.3.6. Proteaz enziminin substrat spesifitesinin belirlenmesi .....	61
3.3.7. Michaelis Menten Eşitliği ve Lineweaver Burk grafiği .....	62
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>64</b>
4.1. Proteaz üretici mikroorganizma .....	64
4.1.1. Bacillus sp. MT01 izolatının büyüme eğrisi.....	69
4.2. Kantitatif proteaz aktivitesi .....	70
4.3. Optimum proteaz enzim üretim zamanı .....	70
4.4. Ekstraselüler proteaz enzim üretimi ve saflaştırılması .....	71
4.4.1. Amonyum sülfat ile kısmi saflaştırma .....	71
4.4.1.1. Kısmi olarak saflaştırılan enzim karışımının termal aktivite ve termal stabilitesinin belirlenmesi .....	73
4.4.1.2. Kısmi olarak saflaştırılan enzim karışımının optimum pH ve pH stabilitesi .....	74
4.4.2. Jel filtrasyon kromatografisi .....	76
4.4.3. DEAE iyon değişim kromatografisi .....	78
4.4.4. BSA standart eğrisi .....	81
4.5. İleri saflaştırılmış proteaz enziminin karakterizasyonu .....	82
4.5.1. Optimum sıcaklık ve termal stabilite.....	82
4.5.2. Optimum pH .....	83
4.5.3. İnhibitör/aktivatör ve metal iyonlarının saf proteaz enzimi üzerine etkisi	84
4.5.4. Organik çözücülerin saf proteaz enzimi üzerine etkisi .....	85
4.5.5. Hidrojen peroksit ve yüzey aktif maddelerin saf proteaz enzimi üzerine etkisi .....	86
4.5.6. Saf proteaz enziminin substrat spesifitesi .....	87
4.5.7. Lineweaver Burk grafiği .....	88
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	<b>90</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	<b>100</b>
<b>7. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>105</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
µl	Mikro litre
µM	Mikro molar
kDa	Kilo dalton
mM	Mili molar
nm	Nano metre
rpm	Dakikadaki devir sayısı

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
Abs	Absorbans
APS	Amonyumpersülfat
BSA	Sığır serum albümini
CM	Karboksimetil
DEAE	Dietil amino etil
DMSO	Dimetil sülfoksit
DTT	Ditiyo treitol
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
HCl	Hidroklorik asit
PCA	Plate count agar
PMSF	Fenil metil sülfonil florit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TCA	Trikloroasetik asit
TEMED	N,N,N',N' – Tetrametilenetilendiamin
Tris	2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. Haloenzim'in yapısı.....	3
Şekil 2.2. Ekzopeptidazların polipeptid üzerindeki etki mekanizması.....	8
Şekil 2.3. Endopeptidazların polipeptid üzerindeki etki mekanizması.....	9
Şekil 2.4. Proteolitik enzimlerin kataliz reaksiyonu çeşidine göre sınıflandırılması.....	13
Şekil 2.5. Serin proteazın substrat üzerindeki katalitik etki.....	14
Şekil 2.6. Kimotripsin serin proteazının inhibisyon mekanizmasının şematik gösterimi.....	16
Şekil 2.7. Aspartik proteazın katalitik etki mekanizması.....	16
Şekil 2.8. Sistein proteazların katalitik etki mekanizması.....	18
Şekil 2.9. TLN metallo proteazının katalitik etki mekanizması.....	19
Şekil 2.10. Hayvansal kaynaklı proteazların dağılımı.....	22
Şekil 2.11. Mikrobiyal proteazların dağılımı.....	25
Şekil 2.12. Dünya çapındaki endüstriyel enzim satışlarının yüzdesel dağılımı..	28
Şekil 4.1. MT01 mikroorganizmasının proteolitik aktivitesi sonucu oluşan şeffaf zon.....	64
Şekil 4.2. MT01 mikroorganizmasının ışık mikroskobu görüntüsü.....	65
Şekil 4.3. 27F primeri ile elde edilen 16s rRNA dizi analizi kromotogramı.....	66
Şekil 4.4. 1492R primeri ile elde edilen 16s rRNA dizi analizi kromotogramı.	67
Şekil 4.5. 16s rRNA dizi analizi sonucu elde edilen nükleotid dizisi.....	68
Şekil 4.6. MT01 izolatının soy ağacı.....	69
Şekil 4.7. ...Bacillus MT01 mikroorganizmasına ait büyüme eğrisi.....	69
Şekil 4.8. Tirozin standart eğrisi.....	70
Şekil 4.9. Optimum proteaz enzim üretiminin gerçekleştiği inkübasyon süresi.....	71
Şekil 4.10. Diyaliz sonrası elde edilen fraksiyonların spesifik aktiviteleri.....	72
Şekil 4.11. Kısmi olarak saflaştırılan enzim karışımının termal aktivitesi.....	73
Şekil 4.12. Kısmi olarak saflaştırılan enzim karışımının termal stabilitesi.....	74
Şekil 4.13. Kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzim karışımının pH profili.....	75
Şekil 4.14. Jel filtrasyon kromatografisi fraksiyonlarının 280 nm'deki absorbansları.....	76
Şekil 4.15. Jel filtrasyon kromatografisi fraksiyonlarının spesifik proteaz enzim aktiviteleri.....	77
Şekil 4.16. Frak A ve Frak B fraksiyonlarının birleştirme öncesi SDS-PAGE görüntüleri.....	77
Şekil 4.17. Frak A'ya ait 280 nm kromotogramı.....	78
Şekil 4.18. Frak A spesifik proteaz enzim aktivitesi kromotogramı.....	79
Şekil 4.19. Frak B'ye ait 280 nm kromotogramı.....	79
Şekil 4.20. SDS-PAGE jel görüntüsü.....	80
Şekil 4.21. BSA standart eğrisi.....	82
Şekil 4.22. Saf proteaz enziminin optimum sıcaklık değeri.....	82
Şekil 4.23. Saf proteaz enziminin termal stabilitesi.....	83
Şekil 4.24. Saf proteaz enziminin optimum pH aralığı.....	84
Şekil 4.25. Lineweaver Burke grafiği.....	89

## ÇİZELGE LİSTESİ

<b>Çizelge</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 2.1. Enzimlerin katalizledikleri reaksiyon tiplerine göre sınıflandırılması.....	4
Çizelge 2.2. Proteazların sınıflandırılması.....	6
Çizelge 2.3. Bazı alkalin proteaz üretici <i>Bacillus</i> spp. ....	26
Çizelge 2.4. Bakteriyal alkali proteazlar, kaynakları, endüstriyel uygulama alanları ve ticari olarak üretici firmaları.....	29
Çizelge 3.1. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması.....	48
Çizelge 3.2. Proteaz enziminin termal stabilitesinin belirlenmesi.....	52
Çizelge 3.3. Bradford yöntemi akım tablosu.....	55
Çizelge 3.4. Farklı konsantrasyonlarda BSA stok çözeltisi hazırlanması.....	56
Çizelge 3.5. Farklı molekül ağırlığına sahip proteinler için poliakrilamid konsantrasyonunun belirlenmesi.....	57
Çizelge 3.6. %12.5'lik alt (ayırıcı) jel için formülasyon.....	58
Çizelge 3.7. %4'lük üst (konsantratör) jel formülasyonu.....	58
Çizelge 3.8. Farklı konsantrasyonlara sahip substratların hazırlanması.....	62
Çizelge 4.1. Kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzim karışımının pH stabilitesi.....	75
Çizelge 4.2. Fraksiyon B'nin birleştirilen fraksiyonlarına ait spesifik aktivite değerleri.....	80
Çizelge 4.3. Elde edilen proteaz enzimine ait saflaştırma profili.....	81
Çizelge 4.4. İnhibitör/aktivatör ve metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri.....	85
Çizelge 4.5. Organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	86
Çizelge 4.6. Saf proteaz enzimi üzerine hidrojen peroksit ve yüzey aktif maddelerinin etkisi.....	86
Çizelge 4.7. Saf proteaz enziminin substrat spesifitesi.....	87
Çizelge 4.8. Farklı inkübasyon sürelerinin fibrinolitik aktiviteye etkisi.....	87
Çizelge 4.9. Lineweaver Burke grafiği için ham veriler.....	88

## 1. GİRİŞ

Enzimler birçok kimyasal reaksiyonu yerine getiren biyokatalistlerdir. Canlı organizmalarda oluşan tüm reaksiyonların uygun koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bu tepkimeleri düzenleyen bu biyokatalizörler; katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu (ribozimler) hariç olmak üzere genellikle protein ana yapıdaki özelleşmiş yapılardır. Enzimlerde diğer katalizörler gibi reaksiyon hızını artırarak katalizör özelliklerini gösterirler. Hücrelerde önemli metabolik görevlere sahip olan enzimler günümüzde artık çok daha farklı ve çeşitli amaçlar için kullanılmaktadırlar. Bu enzimler ticari ve teknik açıdan birçok kullanım alanı bulmaktadır ve özellikle proteaz enzimlerinin kullanım alanının çok yaygın olması bu enzime olan ilginin daha da artmasına neden olmaktadır.

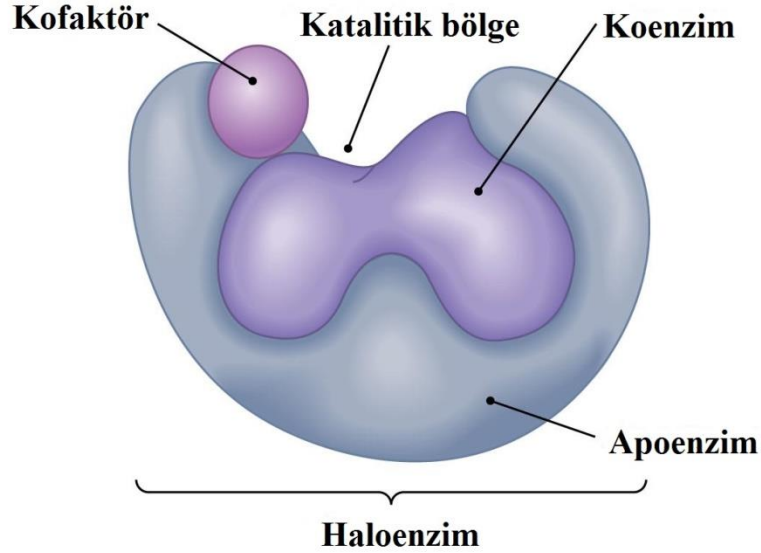
Mikrobiyal kaynaklı proteazlar üretim kolaylığı ve düşük maliyetli üretimi, süreklilik, in-vitro koşullarda aktif olması, alerjen ve toksik etkiye sahip olmaması gibi avantajlar nedeniyle bitkisel ve diğer proteaz kaynaklarına göre daha fazla ilgi görmektedirler. Bunun yanı sıra proteaz üretici kaynaklarının çokluğu ve buna bağlı olarak elde edilen proteazların spesifik özelliklerindeki farklılıklarda kullanım alanlarına uygun olarak diğer bir avantaj sağlamaktadır. Proteaz üretici kaynak olarak en çok tercih edilen tür *Bacillus* türleridir. Bu tür içerisinde ise en çok ilgi gören ve kullanılan türler *B. amyloliquifaciens*, *B. mojavensis*, *B. subtilis* ve *B. licheniformis*'tir. Bakteriyal proteazların popüler hale gelmesinin en büyük nedenlerinden biri uygulama alanlarının çok geniş olmasıdır. Deri işlenmesi, farmasötik, tekstil, gıda endüstrisi, evsel ve endüstriyel atıkların giderimi, biyoaktif peptid üretimi, gıda alerjenlerinin giderimi, kontakt lens temizliği, ipek işlenmesi gibi alanlar başta gelen uygulamalardır.

Geçmişte yapılan araştırmalar sonucu elde edilen verilere bakıldığında, enzimlerin özellikle de proteaz enzimlerinin oldukça büyük bir pazar payına sahip olduğu görülmektedir. Örnek olarak, 1994 yılında belirtilen rakamlara göre endüstriyel enzimlerin dünyadaki toplam market fiyatı yaklaşık olarak 400 Milyon Dolar olarak tespit edilmiştir. Japonya'da ise 1994 yılının yapılan araştırmaya göre alkalın proteaz satışı yaklaşık olarak 15 Milyar Yen (116 Milyon Dolar) olarak hesaplanmıştır.

Projenin ana hedefi, teknolojik ve biyoteknolojik açıdan öneme sahip proteaz enziminin, mikrobiyal kökenli olarak üretimini sağlamak, saflaştırmak ve karakterize etmektir. Çalışma kapsamında bahsi geçen hedefler gerçekleştirilmiştir ve bu bağlamda; proteaz enzim aktivitesine sahip *Bacillus* sp. türü bakteri saflaştırılmış ve bu bakteri ile proteaz enzimi üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen proteaz enzimi kısmi ve ileri saflaştırma teknikleri kullanılarak saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Karakterizasyon işlemleri ile enzimin inhibitör ve aktivatör maddelere olan duyarlılığı, optimum reaksiyon sıcaklığı ve pH isteği, termal stabilitesi ve pH stabilitesi, substrat spesifitesi, moleküler ağırlığı ve enzim kinetikleri belirlenerek gerçekleştirilmiştir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

Enzimler genellikle belirli madde/maddelere özgülük göstermektedirler. Enzimin protein yapısı etki edeceği maddeyi ve katalize edeceği reaksiyonun tipini belirlemektedir. Enzimlerin protein kısmına apoenzim adı verilir. Enzimlerin bazıları basit proteinden oluşmaktadır ve bunların katalitik aktivite gösteren kısmı proteinin polipeptid zinciridir. Çoğu enzim katalitik aktivitesi için proteinden başka metal iyonuna, protein olmayan inorganik bileşiklere, bazılarının ise her ikisine de ihtiyacı vardır. Bu iyon veya bileşiğe genel olarak kofaktör adı verilir. Proteinlerin inaktif halde bulunan proteinden ibaret ön maddesine Preenzim, Proenzim yada Zimojen adı verilmektedir. Organik bileşik enzimin protein kısmı ile birleşmiş ve ayrılmıyorsa prostetik grup, çok sıkı birleşmemiş ve ayrılabilirse koenzim adı verilir. Apoenzim enzimin spesifitesini sağlayan kısımdır. Koenzim ve apo enzimin birlikte oluşturduğu enzime haloenzim (aktif enzim) adı verilir. Şekil 2.1’de haloenzimin yapısı gösterilmiştir. Enzimin etki ettiği maddeye substrat, enzimatik reaksiyon sonucu oluşturduğu maddeye ise ürün adı verilmektedir (Yardımcı, 2014).



Şekil 2.1. Haloenzim'in yapısı (Anonim, 2015a)

Enzimler Uluslararası Biyokimya Derneği Enzim Komisyonu'na göre altı sınıfa ayrılmaktadır. Bu enzim grupları sırasıyla, Oksidoredüktazlar, Transferazlar,

Hidrolazalar, Liyazlar, İzomerazlar ve Ligazlar (Yardımcı, 2014) olmakla beraber katalizledikleri tepkimeleriyle birlikte Çizelge 2.1’de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Enzimlerin katalizledikleri reaksiyon tiplerine göre sınıflandırılması (Yardımcı, 2014)

<b>NO</b>	<b>SINIF</b>	<b>KATALİZLENEN RAKSİYON TİPİ</b>
1	Oksidoredüktazlar	Elektron transferi (hidrit iyonları ve H atomları ile birlikte)
2	Transferazlar	Grup-transfer tepkimeleri
3	Hidrolazlar	Hidroliz tepkimeleri (işlevsel grupların suya transferi)
4	Liyazlar	Çift bağlara grupların ilavesi ve grupların yer değiştirmesi ile çift bağların oluşması
5	İzomerazlar	İzomerik formları oluşturmak üzere moleküller içinde grupların transferi
6	Ligazlar	ATP’nin harcanması ile eşleşmiş kondensasyon tepkimeleriyle C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşması

Proteazlar (EC 3.4) genel olarak; proteinler arasındaki peptid bağlarının parçalanmasını sağlayan biyokatalizör olarak tanımlanabilirler ve bu enzimler, metabolizmada, gen ekspresyonunun regülasyonunda, patojenitede ve transportta büyük protein moleküllerinin küçük moleküllere hidrolizini sağlamaktadırlar (Tekin, 2008). Ayrıca proteaz enzimi, tüm canlı varlıklarda bulunan, büyüme ve çoğalma için gerekli olan bir enzimdir. Proteinlerin hidrolizinde spesifik olarak rol oynayan bu enzimler, fizyolojik ve ticari açıdan oldukça önemli enzimlerdendir ( Bulut, 2007). Metabolizmada elzem olan proteazlar; tüm proteinlerin sentezini, büyüklüğünü ve kompozisyonlarını, biçimlerini ve en son yok edilmeleri için gerekli olan bir süreçte uzun amino asit zincirlerini parçalarına ayırırlar. Bir fizyolojik regülatör olan proteazlar gebeliğin

başlaması, doğum, sindirim, büyüme ve gelişme, yaşlılık ve apoptozis gibi olaylarda baş rol oynarlar (Sarı, 2011).

Proteazlar, mikroorganizmalar tarafından hücre içi (intraselüler) ve hücre dışı (ekstraselüler) olarak sentezlenirler. Hücre içi proteazlar sporulasyon, farklılaşma, enzimlerin ve hormonların olgunlaşması, protein katlanması gibi hücresel ve metabolik olaylarda görev yapmaktadır. Hücre dışı proteazların hücre dışı koşullarda hidrolitik ürünlerin hücre içine alınmasına imkan sağlamak gibi rolleri vardır. Aynı zamanda protein parçalanmasını temel alan birçok ticari alanda da kullanılmaktadır (Tekin, 2008).

## 2.1. Proteazlar ve Sınıflandırılması

'IUBMB' (The International Union of Biochemistry and Molecular)'ye göre proteazlar hidrolazlar olarak adlandırılan 3. grubun 4. alt grubunda sınıflandırılmıştır.

- ✓ EC 3 (Hidrolazlar)
- ✓ EC 3.4 (Proteazlar)

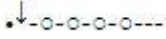
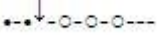
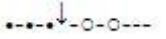
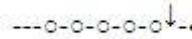
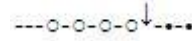

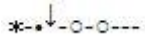
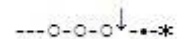

Ancak proteazlar çok geniş etki mekanizmaları ve yapısal çeşitlilikleri nedeni ile genel enzim adlandırma sisteminde diğer enzim sınıfları gibi sınıflandırılmamaktadır. Şu ana kadar proteazlar üç ana kritere göre sınıflandırılmıştır;

- ✓ Katalizledikleri reaksiyon tipi,
- ✓ Katalitik bölgenin kimyasal yapısı,
- ✓ Yapılarıyla ilgili evrimsel ilişki (Tekin, 2008).

Etki şekli ve yapısal çeşitlilikleri nedeni ile proteazların karakterizasyonu oldukça zordur. Bu nedenle Ken McDonal (1985), tüm proteolitik enzimlerin sınıflandırılması ve adlandırılması için, peptidaz (peptid bağlarını hidrolize ederler) ve proteaz olmak üzere iki terim belirleyerek terminolojideki sorunları büyük ölçüde çözüme kavuşturmuşlardır.

Yeni moleküler biyoloji tekniklerinin artmasıyla katalitik ve aktif merkezlerinin üç boyutlu yapısı, etki mekanizmaları ve üç boyutlu yapılarındaki evrimsel ilişkilerine göre proteazlar familyalar halinde gruplanmışlardır. Etki ettikleri peptit bağının konumuna göre ekzo- ve endoproteazlar olarak ikiye ayrılan proteazlardan endoproteazlar aktif bölgelerindeki fonksiyonel grupların özellikleri ve katalitik mekanizmaları temel alındığında serin proteazlar, aspartik proteazlar, sistein/tiol proteazlar ve metalloproteazlar olmak üzere dört gruba ayrılmaktadırlar. Ekzoproteazlar da aminopeptidaz ve karboksipeptidaz olmak üzere şeklinde gruplandırılmaktadır. Endoproteazların bu dört grubu canlı organizmalarda belirlenmiş ve bunlardan serin proteazlar, sistein proteazlar ile metalloproteazlar bakterilerden izole edilerek saflaştırılmışlardır (Alpan, 2011; Tekin, 2008; Turus, 2011). Buna göre, bazı proteazların sınıflandırması Çizelge 2.2’de aşağıdaki gibi verilmiştir.

**Çizelge 2.2.** Proteazların sınıflandırılması (Rao ve ark., 1998)

<b>Proteaz</b>	<b>Etki Şekli</b>	<b>E.C Kodu</b>
<b>Ekzopeptidaz</b>		
<b>Aminopeptidaz</b>		3.4.11
Dipeptidil peptidaz		3.4.14
Tripeptidil peptidaz		3.4.14
<b>Karboksipeptidaz</b>		3.4.16-3.4.18
Serin proteaz		3.4.16
Metalloproteaz		3.4.17
Sistein dipeptidaz		3.4.18
Peptidil dipeptidaz		3.4.15
Dipeptidaz		3.4.13
<b>Omega peptidaz</b>		3.4.19
		3.4.19
<b>Endopeptidaz</b>		3.4.21-3.4.34
Serin proteaz		3.4.21

**Çizelge 2.2.** Proteazların sınıflandırılması (Rao ve ark., 1998) (Devam)

---

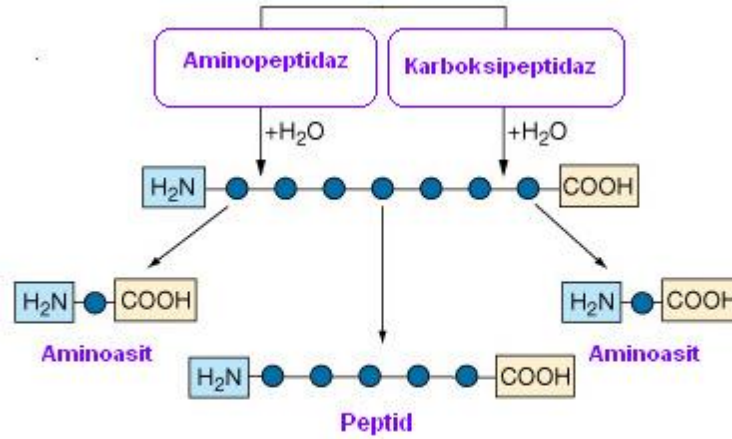
Sistein proteaz	3.4.22
Aspartik proteaz	3.4.23
Metalloproteaz	3.4.24
Endopeptidaz (Katalitik Mekanizması Bilinmeyen)	3.4.99

---

Standart sınıflandırmaya uymayan az sayıda farklı proteazlar da bulunmaktadır. Örneğin ATP-bağımlı proteazlar aktivite gösterebilmek için ATP'ye ihtiyaç duymaktadır. Amino asit sekansları temel alındığında proteazlar dört familyada sınıflandırılır ve evrensel ataları olan peptidazlara göre familyalar klan olarak adlandırılan alt gruplara ayrılır. Her peptidaz ailesi katalizlediği reaksiyonu simgeleyen kod harfine sahiptir. Örneğin 'S' serin proteazlar, 'C' sistein proteazlar, 'A' aspartik proteazlar, 'M' metalloproteazlar ve 'U' bilinmeyen tip proteazı simgelemektedir (Tekin, 2008).

### **2.1.1. Ekzopeptidazlar**

Ekzopeptidazlar polipeptid zincirinin uç kısımlarına etki ederek aktivitesini göstermektedirler. Etki ettiği N ve C ucuna göre sırasıyla amino ve karboksi peptidaz olarak sınıflandırılmaktadır (Rao ve ark., 1998). Enzim komisyonu listesinde 74 adet ekzopeptidaz yer almaktadır. Aminopeptidazlar AP ve karboksipeptidazlar CP olarak gösterilebilmektedir (Sarı, 2011). Ekzopeptidazların etki mekanizması genel olarak Şekil 2.2'de şematize edilmiştir.



**Şekil 2.2.** Ekzopeptidazların polipeptid üzerindeki etki mekanizması (Sevinç, 2010)

Aminopeptidazlar polipeptid zincirinin serbest amino ucunda (N-terminal) bulunan amino asitleri, tek bir amino asit, dipeptid yada tripeptid olarak polipeptidten ayrılmasını katalizlerler ve bu etki mekanizmasına göre de aminopeptidaz, dipeptidil peptidaz ve tripeptidil peptidaz şeklinde isimlendirilebilmektedir. Ekzopeptidazların o bölgedeki aktivitesini, polipeptid uçlar üzerinde bulunan spesifik amino asitler, hidrolizi sağlanacak olan peptid bağının yakınında bulunan amino asit rezidüleri, peptid uzunluğu ve polipeptid zincirinin konformasyonu olumlu/olumsuz yönde etkilemektedir. Aminopeptidazlar genellikle intraselüler enzimlerdir, bakteri ve funguslardaki aminopeptidazların substrat spesifikliği oldukça farklılık gösterir. Amino peptidazlar aktif bölgelerinin spesifik proteaz inhibitörlerine göre metallo amino peptidaz, sistein amino peptidaz ve serin amino peptidaz şeklinde üç gruba ayrılırlar (Rao ve ark., 1998; Tekin, 2008; Sarı, 2011).

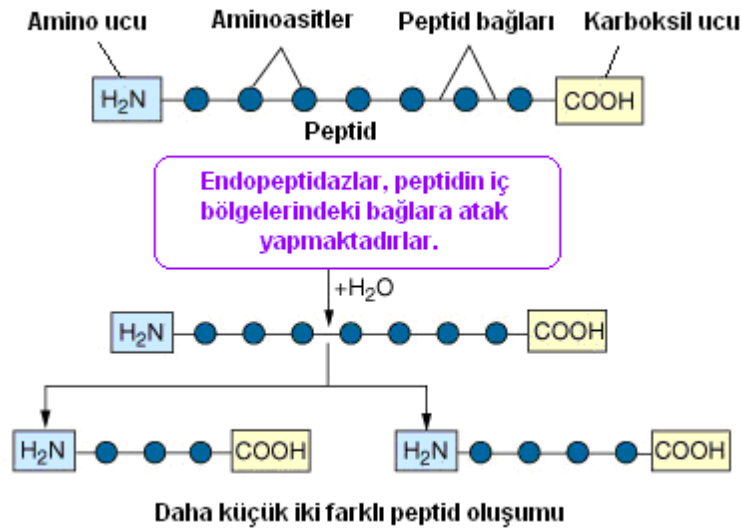
Karboksipeptidazlar polipeptid zincirinin serbest karboksil ucuna (C-terminal) etki ederek bir amino asit yada dipeptidin polipeptidten ayrılmasını katalizlerler. Karboksipeptidazlar enzimin aktif bölgesinde bulunan amino asit redizüsüne göre; serin karboksipeptidaz, metallo karboksipeptidaz ve sistein karboksipeptidaz şeklinde üç ana gruba ayrılırlar. Serin karboksipeptidazlar ve aminopeptidazlar aktif bölgelerinde Ser, Asp ve His amino asitlerinden oluşan katalitik bir üçlü içermektedirler. Metallo karboksipeptidaz ve Aminopeptidazlar ise aktif bölgelerinde kofaktör olarak sıkıca bağlı bir çinko atomu içermektedir. Karboksipeptidazlar aktivite göstermek için C-terminalde

bir  $\alpha$ -karboksi grubuna ihtiyaç duyarlar ve spesifikliği C-terminalde yer alan amino asitler tarafından belirlenmektedir (Rao ve ark., 1998; 2008; Sarı, 2011).

Aminopeptidaz ve karboksipeptidazların dışında tanımlanmış bir ekzopeptidaz daha vardır. Bu proteaz, prostetik gruba bağlı amino asitlerin karboksil veya amino uçlarındaki peptid bağlarının hidrolizini sağlayan omegapeptidaz olarak adlandırılmaktadır (Alphan, 2008).

### 2.1.2. Endopeptidazlar

Endopeptidazlar ekzopeptidazların aksine polipeptid zincirinin N ve C ucundan uzakta veya polipeptid zincirinin iç bölgesinde yer alan peptid bağlarına etkilerine göre karakterize edilmektedirler. Ortamda serbest amino ve karboksil gruplarının bulunması enzim aktivitesini olumsuz yönde etkilemektedir (Alpan, 2008; Tekin, 2008). Endopeptidazlar katalitik mekanizmalarına göre 4 gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar, serin proteazlar (EC 3.4.21), aspartat proteazlar (EC 3.4.23), sistein proteazlar (EC 3.4.22) ve metallo proteazlar (3.4.24) olmak üzere dört gruba ayrılmışlardır (Rao ve ark., 1996; Alpan, 2008). Ayrıca katalitik mekanizmayı bilinmeyen endopeptidaz tanımlanmış ve EC 3.4.99 numarası ile kodlanmıştır (Sevinç, 2010). Endopeptidazların etki mekanizması genel olarak Şekil 2.3'te Şematize edilmiştir.



Şekil 2.3. Endopeptidazların polipeptid üzerindeki etki mekanizması (Sevinç, 2010)

Bunlara ek olarak tanımlanmış Treonin proteaz ve Glutamik proteaz da literatürde yer almaktadır. Toplamda tanımlanmış 1238 proteaz dizisi bulunmakla beraber bu dizinin; 79'u aspartik, 237'si sistein, 3'ü glutamik, 421'i metallo, 31'i treonin ve 467'si serin proteazdan oluşmaktadır (Sarı, 2011).

#### **2.1.2.1. Serin proteazlar (EC 3.4.21)**

Serin proteazlar üzerinde en fazla çalışma yapılmış enzimlerdendir. Serin proteazlar ismini aktif bölgesinde bulunan nükleofilik serin grubundan almaktadırlar (Sarı, 2011). Yapısal benzerliklerine göre 20 familyaya ayrılan serin proteazlar evrensel atalarıyla birlikte 6 klanı ayrılmaktadırlar. Ayrıca serin proteazlar; 3,4-cis-kloroizokumarin (3.4-DCI), L-3-karboksitrans 2,3-epoksipropil-löklamid (4-guanidin), butane (E.64), fenilmetilsulfonil florid (PMSF) ve tosil-L-lizin klorometil keton (TLCK) ile geri dönüşümsüz olarak inhibe olmaları nedeniyle karakterize edilmektedirler ve bazı serin proteazlar istisna olarak aktif bölgele yakınlarında sistein kökü içermesi sebebiyle *p*-kloromercuribenzoat (PCMB) tiol reaktanı ile inhibe edilerek karakterize edilmektedirler (Tekin, 2008). Serin proteazlar genellikle nötral ve alkali pH'larda aktiftirler ve optimum pH aralığı 7-11 arasındadır. Serin proteazlar esterolitik ve amidaz aktivitelere de sahip olmakla birlik geniş bir substrat spesifitesine sahiptirler. Moleküler ağırlıkları 18 ile 35 kDa arasında değişmektedir. Ancak *Blakeslea trispora*'dan elde edilen serin proteazın moleküler ağırlığının 126 kDa olduğu bildirilmiştir. Serin proteazların izoelektrik noktaları genellikle 4-6 arasındadır (Rao ve ark., 1998). Bilinen en önemli serin proteazlar; triptaz, lipaz, elastaz, k, motripsin, tripsin, trombin ve fosfolipazdır (Sevinç, 2010). Serin alkelen proteazlar ve subtilisinler serin proteazların iki büyük önemli grubunu oluşturmaktadır (Deshpande ve ark., 1998).

##### **2.1.2.1.1. Serin alkelen proteazlar**

Serin alkelen proteazlar çeşitli bakteri, küf maya ve funguslar tarafından üretilmektedirler. DFP yada bir patates proteaz inhibitörü ile inhibe edilmektedirler ancak tosil-L-fenilalanin klorometil keton (TPCK) yada TLCK ile inhibe olmazlar. Karboksil bölgesinde tirozin, fenilalanin ve lösin amino asitleri bulunan peptid bağlarını

hidroliz ederler. Optimum aktivite gösterdiği pH 10, izoelektrik noktaları ise 9 civarındadır. Moleküler ağırlıkları 15 ile 30 kDa aralığındadır (Rao ve ark., 1998).

#### **2.1.2.1.2. Subtilisinler**

Subtilisin Carlsberg ve subtilisin Novo (bakteriyal proteaz Nagase) olmak üzere iki farklı tip subtilisin belirlenmiştir. Her iki subtilisininde moleküler ağırlığı 27.5 kDa'dur ancak amino asit sekanslarında 58 amino asitlik bir fark bulunması ile birbirinden ayrılmaktadırlar. Her iki enzimde benzer substrat spesifitesi göstermektedir ve optimum reaksiyon sıcaklıkları 60 °C ve optimum pH istekleri 10'dur. Her iki enziminde aktif bölgelerini Ser221-His64-Asp32 oluşturmaktadır. Carlsberg enziminin substrat spesifitesi diğerine göre daha geniş olmakla birlikte stabilitesi Ca<sup>+2</sup> iyonlarına bağımlı değildir (Tekin, 2008).

#### **2.1.2.2. Aspartik proteazlar (EC 3.4.23)**

Aspartik proteazlar asit proteazlar olarak da bilinmektedirler. Katalitik aktivitelerini aspartik asit rezidüleri üzerine gösteren endopeptidazlardır. Bu enzimler asidik (ya da bazen nötral) pH'larda aktivite gösterirler ve hepsi aktif bölgelerinde iki aspartik asit rezidüsü bulundurur. Aspartik proteazlar; sindirim (pepsin ve kimozin), lizozomal protein hidrolizi (katepsin D ve E) ve kan basıncının düzenlenmesini (renin, anjiyotesinin üretiminde görev alan bir proteazdır; anjiyotesinin düz kasların kasılmasını uyaran ve tuz-sıvı atımını azaltan bir hormondur) içeren çeşitli fonksiyonları yürütürler (Sarı, 2011). Asidik proteazlar 3 familya içerisinde gruplandırılmıştır. Bunlar; pepsin (A1), retropepsin (A2) ve pararetrovirüslerden elde edilen enzimler (A3) şeklinde tanımlanmıştır. A1 ve A2 familyaları birbirlerine akrabalık göstermektedirler ancak A3 familyası bu familyalardan oldukça farklıdır. Çoğu aspartik proteaz düşük pH (pH 3-4)'larda maksimum aktivite göstermektedir ve izoelektrik noktaları pH 3-4.5 arasında değişmektedir. Moleküler ağırlıkları ise 30 ile 45 kDa arasında değişmektedir. Aspartik proteazlar bakır iyonları varlığında diazoasetil-DL-norlösin metil ester (DAN) ve 1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan gibi diazoketon bileşiklerine karşı hassastırlar. Mikrobiyal aspartik proteazlar genel olarak iki grup

içinde ayrılmıştır. Birincisi; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Neurospora*'dan elde edilen pepsin benzeri enzimlerdir. İkinci grup ise *Endothia* ve *Mucor* spp.'den elde edilen rennin benzeri enzimlerdir (Rao ve ark., 1998).

#### **2.1.2.3. Sistein/Tiyol proteazlar (EC 3.4.22)**

Sistein proteazlar (EC.3.4.22) hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunmaktadır ve yaklaşık 20 familyası belirlenmiştir. Bütün sistein proteazların katalitik aktivitesi sistein ve histidin amino asitlerini içeren katalitik diyadlar üzerindedir. Familyalar arasındaki farklılığı Cys-His veya His-Cys sırası oluşturmaktadır. Sistein proteazlar genellikle HCN ve Sistein varlığında aktivite göstermektedirler (Tekin, 2008). Moleküler ağırlığı 21-30 kDa arasında olup, peptid, amid, ester, tiyol ester ve tiyonu ester bağlarının hidrolizini katalizlemektedirler. Sistein proteazlar 5 grup içinde bölünmüşlerdir. Bunlar; CA (papain benzeri enzimler), CB (viral kimotripsin benzeri CPs), CC (RNA virüslerinin papain benzeri endopeptidazları), CD (legumain tipi kaspazlar) ve CE (katalitik bölgede His, Glu/Asp, Gln, Cys rezidüleri içerenler) şeklinde isimlendirilmiştir. Sistein proteazların çoğu E64, sistinler ve bir çok sentetik inhibitör tarafından inhibe edilmektedirler (Grzonka ve ark., 2007).

#### **2.1.2.4. Metalloproteazlar (EC 3.4.24)**

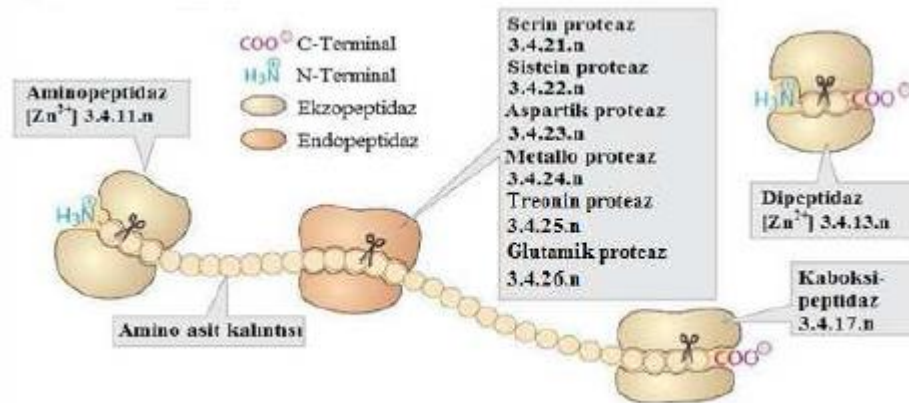
Metalloproteazlar (metallopeptidaz/metalloproteinaz), iki değerlikli metal iyonları kompleksleri tarafından aktifleştirilmiş bir su molekülünün atağı ile peptid bağlarını parçalayan geniş bir hidrolaz sınıfını temsil etmektedir. Metalloproteazların çoğu katalitik çinko iyonları tarafından karakterize edilmektedir. Ancak bazı enzimlerde bu fonksiyon manganez, kobalt, nikel veya bakır iyonları tarafından yürütülmektedir. Bazı metalloproteazlarda ise iki metal iyonu katalitik olarak birlikte hareket eder (Sarı, 2011). Metalloproteazların 30 familyası tanımlanmıştır ve bu familya; 17 tane endopeptidaz, 12 tane ekzopeptidaz ve 1 tane de (M3) hem endo hem de ekzopeptidazdan oluşmaktadır. Metalloproteazlar aynı zamanda 4 farklı grupta incelenmektedir. Bunlar nötral, alkalın, *Myxobacter* I ve *Myxobacter* II şeklindedir. Alkalın proteazlar geniş bir substrat spesifitesi gösterirken nötral proteazlar hidrofobik

amino asitler üzerinde spesifite göstermektedir. *Myxobacter* I proteaz ayrılacak bağın her iki tarafındaki küçük amino asit rezidüleri için spesifite gösterirken *Myxobacter* II peptid bağının amino bölgesi üzerindeki lisin rezidülerine spesifite gösterir. EDTA gibi şelatlayıcı ajanlar ile tüm metallo proteazlar inhibe olur ancak DFP yada sülfidril ajanları ile inhibe olmazlar (Rao ve ark., 1998).

*Pseudomonas aeruginosa* ve *Serratia* spp. tarafından üretilen alkalın metalloproteazlar pH 7-9 aralığında aktivite gösterirler ve moleküler ağırlıkları 45 ile 60 kDa arasında değişiklik göstermektedir. *Myxobacter* I proteazın optimum pH'sı 9'dur ve moleküler ağırlığı 14 kDa'dur. *Arthrobacter crystallopoites*'in hücre duvarlarını lize edebilirler ancak *Myxobacter* II proteaz bakteriyal hücreleri lize edemezler (Rao ve ark. 1998).

### 2.3. Proteazların Katalitik Etki Mekanizmaları

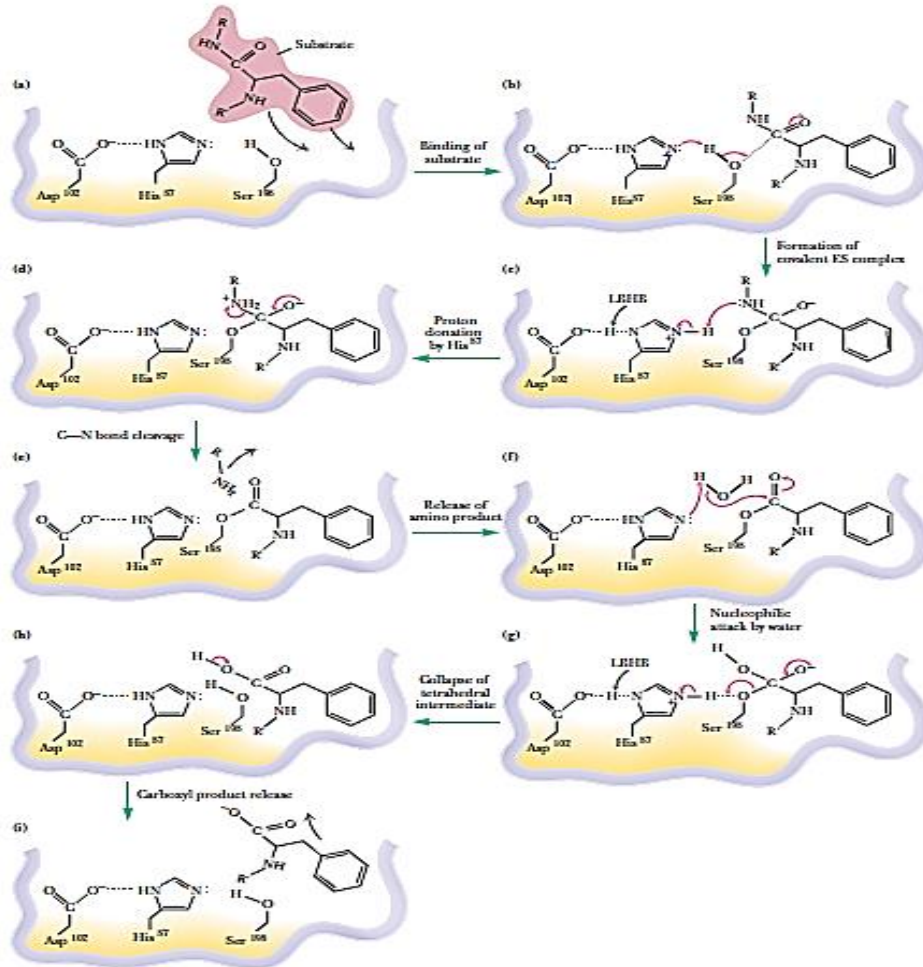
Proteazlar, çeşitlerine göre farklı yollarla hidroliz işlemleri gerçekleştirmektedirler. Aslında bütün peptidazlar aynı reaksiyonu katalizlerler ancak substrattaki peptid bağının konumu, kesilecek olan bağın yakınındaki amino asit rezidüleri ve substratın bilinmeyen karakteristik özellikleri için seçicidir. Aspartik proteazlar hidroliz işlemini genel asit-baz mekanizması ile gerçekleştirirler ve su tepkimeye direkt olarak katılır. Sistein proteazlar ise aktivitesini açılasyon ve deaçılasyon mekanizmaları ile gösterirler (Sevinç, 2010; Sarı, 2011). Şekil 2.4'te proteolitik enzimlerin kataliz reaksiyonu çeşidine göre sınıflandırılması şematize edilmiştir.



Şekil 2.4. Proteolitik enzimlerin kataliz reaksiyonu çeşidine göre sınıflandırılması (Sarı, 2011).

### 2.3.1. Serin proteazın katalitik etki mekanizması

Serin proteazlar hidroliz için genellikle iki adımlı bir reaksiyon takip ederler ve bu adımlar, enzim ve peptidin kovalent olarak bağlanması ve amino asit yada peptid fragmentlerinin kaybolması şeklindedir. Bu asetilasyon adımını, su tarafından aryarık üzerine yapılan bir nükleofilik atak ile oluşan deasetilasyon işlemi takip eder ve bu olay peptid hidrolizi ile sonuçlanır. Serin Endopeptidazlar primer substrat tercihlerine göre üç gruba ayrılmışlardır. Bunlar; tripsin benzeri (pozitif yüklü rezidülerden sonra ayıran) serin proteaz, kimotripsin benzeri (büyük hidrofobik rezidülerden sonra ayıran) serin proteaz ve elastaz benzeri (küçük hidrofobik rezidülerden sonra ayıran) serin proteazlar şeklindedir (Rao ve ark., 1998). Serin proteazın substrat üzerindeki katalitik etki mekanizması Şekil 2.5'te şematize edilmiştir.

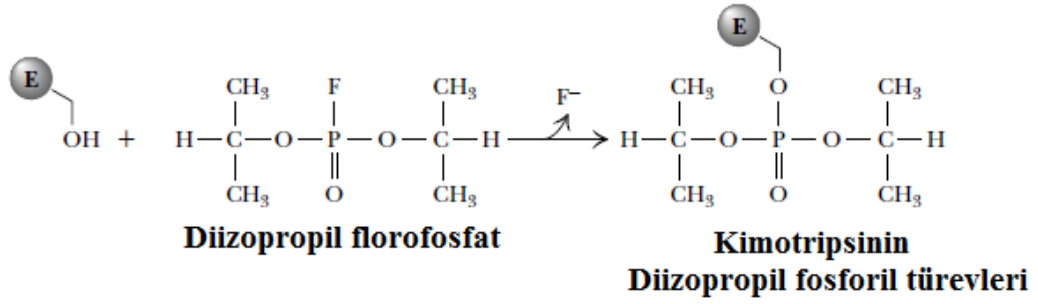


Şekil 2.5. Serin proteazın substrat üzerindeki katalitik etki mekanizması (Garrett ve Grisham, 2010)

Yukarıda şematize edilen kimotripsin serin proteazının katalitik etki mekanizması şu şekilde işlemektedir;

- a) Peptid substratının omurgası bitişik katalitik üçlüye bağlanır, spesifik yan zincir ise boşluğa yerleşir. Asp 102, His 57'nin katalitik üçlüdeki pozisyonunu bir hidrojen bağı ile sabitler.
- b) Reaksiyonun ilk basamağında His 57; parçalanacak olan peptid bağının karbonil karbonuna Ser 195'in nükleofilik bir atak yapmasını kolaylaştırmak için, Ser 195'ten bir proton kopararak genel bir baz gibi davranır. Sonuç olarak kovalent enzim-substrat kompleksi oluşur.
- c) Bu adımda, His 57'den peptidin amid azotuna bir proton salınmasıyla kovalent bağlı protonlanmış bir amin oluşturulur (tetrahedral ara ürün)
- d) Oluşan tetrahedral ara ürün, sonradan gelen bağın kırılmasını ve amin ürününün ayrılmasını kolaylaştırır. Peptid oksijeni üzerindeki negatif yük kararsızdır ve bu yüzden tetrahedral yapı ara ürünü kısa ömürlüdür.
- e) Bu aşamada amin ürününün ayrılması gerçekleşir. Amin ürününün ayrılması ile tetrahedral ara ürün hızla bozular. Oluşan açıl enzim ara ürün ise oldukça kararludur.
- f) Peptid substratının karbonil karbonuna suyun nükleofilik saldırıda bulunması üzerine başka bir geçici tetrahedral ara ürün oluşur ve bu adımda His 57 genel bir baz gibi davranarak saldırıyı yapan su molekülünden bir proton koparır.
- g) His 57'den serin oksijenine sudan alınan protonun verilmesi sonucu tetrahedral ara ürün parçalanmasına yardımcı olunur.
- h) Karboksil grubunun protondan arındırılması ve aktif bölgeden ayrılması ile reaksiyon tamamlanmış olur ve şekil "ı" da gösterilen yapı açığa çıkar (Sarı, 2011).

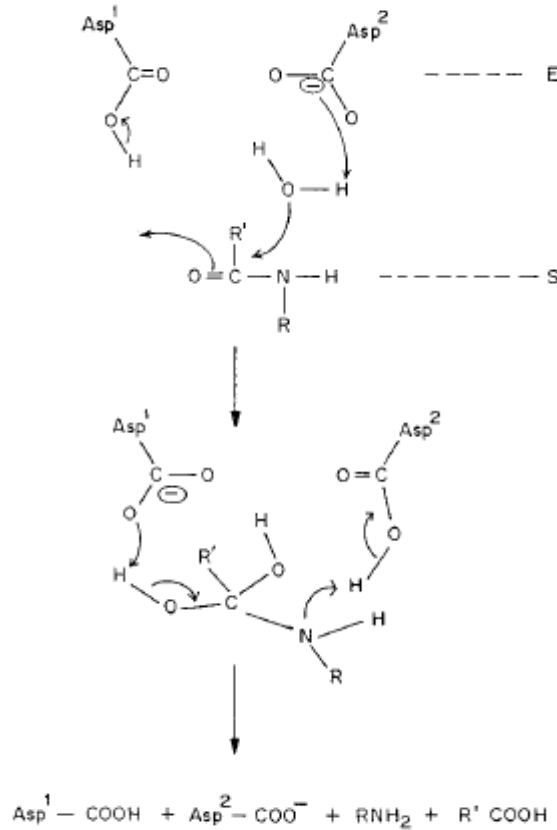
Serin proteazların inhibisyon mekanizması ise Şekil 2.6'da şematize edildiği gibidir. Serin proteazlar diizopropil florofosfat gibi organik fosfatlar tarafından inhibe edilmektedir. DIFP; kimotripsinde ve diğer serin proteazlarda bulunan Ser 195 gibi aktif bölgede bulunan serin rezidüleri ile bir DIP-enzim yapısını oluşturmak için hızla reaksiyona girer. Oluşan kovalent enzim-inhibitör kompleksi oldukça kararludur ve böylece kimotripsin DIFP ile geri dönüşümsüz şekilde inhibe olur (Sarı, 2011).



**Şekil 2.6.** Kimotripsin serin proteazının inhibisyon mekanizmasının şematik gösterimi (Sarı, 2011)

### 2.3.2. Aspartik proteazların katalitik etki mekanizması

Aspartik Endopeptidazlar katalitik aktiviteleri için aspartik asit rezidülerine ihtiyaç duyarlar. Penicillopepsin ve endothiapepsin gibi aspartik proteazlar ile proteinlerin hidrolizi için genel bir baz katalitik mekanizması önerilmektedir (Rao ve ark., 1998). Aspartik proteazların katalitik etki mekanizması Şekil 2.7’de şematize edilmiştir.



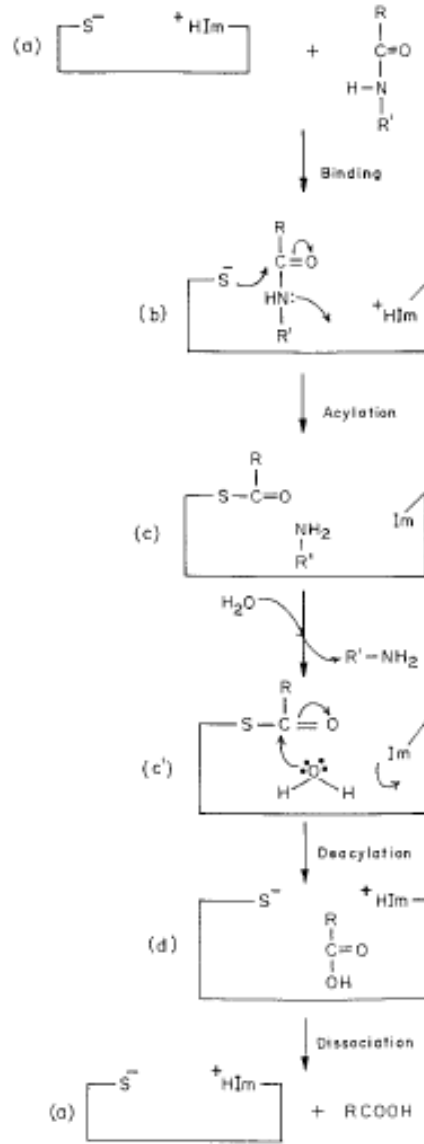
**Şekil 2.7.** Aspartik proteazın katalitik etki mekanizması (Rao ve ark., 1998)

Yukarıda verilen katalitik mekanizmadaki reaksiyonun ilerleyişi şu şekildedir;

- ✓ Substratın bağlanmasından sonra suyun substratın karbonil karbonuna yaptığı nükleofilik saldırı, iki protonun tek adımda transferini kolaylaştırmaktadır. Mekanizmadan da görüldüğü gibi Asp<sup>2</sup> aktif bölgedeki su molekülünden bir protonu alarak genel bir baz gibi davranmıştır. Asp<sup>1</sup> ise peptidin karbonil grubunun oksijenine bir proton vererek genel bir asit gibi davranır. Bu iki proton transferi sayesinde; nükleofilik saldırı aktif bölgede net hidroksit iyonu oluşmadan ortaya çıkar. Sonuçta amid hidrat ara ürünü ortaya çıkar ve serbest enzimin protonasyon bölgelerinde karşılıklı iki aspartat rezidüsü oluşur.
- ✓ Amid dihidratın ayrılması, oluşum mekanizması ile benzer bir şekilde gerçekleşmektedir. İyonize aspartatın (Asp<sup>2</sup>) karboksili amid dihidratın hidroksil grubundan bir proton alarak genel bir baz gibi davranırken, diğer protonlanmış aspartatın (Asp<sup>1</sup>) karboksili eş zamanlı olarak ayrılan peptid ürününün azor atomuna bir proton vererek genel bir asit gibi davranır (Sarı, 2011).

### **2.3.3. Sistein proteazın katalitik etki mekanizması**

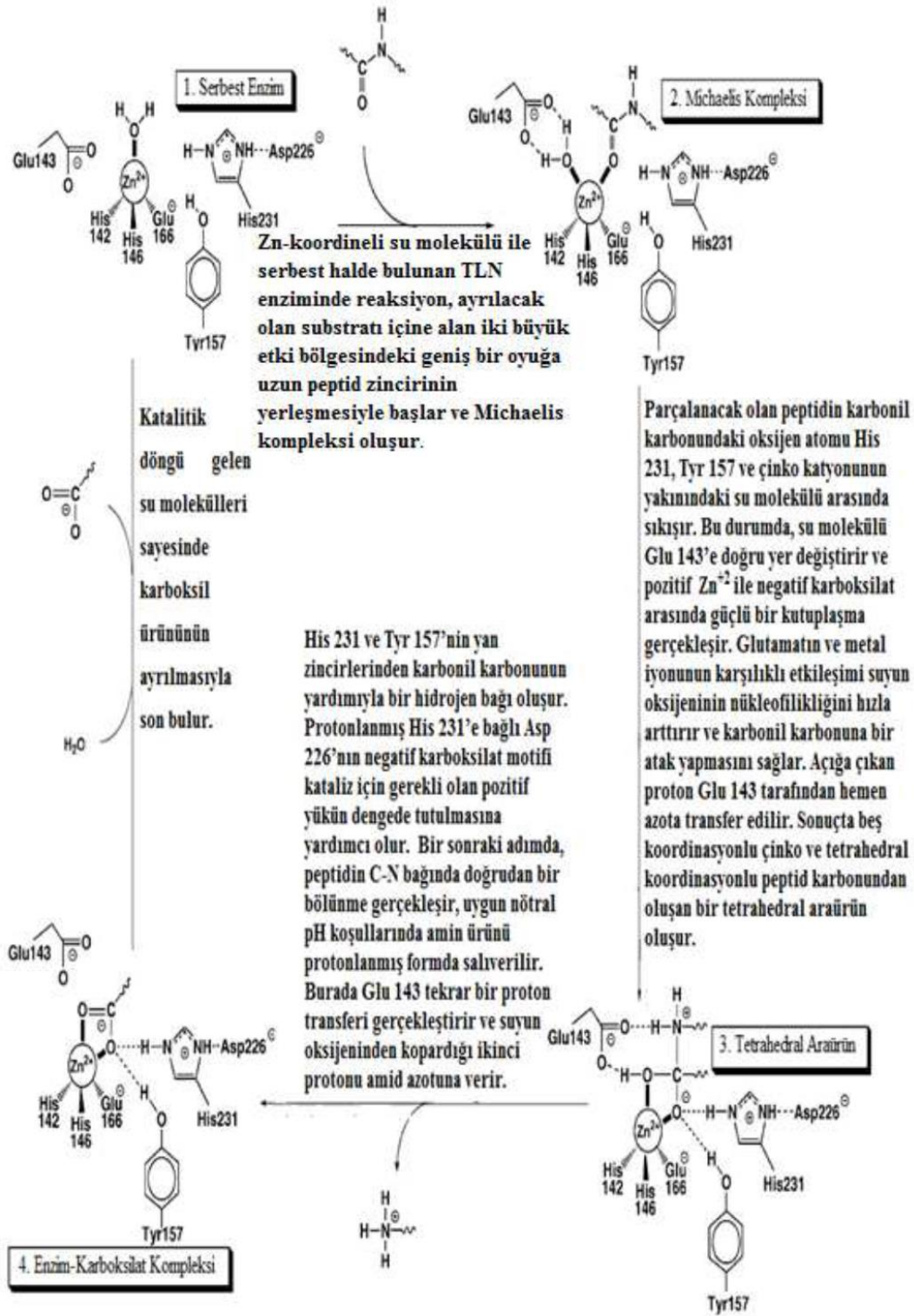
Sistein proteazların katalitik etki mekanizması serin proteazlarınkine oldukça benzerdir. Bitkisel proteaz olan papainin katalitik etki mekanizması sistein proteazların etki mekanizmasını anlatmak açısından oldukça güzel bir örnektir (Rao ve ark., 1998). Şekil 2.8'de sistein proteazların katalitik etki mekanizması şematize edilmiştir.



**Şekil 2.8.** Sistein proteazların katalitik etki mekanizması (Rao ve ark., 1998) (Im ve  $^+\text{HIm}$  sırasıyla imidazol ve protonlanmış imidazol'ü temsil etmektedir)

### 2.3.4. Metallo proteazın katalitik etki mekanizması

Metallo proteazların aktivitesi ortamda bulunan divalent katyonlara bağlıdır ve ortama şelatlayıcı ajanların eklenmesi ile inhibe olabilmektedirler (Rao ve ark., 1998). Şekil 2.9'da TLN metallo proteazının katalitik etki mekanizması şematize edilmiştir.



Şekil 2.9. TLN metallo proteazının katalitik etki mekanizması (Sarı, 2011)

## **2.4. Proteaz Kaynakları**

Proteazlar doğada en yaygın bulunan enzimler gruplarından birini oluşturmaktadır. Bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi canlı gruplarında geniş çeşitlilik göstermektedirler. Bitki orijinli proteazların elde edilmesi zaman gerektiren bir işlem olması ve çevresel-fiziksel koşullar ile olumsuz yönlendirilebilen bir materyal olması nedeniyle bitkisel kökenli proteazların kullanımı bu faktörlere göre değişmektedir. (Tekin, 2008). Sistein proteazlar bitkilerde çok miktarda bulunmaktadır. Mikrobiyal organizmalar büyük miktarlarda serin ve aspartik proteaz üretme yeteneklerine sahiptirler (Sarı, 2011).

Mikrobiyal enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanımına bakıldığında, alkali proteaz %25, diğer proteazlar %21, Amilaz %18, Renin %10, Tripsin %3, Lipaz %3, diğer karbonhidrat parçalayan enzimler (selülaz ve ksilanaz gibi) %10, analitik ve farmasötik enzimler %10 şeklinde bir dağılım göstermektedir (Turus, 2011). Endüstriyel alanda kullanılan enzimler bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kökenli olmakla birlikte ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan izole edilmektedirler. Bunun nedeni, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve daha ucuz olmaları, büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta elde edilmeleri ve ekstrem koşullarda aktivite göstermeleridir. Örneğin mikrobiyal enzimler yüksek ve düşük sıcaklık ve pH değerlerinde aktivite gösterirler (Horikoshi, 1999).

### **2.4.1. Bitkisel proteazlar**

Bitkilerdeki proteazlar bitkilerin hemen hemen her yerinde bulunabilmektedir. Örneğin; kök, gövde, yaprak, çiçek, meyve, tohum, lateks vb kısımlar başta gelen kısımlardır. Bitki latekslerinin zengin bir proteaz kaynağı olduğu bilinmektedir. Proteaz kaynağı olarak bitkilerin kullanımı, gelişim için iklimatik koşulların elverişliliği ve kültivasyon için toprağın kullanılabilirliği gibi çeşitli faktörler tarafından yönlendirilmektedir. Ancak bitkilerden proteaz üretimi zaman gerektiren bir işlemdir. Bitkilerde sistein ve serin Endopeptidazlar bulunmaktadır. Papain, bromelin ve fisin en iyi bilinen bitki

orijinli proteazlardır. Bunun yanı sıra aspartik proteaz ve aminopeptidazlarda nadiren bulunabilmektedir (Rao ve ark., 1998; Sarı, 2011).

Bitkisel proteolitik enzimler gıda endüstrilerinde çeşitli uygulamalar için kullanılmaktadır. Şu anda FSIS (Food Safety and Inspection Service) tarafından onaylanan ve GRAS statüsünde kabul edilen beş eksojen enzim mevcuttur ve bu enzimlerin çoğu bitkisel kaynaklıdır (Katsaros ve ark., 2010; Zhao ve ark., 2012). Et gevrekleştirme amacıyla yaygın olarak kullanılan enzimlerin başında fisin, papain ve bromelin gelmektedir. Bunlara ek olarak aktinidin ve zingibain enzimleri de üzerlerinde çalışılan diğer bitkisel kaynaklı enzimlerdir. Kivi meyvesinden (EC 3.4.22.14) aktinidin, ananas meyve (EC 3.4.22.33) ve kökünden (EC 3.4.22.32) bromelin, papaya latex'ten (EC 3.4.22.2) papain, zencefil rizomundan (EC 3.4.22.67) zingibain ve incirden (EC 3.4.22. 3) fisin elde edilmektedir (Ha ve ark., 2012; Katsaros ve ark., 2009; Zare ve ark., 2013).

#### **2.4.1.1. Papain (EC 3.4.22.2)**

Papain geleneksel bir bitkisel proteazdır ve kullanımı uzun yıllardır kullanılmıştır. *Carica* papaya meyvesinin lateksinden ekstrakte edilmektedir, Afrika ve Hindistan'ın merkez ve batı subtropikal bölgelerinde yetişmektedir. Enzimin performansı, elde edilen bitki kaynağına, iklim koşullarına ve saflaştırma yöntemlerine göre değişmektedir. Papain enzimi, substrat varlığında pH 5-9 aralığında aktiftir ve 80-90 °C aralığında kararlıdır. Yüksek çözünürlüğe sahip ve tatlandırılmış protein hidrolizatlarının hazırlanması için endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır (Rao ve ark., 1998).

#### **2.4.1.2. Bromelin (EC 3.4.22.32 ve EC 3.4.22.33)**

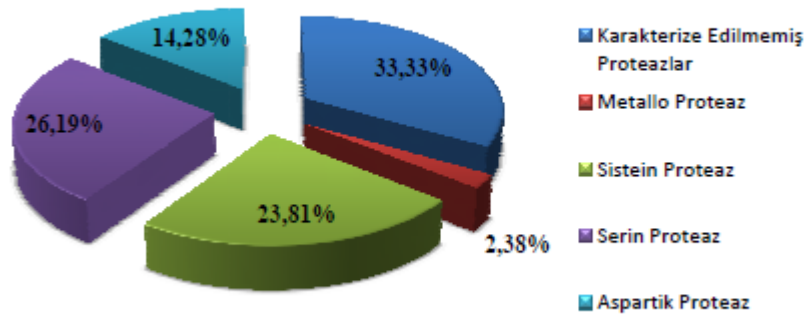
Bromelin ise ananas kök ve suyundan elde edilmektedir. Bromelin enzimi sistein proteaz olarak karakterize edilmiş ve pH 5-9 aralığında aktif olduğu bildirilmiştir. Termal stabilitesi papainden düşüktür ve 70 °C'de inaktif hale gelir (Rao ve ark., 1998).

### 2.4.1.3. Keratinazlar

Saçın parçalanmasını, esansiyel amino asitlerin üretimin ve atık su sistemlerinin temizliğinin sağlanması amacıyla kullanılan keratinazlar bazı botanik grupları tarafından üretilmektedir (Rao ve ark., 1998).

### 2.4.2. Hayvansal proteazlar

Hayvansal proteazlar enzimolojinin başlangıcından beri bilinmektedir. Protein ve enzimlerin kimyasal yapıları keşfedilmeden önce pepsin ve pankreas proteazlarının proteinleri parçalayıcı özellikleri olduğu bilinmekteydi. Günümüzde ise en çok bilinen hayvansal kaynaklı proteazları pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve renin enzimleri oluşturmaktadır. Hayvansal proteazlar, gıda sektöründe, protein hidrolizatları üretiminde, et ve balık atıklarının gideriminde, deri endüstrisinde ve tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu proteazlar büyük hacimlerde saflaştırılabilmektedirler. Ancak bu enzimler kaynakları sebebiyle çok fazla çiftlik hayvanının kesimini gerektirmektedir. Bu sebeple bu enzimlerin üretimini çiftlik hayvanlarının üretim ve kesimi, tarımsal politikalar ve bunun gibi faktörler yönlendirmektedir. Bu dezavantajlar sebebiyle mikrobiyal proteazlara karşı eğilim artmaktadır (Tekin, 2008; Sevinç, 2010). Şekil 2.10'da hayvansal kaynaklı proteazların dağılımı grafiksel olarak verilmiştir.



Şekil 2.10. Hayvansal kaynaklı proteazların dağılımı (Sarı, 2011)

#### **2.4.2.1. Tripsin**

Tripsin, sindirim sürecinde alınan proteinlerin parçalanmasından sorumlu olmakla birlikte proteinleri amino asit ve peptidlere parçalar. Midede başlayan sindirim işlemine hafif alkali pH ile ince bağırsakta devam eder. Tripsin aynı zamanda gıda proteinlerinin hidrolizinden sorumlu bir sindirim enzimidir ve karboksil gruplarındaki peptid bağlarını hidrolize eden bir serin proteazdır. Tripsinin gıda endüstrisindeki uygulamaları hidroliz sonrası fazla acı tat oluşturması sebebiyle sınırlı kalmaktadır. Bunun yanı sıra bazı özel medikal uygulamalarda ve bakteriyal kültür ortamlarının hazırlanmasında kullanılabilir (Rao ve ark., 1998; Sarı, 2011).

#### **2.4.2.2. Kimotripsin**

Kimotripsin diğer bir hayvansal proteolitik enzimdir. Memelilerin bağırsaklarında aktivite gösteren kimotripsinin saf hali oldukça pahalı olmakla birlikte sadece diyagnostik ve analitik uygulamalarda kullanılmaktadır. Son zamanlarda güvenli ağrı kesici olarak tabletler halinde kullanımı söz konusudur. Hayvansal pankreatik bir proteaz olan kimotripsin bir serin proteazdır ve peptid bağlarını fenilalanin, tirozin ve triptofan amino asitlerinden sonra gelen karboksil gruplarından hidrolize eder. Kimotripsin enzimi ayrıca süt proteinlerinin dealkilasyonunda kullanılmaktadır (Sevinç, 2010; Sarı, 2011).

#### **2.4.2.3. Pepsin**

Pepsin gıda proteinlerini peptidlere parçalamak için hemen hemen tüm omurgalı midelerinde ana hücreler tarafından salgılanmaktadır. Pepsin bir aspartik proteazdır ve insan immün yetmezlik virüsü tip 1'in (HIV1) olgunlaşmasından sorumlu olan proteaza benzer. Pepsin proteazı optimum aktiviteyi pH 2-4 arasında göstermektedir. Ortam pH'sı 6'ya ulaştığında enzim inaktif olur. Enzim iki hidrofobik amino asit arasında ki peptid bağlarını parçalayarak kataliz etkisini göstermektedir (Sevinç, 2010; Sarı, 2011).

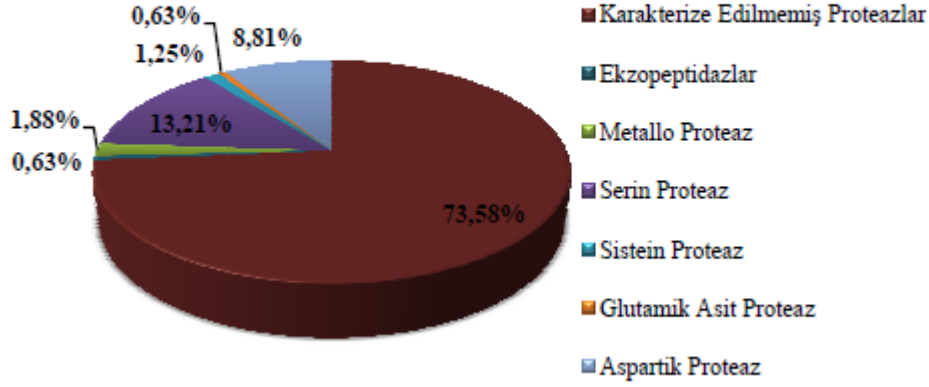
#### **2.4.2.4. Renin (Rennet)**

Renin temel olarak peynir endüstrisinin kullanılan bir aspartik proteazdır. Bu proteazlar aktif bölgelerinde Asp32 ve Asp215 olmak üzere iki adet aspartik asit rezidüsü bulundurlar. Enzim kazein proteinini Phe105 ve Met106 arasında bulunan peptid bağına hidrolize ederek çözünmez formdaki para-kapa-kazeini oluştururlar ve bu sayede sütün pıhtı oluşturmasını sağlar (Ulus, 2012).

Renin enzimi, tüm emziren memelilerin midelerinde inaktif prekürsörü olan prorennin şeklinde üretilen pepsin benzeri bir proteazdır. Hayvansal renin için en yaygın kaynak yeni doğan sütle beslenmiş buzağının şirdenidir (Sevinç, 2010; Sarı, 2011). Renin bütün memeli midelerinde inaktif pro-rennin olarak bulunmakla beraber, kendi işlevi yada pepsin işlevi ile aktif renine dönüşür (Rao ve ark., 1998).

#### **2.4.3. Mikrobiyal proteazlar**

Proteazlar tüm ökaryotik ve prokaryotik organizmalar için vazgeçilmezdirler ve organizmada sentezlenen proteinlerin kompozisyonunun, büyüklüğünün, biçiminin ve döngüsünün kontrolünde önemli rol oynayan enzimlerdir. Günümüzde en çok kullanılan proteaz kaynakları bakteri, fungus ve virüslerdir. Mikroorganizmaların biyoteknolojik olarak kullanım amacıyla çoğu özelliğinin değiştirilmesi gibi sebepler nedeniyle bitkisel ve hayvansal proteazlara göre daha çok tercih sebebidir. Mikrobiyal proteazlar aktif merkezleri ve katalitik etki mekanizmaları ile sınıflandırılmaktadırlar ve ayrıca spesifik oldukları substratlara göre de (keratinaz, jelatinaz vb ) sınıflandırılabilir (Sevinç, 2010). Bunun yanı sıra, bazı hayvansal hastalıkların kullanılan hayvansal materyaller ile insan geçmesi gibi nedenlerle mikrobiyal proteazlar bir kez daha önem kazanmıştır. Bitkisel proteazların ise tarımsal ve siyasal politikalar ile yönlendirilen ham maddeler nedeniyle üretimdeki kısıtlı hammadde gibi nedenlerden dolayı yine mikrobiyal proteazlar ön plana çıkmaktadır (Sarı, 2011). Mikrobiyal kaynakları proteazların grafiksel olarak dağılımı Şekil 2.11'de verilmiştir.



Şekil 2.11. Mikrobiyal proteazların dağılımı (Sarı, 2011)

Dünya çapında enzim satışlarının %40'ını proteazların oluşturması (Sarı, 2011) ve şekil 2.11'de görüldüğü üzere karakterizasyon çalışmaları yapılmamış proteazların kullanımının yaygın olması, proteazlar ile ilgili çalışmaların yapılması için en mantıklı nedenlerdendir.

#### 2.4.3.1. Bakteriyal proteazlar

Ticari proteazların çoğu *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından nötral ve alkalın olarak üretilmektedir. Bakteriyal nötral proteazlar pH 5-8 aralığında aktivite gösterebilmektedir ancak termal stabiliteleri düşüktür. Nötral proteazlar aktivite gösterdiği pH aralığı ve hayvansal proteazlara göre uygulama yapıldığı ürün üzerinde daha az acı tat oluşturması nedeniyle gıda endüstrisinde daha çok tercih edilmektedir (Tekin, 2008). *Bacillus* türündeki bakteriler proteaz tiplerinden genellikle serin alkalın proteaz üretirler ve bu nedenle çoğu *Bacillus* proteazı alkali özellik gösterir (Sevinç, 2010). Bazı alkalın proteaz üreticisi *Bacillus* türleri Çizelge 2.3'de verilmiştir.

**Çizelge 2.3.** Bazı alkalen proteaz üretici *Bacillus* spp. (Tekin, 2008)

---

***Bacillus* spp. ve suşları**

---

*Bacillus alcalophilus* ATCC 21522

*B. alcalophilus*

*B. alcalophilus* subsp. *halodurans* KP1239

*B. amyloliquefaciens*

*B. circulans*

*B. coagulans*

*B. firmus*

*B. intermedius*

*B. lentus*

*B. licheniformis*

*B. proteolitycus*

*B. pumilus*

*B. sphaericus*

*B. subtilis*

*B. subtilis* var. *Amylosacchariticus*

*B. thrungiensis*

*Bacillus* sp. Ya-B

*Bacillus* sp. NKS-21

*Bacillus* sp. B21-2

*Bacillus* sp. Y

*Bacillus* sp. CW-1121

*Bacillus* sp. KSM-K16

*Bacillus* sp. MK5-6

---

Endüstri alanında kullanım bulan 10'dan fazla mikrobiyal enzimin *Bacillus* cinsine ait türler tarafından sentezlendiği ve bu bakterilerinde birçok özelliğe sahip olduğu saptanmıştır. Bu bakterilerin büyük bir bölümü kemoorganotogrof olduğu için besin istekleri azdır, yapılarında heterojenlik yoktur ve kültüre kolayca alınabilirler (Sarı, 2011).

Alkalen proteazların optimum pH aralığı 9-11 arasında değişmekle birlikte optimum pH istekleri 11'den 13'e kadar olan istisnai alkalen proteazlar rapor edilmiştir. İzoelektrik noktaları ise pH 6-12 kararlı olmakla birlik yüksek izoelektrik noktalarına sahiptirler. Optimum sıcaklık istekleri 50-70 °C arasında değişmekle birlikte literatürde termostabil ve soğuk alkalın proteaz örnekleri mevcuttur. Molekül ağırlıkları ise 15-30 kDa arasında değişmekle beraber literatürde 45 kDa'a kadar moleküler ağırlığa sahip alkalın proteaz örnekleri rapor edilmiştir (Sevinç, 2010).

#### **2.4.3.2. Fungal proteazlar**

Funguslardan elde edilen proteazlar bakterilere göre daha çeşitlidir. *Aspergillus oryzae*'nin ürettiği asit, nötral ve alkalın proteazlar buna örnek olarak verilebilir. Fungal proteazlar pH 4-11 gibi geniş bir pH aralığında aktivite ve geniş bir substrat spesifitesi gösterebilmektedir. Ancak düşük reaksiyon hızı ve termal stabilitesinin kötü olması bakterilere göre dezavantajdır. Fungal proteazlar katı kültür fermantasyonu ile büyük miktarlarda üretilebilmektedir. Fungal asit proteazlar pH 4-4.5 arasında optimum aktivite göstermektedirler ve pH 2.5-6 arasında stabildirler. Fungal nötral proteazlar pH 7'de aktivite göstermekle beraber, şelatlayıcı ajanlar tarafından inhibe edilen metalloproteazlardır. Fungal nötral proteazlar gıda proteini hidrolizatlarının acılığının giderilmesinde etkilidir. Fungal alkalın proteazlar ise gıda proteinlerinin modifikasyonunda kullanılmaktadır (Rao ve ark., 1998).

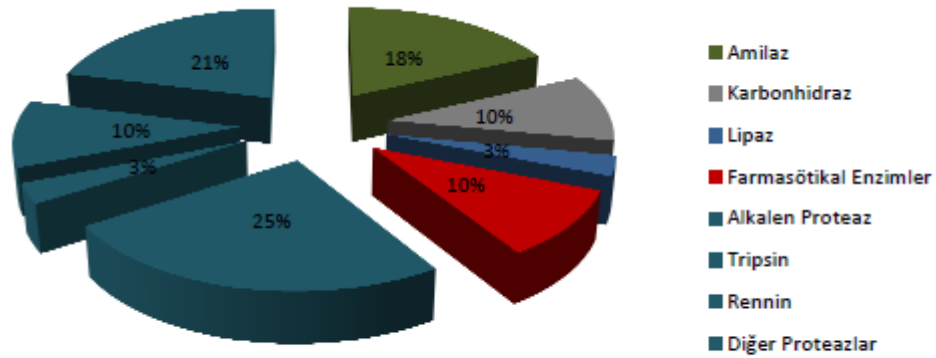
#### **2.4.3.3. Viral proteazlar**

AIDS ve kanser gibi hastalıklara neden olan virüs proteinlerinin fonksiyonları nedeniyle viral proteazlar oldukça önemlidir. Serin, aspartik ve sistein peptidazlar çoğu virüste bulunmaktadır. Viral aspartik proteazlar viral tutunma ve homodimer replikasyonu ile poliprotein öncülleri olarak ifade edilmektedirler. Olgun proteaz, öncü proteinin otolizi ile salınmaktadır. Retroviral aspartik proteazlar ve bunların mutantları ile saflaştırma, enzimatik analiz ve gen ifadesi ile ilgili oldukça fazla literatür bulunmaktadır. AIDS'in yayılımını ve öldürücü etkisini ortadan kaldırabilmek için etkili inhibitörlerin dizaynı

için birçok araştırma, viral proteazların üç boyutlu yapısı ve bunların sentetik inhibitörlerle etkileşimi üzerine odaklanmıştır (Tekin, 2008).

## 2.5. Proteazların Endüstrideki Önemi ve Kullanım Alanları

Dünya çapında endüstriyel enzimlerin satış değerinin 1 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir. Tüm proteolitik enzimler sıcaklık, pH, iyon gereksinimi, spesifiklik, aktivite ve stabiliteye göre karakteristik özelliklere sahiptirler. Bu biyokimyasal parametreler proteazların endüstride kullanılabilirliğini belirlemektedir. Lipaz, karbonhidraz ve proteazlarında içinde bulunduğu hidrolitik enzimler, toplam enzim satışlarının %75'ini oluşturmaktadır. Proteazlar ise bu enzim grupları içerisinde ilk sırada yer alarak yaklaşık %59'luk bir pay ile satışı gerçekleştirilmektedir (Sarı, 2011). Şekil 2.12'de dünya çapındaki toplam endüstriyel enzim satışlarının yüzdesel olarak dağılımı grafiksel olarak verilmiştir.



**Şekil 2.12.** Dünya çapındaki endüstriyel enzim satışlarının yüzdesel dağılımı (Sarı, 2011).

Günümüzde elde edilen değişik özellikteki proteazlar, yüksek ürün kalitesi, üretimde düşük maliyet, az atık, fazla enerji tüketiminin engellenmesi, spesifikite, kolay kontrol ve reaksiyonun ılıman koşullarda gerçekleştirilmesi ve reaksiyonun 1016 kata kadar artması gibi avantajlara sahiptirler. Deterjan ve gıda endüstrisi başta olmak üzere; tekstil, deri, fotoğraf, ipek ve yem sanayi ile çeşitli klinik uygulamalar ve eczacılık, kimya endüstrisi, atıkların temizlenmesi, protein hidrolizatlarının tatlandırılması, ekmek

ve pasta ürünleri, içecek endüstrisi, gibi bir çok alanda kullanılmaktadır ve ayrıntılı olarak Çizelge 2.4'te bakteriyal alkali proteaz kaynakları, endüstriyel uygulama alanları ve ticari olarak üretici firmaları verilmiştir (Alpan, 2011; Bulut, 2007; Turus, 2011; Yardımcı, 2014).

**Çizelge 2.4.** Bakteriyal alkali proteazlar, kaynakları, endüstriyel uygulama alanları ve ticari olarak üretici firmaları (Gupta ve ark., 2002)

Ticari Üretici	Ürün İsmi	Mikrobiyal Kaynak	Uygulama
Novo Nordisk,	Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Deterjan, ipek
Danimarka	Savinase	<i>Bacillus sp.</i>	Deterjan, tekstil
	Esperase	<i>B. lentus</i>	Deterjan, gıda, ipek
	Biofeed pro	<i>B. licheniformis</i>	Besleme
	Durazym	<i>Bacillus sp.</i>	Deterjan
	Novozyme 471MP	<i>n.s</i>	Fotoğraf, jelatin hidrolizi
	Novozyme 243	<i>B. licheniformis</i>	Protez temizleyicisi
	Nue	<i>Bacillus sp.</i>	Deri
Genecor İnternational,	Purafact	<i>B. lentus</i>	Deterjan
USA	Primatan	Bakteriyal Kaynak	Deri
Gist-Brocades,	Subtilisin	<i>B. alcalophilus</i>	Deterjan
Hollanda	Maxacal	<i>Bacillus sp.</i>	Deterjan
	Maxatase	<i>Bacillus sp.</i>	Deterjan
Solvay Enzymes,	Opticlean	<i>B. alcalophilus</i>	Deterjan
Almanya	Optimase	<i>B. licheniformis</i>	Deterjan
	Maxapem	<i>Bacillus sp.</i> 'nin protein mühendisliği ile üretilmiş varyantı	Deterjan
	HT-proteolytic	<i>B. subtilis</i>	Alkol, fırıncılık, besleme, gıda
	Protease	<i>B. licheniformis</i>	Gıda, atık
Amano	Proleather	<i>Bacillus sp.</i>	Gıda
Pharmaceuticals,	Collegenase	<i>Clostridium sp.</i>	Teknik kullanım
Japonya	Amano protease S	<i>Bacillus sp.</i>	Gıda

**Çizelge 2.4.** Bakteriyal alkali proteazlar, kaynakları, endüstriyel uygulama alanları ve ticari olarak üretici firmaları (Gupta ve ark., 2002) (Devam)

Enzyme Development, USA	Enzeco protease	alkaline	<i>b. licheniformis</i>	Endüstriyel kullanım
	Enzeco protease-L FG	alkaline	<i>B. licheniformis</i>	Gıda
	Enzeco high alkaline protease	alkaline	<i>Bacillus sp.</i>	Endüstriyel kullanım
Nagase Biochemicals, Japonya	Biopraxe concentrate		<i>Bacillus sp.</i>	Kozmetik, ilaç
	Ps. Protease		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Araştırma
	Ps. Elastase		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Araştırma
	Cryst. Protease		<i>Bacillus subtilis (K2)</i>	Araştırma
	Cryst. Protease		<i>B. subtilis (bioteus)</i>	Araştırma
	Biopraxe		<i>B. subtilis</i>	Deterjan, temizlik
	Biopraxe Sp-10		<i>B. subtilis</i>	Gıda
Godó Shusei, Japonya	Godó-Bap		<i>B. licheniformis</i>	Deterjan, gıda
Rohm, Almanya	Corolase 7089		<i>B. subtilis</i>	Gıda
Wuxi Synder Bioproducts, Çin	Wuxi		<i>Bacillus sp.</i>	Deterjan
Advance Biochemicals, Hindistan	Protosol		<i>Bacillus sp.</i>	Deterjan

### 2.5.1. Deri endüstrisi

Bakteriyal proteazlar derinin kolajen olmayan yapılarının seçilimli hidrolizinde, globülinler ve albüminler gibi fibril yapıda olmayan proteinlerin uzaklaştırılmasında, deriden kılların uzaklaştırılmasında ve derinin yumuşatılmasında kullanılmaktadır. Deri

işleme prosesi, ıslatma, sepileme, kireçlilik, kireç giderme, sama ve kıl giderme birçok adımdan oluşan bir süreçtir. Bu sürecin her adımın çokça kimyasal kullanılmaktadır. Kullanılan hidrojen sülfid ve diğer kimyasallar güvenlik ve çevre açısından oldukça tehlikeli ve de zararlıdır. Çevresel nedenlerden dolayı kontrolü kolay, hızlı olması ve atıkların uzaklaştırılması sebebiyle deri işlenmesinde enzimatik yöntemlerin kullanılması tercih edilmektedir. Proteazlar derinin ıslatılması, yumuşatılması, inceltmesi ve kılların uzaklaştırılması işlemlerinde kullanılmaktadır. Enzim uygulaması ile istenmeyen pigmentler uzaklaştırılarak deri yüzeyi genişletilmektedir. Dericilik sektöründe ham deri ağırlık üzerinde alınıp işlendikten yüzey alanı üzerinden satıldığı için proteazların bu avantajı oldukça önemlidir. Deriden kılların uzaklaştırılması işleminde kıl köklerinin şişmesiyle ve oluşan alkali koşullarda alkalen proteazlar kıl foliküllerdeki proteinlere etki ederek kolay ve hızlı bir şekilde kılların uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Ancak enzim uygulaması, derilerin dikişe ve günlük kullanımdan kaynaklanan darbelere dayanıklılığını etkilediğinden kullanım miktarı ve süresine dikkat edilmelidir (Tekin, 2008; Sevinç, 2010).

### **2.5.2. Deterjan endüstrisi**

Çevresel amaçlar ile deterjanlardan fosfatların çıkarılması ve deterjan raf ömrü boyunca içine ilave edilen bakteriyel proteazların kararlı olması için gereken şartlar, deterjanların genel oluşumunda büyük değişimler meydana getirmiştir. Sıcak yıkamalar için formüle edilmiş olan deterjanlar, sodyum fosfat ve yüksek ısılarda ( 60 °C ve üzeri) aktif hale gelen bir beyazlatma maddesi olan sodyum perborat içermektedirler. Fosfat kirlenmesini azaltmak için çevresel baskılar ve polyester kumaşların kullanımının artması nedeniyle bakteriyel enzimlerin kullanımı artmıştır. Enzimler düşük fosfat içeriğine sahip, ılık ve soğuk yıkama ısıları için formüle edilmiş olan deterjanların önemli bir bileşiği haline gelmiştir. Günümüzde deterjanlarda kullanılan enzimlerin market payının büyük bir kısmı *Bacillus spp.*'den elde edilen alkalın proteazlardan oluşmaktadır. Enzimlerin kullanımı yıkama verimini artırmanın yanında daha düşük ısılarda ve daha kısa sürelerde temizliğin sağlanmasına olanak sağlamakta ve çamaşırların yıpranmasını da önlemektedir (Yardımcı, 2014).

### **2.5.3. İlaç endüstrisi**

Enzimler ilaç sanayinde geniş uygulama alanına sahiptir. Vücuttaki çeşitli ihtiyaçları gidermek veya eksik enzim ihtiyaçlarını karşılamak için enzim takviyeleri üretilmektedir. Sindirim sistemini desteklemek için üretilen ilaçlarda proteazlar kullanılmaktadır (Yardımcı, 2014). Kollojenaz ya da subtilisin yanık ve yara tedavisinde, antibiyotiklerin geniş bir aralıkta kullanımıyla kombine edilerek kullanılmaktadır. *E. coli*'den izole edilen asparajinaz lenfositik lösemilerin çeşitli formlarında kan akışında asparajini elemine etmek için kullanılmaktadır. Şeker hastalarında yaraların geç iyileşmesine karşı proteaz absorban örtü tedavisinde metallo proteaz inhibitörleri kullanılarak, yaraların kronik halden akut hale geçmesi sağlanmış ve yine proteaz inhibitörü ilaçlar kullanılarak başta HIV olmak üzere virüs kaynaklı hastalıkların tedavisi yapılmaktadır (Sevinç, 2010). *Bacillus subtilis* 316M'den yüksek elastolitik aktivite ile hazırlanan elastoterez, derin apselerin, çibanların, sivilcelerin, irinli yaraların ve yanıkların iyileştirilmesi için kullanılmıştır (Turus, 2011).

### **2.5.4. Bakım ürünleri**

Proteazlar kozmetikte saç bakım ürünlerinde, diş macunlarında, istenmeyen tüylerin yok edilmesini sağlayan ürünlerde ve kontakt lens solüsyonlarında kullanılmaktadır. Cilt ve saç bakım ürünlerinde kullanılan kolajenöz hidrolizat ve elastin maddeleri sığır tendonlarının hidrolizi ile elde edilmektedir (Sevinç, 2010).

### **2.5.5. Tekstil sanayi**

Tekstil sanayinde proteazlar, protein esaslı ürünlerin ön işlenmesinde kullanılmaktadır. Kumaş üretimi için gerekli olan maddeler farklı lif yapılarına sahiptir. Yün, ipek, angora, kaşmir doğal protein lifleri iken soya fasulyesi ve mısır lifleri kazein rejenere protein lifleridir. Yün esaslı materyaller papain, pronaz ve pepsin ile muamele edilerek liflerin esnekliği sağlanır, doğal kirlere arındırılarak daha beyaz bir renk elde edilir. Bu işlemler proteolitik enzimler ile yapıldığında hem daha uygun sonuçlar hem de zamandan tasarruf edilmiş olmaktadır. Yün gibi ipeğinde tekstilde kullanılabilmesi

için proteaz enzimleri ile muamele görmesi gerekmektedir. Ancak ham ipekte fibroin ve serisin adı verilen proteinler mevcuttur ve serisin ipeğin kaygan ve parlak olmasını engellediğinde proteolitik enzimler ile muamele edilerek uygun yapının elde edilmesi elzemdir. Bu amaçla en çok kullanılan proteolitik enzimler tripsin, pepsin ve papain enzimleridir (Sevinç, 2010).

#### **2.5.6. Gümüşün geri kazanımı**

Alkali proteazlar gümüşün geri kazanımı için X-ray filmlerinin kullanımı biyoproseslerinde uygulama alanı bulmuştur. Kullanılan X-ray filmleri yaklaşık olarak %1.5-2 arasında gümüş içermektedir. Geleneksel yöntemler ile (X-ray filmlerinin yakılması) gümüşü kurtarma işlemi çevre sorunlarına yol açmaktadır. Enzimatik yöntemle X-ray filmlerinden gümüşün geri kazanımı ise herhangi bir çevresel zarar neden olmamaktadır ve aynı zamanda polyester filmlerinin de geri dönüşümüne olanak sağlamaktadır.

*Bacillus* sp. B21-2, *Bacillus* sp. B189 ve *B. coagulans* PB-77'den elde edilen proteazlar ile X-ray filmlerinin üzerindeki jelatin proteini katmanlarından gümüşün geri kazanımı sağlanmıştır (Turus, 2011).

#### **2.5.7. Gıda endüstrisi**

Protein hidrolizi; çözünürlük, jelleştirme, emülsiyon yapma ve köpürme karakteristiklerini içeren gıda sistemlerinde proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin modifikasyonu için güçlü bir araçtır. Proteoliz, molekül ağırlığını azaltmasının yanında, iyonize olabilen grupların sayısını artırır ve fiziksel, kimyasal yada çevresel etkileşimleri değiştirebildiğinden hidrofobik grupları açığa çıkarabilir. Bununla birlikte, aşırı protein hidrolizini önlemek için kontrollü hidroliz koşullarına ihtiyaç duyulur. Çünkü, aşırı protein hidrolizi acı tada sahip peptidlerin açığa çıkmasına ve istenmeyen durumların oluşmasına sebep olabilmektedir. Proteazların bir diğer önemi ise gıda proteinlerinin alerjenliğini indirgemesidir. Gıda alerjenleri genellikle proteinlerdir ve IgE aracılığıyla ortaya çıkar. IgE tarafından tanınan proteine epitop denir. Epitop,

proteinin primer yapısına bağlı olarak lineer, sıralı, yapısal ya da üç boyutlu bir şekilde olabilir. Bu yapısal epitoplar, gıdalarda termal işlemler ile daha çabuk bozulurlar. Ancak lineer epitopları düzenlemek için protein zincirindeki spesifik amino asit sekanslarına ulaşmak gerekir ve bu durumlarda peptit bağlarının parçalanması bir çözümdür. Kullanılan metodoloji ve enzimin dikkatli seçimi kalıntı proteinleri uzaklaştırmak için posterior olarak kullanılan filtrasyon teknikleri hidroliz derecesine bağlı olarak protein alerjenitesini büyük ölçüde azaltır (Tavano, 2013).

Gıda endüstrisinde elzem öneme sahip proteazlardan birisi de soğuk aktif proteazlardır. En önemli nedenleri; ürüne spesifik olarak soğuk zincirin bozulmaması, enerji tasarrufu ve sıcaklığa karşı hassas gıdaların bu süreçte zarar görmesini engellemektir.

Soğuk aktif proteazlar içecek ve şarap endüstrisi, peynir üretimi, hayvansal gıdaların eldesi ve meyve suyu endüstrisi gibi alanlarda da mezofilik enzimlere karşı iyi bir alternatiftir. Ayrıca soğuk aktif proteazların düşük sıcaklıkta yüksek katalitik aktivite göstermesi, gıda endüstrisinde tatlandırıcı enzimler şeklinde kullanılmasına (et gevrekleştirme ve flavor gelişimi) olanak sağlamaktadır (Turus, 2011)

#### **2.5.8. Atık işleme**

Proteazlar protein içerikli atık sularda çözünerek sucul sistemlerdeki biyolojik oksijen isteğinin azalmasını sağlarlar. Ayrıca proteazlar doğada bol miktarda bulunan boynuz, kıl, tırnak ve saç gibi lifli proteinlerin hidrolizini sağlayarak yararlı biyokütle haline dönüşmelerini sağlamaktadırlar. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda kümes hayvanlarının kesim yerlerindeki kuş tüyü atıklarının proteaz enzimleri ile işlenerek, protein içeriği yüksek hidrolizat ürünleri elde edilmiş ve elde edilen bu ürünün yem olarak kullanımı sağlanmıştır (Sevinç, 2010; Tekin, 2011).

#### **2.5.9. Peptid sentezi, D,L-amino asitlerin sentezi ve çözündürülmesi**

Sadece L-amino asitler canlı hücreler tarafından metabolize edilmektedir. Bu sebeple kimyasal sentezler ile elde edilen rasemik karışımların izomerlerine ayrılarak L-amino

asitlerin ayrı olarak elde edilmesi gerekmektedir. *C. coronatus*'dan elde edilen proteaz N-benzoil-L-tirozin etil ester üzerinde esterolitik aktivite göstermiştir. Bu sayede D,L-fenil alanin ve D,L-fenil glisinin rasemik karışımlarının çözünmesinde başarıyla kullanılmıştır. Sentetik kimyada proteazların kullanılmasındaki ana kısıtlayıcı faktör susuz koşullarda enzimatik aktivitenin azalmasıdır. Günümüzde proteazlar kullanılarak dipeptidler ve tripeptidler sentezlenmektedir (Tekin, 2008; Yardımcı, 2014).

Proteazlar arasındaki spesifite farklılıklarının, hidrolize olan ya da ön görülen protein kaynağına göre proteaz seçimi için bir kılavuz olarak dikkate alınması çok önemlidir. Aynı protein zincirinden farklı proteazlar kullanılarak çok farklı hidrolizat ürünleri elde edilebilir. Örneğin, patates pulpu proteini dört farklı proteaz ve kombinasyonları ile hidrolize edildiğinde farklı hidrolizatlar meydana geldiği görülmüştür (Tavano, 2013).

Proteazların başka bir önemi ise, biyoaktif peptidlerin açığa çıkmasını sağlamaktır. Biyoaktif peptidler; insan sağlığı üzerine etkili ve vücut fonksiyonları üzerine olumlu etkiye sahip protein fragmentleri olarak tanımlanabilir. Aminoasit kompozisyonu ve sekansına bağlı olarak, bağışıklık ve sinir sistemi, damar ve sindirim sistemi üzerine faydalı çok sayıda farklı peptid görülmektedir. Temel olarak biyoaktif peptid üretmek için en yaygın yol protein hidrolizi, sindirim işlemi ya da mikrobiyal fermantasyondur ancak in-vitro enzimatik işlemlerde yaygın olarak çalışılmış yöntemlerdendir. Peptidler sindirim işlemi sırasında doğal olarak serbest hale gelebilir, farklı enzimler ile üretilen fragmentlerin serbest hale gelmesi geniş bir yelpazede peptid üretmeye olanak sağlamaktadır (Tavano, 2013).

## **2.6. Konu ile İlgili Yapılan Çalışmalar**

Morita ve ark (1997), 10°C'de gelişen *Serratia marcescens* AP3801 suşunda proteaz aktivitesi saptamışlardır. Enzim iyon değişim ve gel filtrasyon kromatografisi ile besi yerinden saflaştırılmıştır. Enzimin moleküler ağırlığının 58 kDa, izoelektrik noktasının 6,0 olduğunu saptamışlardır. Enzimde 40°C ve pH 6,5-8 arasında maksimum aktivite gözlemişlerdir. Enzim aktivitesinin 1,10-fenantrolin ile inhibe olması nedeniyle enzimin metalloproteaz olduğunu belirtmişlerdir.

*Bacillus* sp.'den elde edilen elastaz ile bazı hidroliz deneyleri yapılmış, elastin ve kazein üzerinde yüksek bir degradasyon yeteneği sergilediği tespit edilmiştir. Elde edilen bu elastazın bir metalloproteinaz olduğu ve aktivitesi için  $Zn^{2+}$  iyonuna ihtiyaç duyduğu bildirilmiştir (Qihe ve ark., 2006).

*Penicillium chrysogenum* ve *Staphylococcus xylosus* türlerinin proteolitik aktivitesinin incelendiği bir araştırmada *P. chrysogenum*'un kuru kürlenmiş et ürünlerinin olgunlaştırılması sırasında proteolize önemli bir katkısının olduğu tespit edilmiştir (Uğuz, 2007).

Moon ve ark (1994), *B. subtilis* RM615 suşundan, skim milk besi yerinde ekstraselüler proteaz üretmişlerdir. Saflaştırılan enziminin SDS-PAGE analizi sonunda 28 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu saptanmıştır. Enzimin PMSF ve STI ile inhibe olması buna karşılık EDTA, o-fenantrolin, elastatinal, histidin, leopeptin ile aktivitesini koruması nedeniyle enzimin serin proteaz olduğu saptanmıştır.

Venugopal ve Saramma (2007), *B. circulans* BM15 izole etmişlerdir. Amonyum sülfat çöktürmesi ile proteaz saflaştırmışlar ve SDS-PAGE ile zimogram analizi sonunda moleküler ağırlığının 30 kDa olduğunu bildirmişlerdir. Enzimin optimum aktivitesini pH 7,0 ve 40°C'de gösterdiği, alkali pH'larda (pH 7,0-11,0) stabil olduğu ve 55°C'de 1 saat inkübasyondan sonra stabilitesini koruduğu saptanmıştır.  $Hg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  ile enzim aktivitesi tamamen inhibe olurken,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $K^+$  ve  $Fe^{+3}$  ile aktivitesinin biraz arttığını bildirmişlerdir. PMSF ve EDTA aktiviteyi inhibe ederken, metalloproteaz inhibitörü 1,10 fenantrolin ile inhibisyon görülmemiştir. Enzimin çeşitli ticari deterjanlar olan SDS, Triton-X 100 ve  $H_2O_2$  kullanılarak 1 saat inkübasyon gerçekleştirildiğinde stabil olduğunu bildirmişlerdir.

Dodia ve ark (2008), alkali proteaz salgılayan haloalkalifilik bakteri izole etmişlerdir. Alkali proteazın SDS-PAGE ile moleküler ağırlığının 40 kDa olduğunu saptamışlardır.

Enzimin pH 8,0-13,0 arasında stabil olduğunu ve optimum pH 9,0-11,0 olduğunu

bildirmişlerdir. 0-4 M NaCl'da stabil olduğunu ve 37°C'de optimum katalizi için 150 mM NaCl'ün gerekli olduğunu bildirmişlerdir.

Son ve Kim (2003), *B. amyloliquefaciens* S94'den ekstraselüler proteaz saflaştırmışlardır. Enzim aktivitesinin serin proteazın genel inhibitörü PMSF ile güçlü inhibe olması enzimin bir serin proteaz olduğunu düşündürmüştür. Enzim aktivitesi lösin peptidaz inhibitörü bestatin ile inhibe olması enzimin lösin endopeptidaz olduğunu düşündürmüştür. Maksimum proteolitik aktivite farklı protein substratlarına karşı pH 10,0 ve 45°C'de (protein substrat) ve pH 8,0 ve 45°C'de (sentetik substrat) meydana gelmiştir. Proteaz'ın soğuk uyumlu protein özelliğine sahip olduğunu özellikle düşük sıcaklıklarda 15-45°C'de sentetik substrat hidrolizinin daha fazla olduğunu bildirmişler.

Gupta ve Khare (2006) yaptıkları bir çalışmada, solvent tolerant bir mikroorganizma olan *Pseudomonas aeruginosa* PseA'nın çeşitli solventlerin varlığında alkali proteaz üretme yeteneğinin olduğunu ve ürettikleri proteaz enziminin oldukça kararlı olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu mikroorganizmanın çoğu organik solvent varlığında da kararlı olduğunu bildirmişlerdir.

Bir araştırmada *A. oryzae* ve *A. sojae* suşlarından elde edilen proteazlar ile ızgaralık etler üzerinde gevrekleştirme işlemi yapılmıştır ve bu proteazların gevrekleştirmeye yardımcı olduğu tespit edilmiştir. Yapılan duyusal değerlendirmelerde, *A. oryzae* proteazları ile muamele edilen etlerde *A. sojae* proteazları ile muamele edilen etlere göre az bir miktar acı tat gözlemlenmiştir. Diğer duyusal değerler bu iki suş için bir biri ile uyum içerisinde bulunmuştur ve intramusküler bağ doku üzerindeki aktivitelerine bakıldığında *A. oryzae* diğer suştan elde edilen proteaza nazaran daha düşük bir aktivite göstermiştir. Bağ doku üzerinde oluşan petek benzeri yapı oluşan gevrekliğin bir başka nedenidir (Gerelt ve ark., 2000).

Kammerdpetch ve ark. (2007)'nin yaptığı bir çalışmada, farklı proteazlar kullanılarak bir hidroliz çalışması yapılmış ve her bir proteazın hidroliz derecesinin farklı olduğu görülmüştür. Yalnızca hidroliz derecesi değil hidrolizatların da aminoasit profili farklı olmuştur. Kullanılan Novo Pro-D proteazı aromatik ve sülfür amino asitlerinin (His,

Phe, Trp ve Tyr) peptid bağlarını bölmektedir. Ancak, Flavorzyme proteazı endo ve ekzoproteaz kombinasyonu ve alcalazının geniş substrat spesifitesi ve aromatik amino asit rezidüsü içeren peptid bağlarını tercih etmesi sebebiyle bu proteazlar ile elde edilen hidrolizatlarda aromatik amino asitlerin ve metiyoninin önemli bir derecede arttığı gözlemlenmiştir.

Klompong ve ark. (2007) sarı şeritli trevally balık türlerinden (*Seleroides leptolepis*) elde edilen protein hidrolizatının antioksidan etkisinin hidroliz derecesine bağlı olduğunu, aynı zamanda da kullanılan enzime bağlı olduğunu rapor etmişlerdir. Peptidin antioksidan özelliğinin lipid oksidasyonu sırasında zararlı bileşiklerin oluşmasını engellediği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak hidrolizatların antioksidan özellikleri hidroliz sırasında kullanılan enzimlere bağlı olduğu açık bir şekilde görülmektedir.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Proteaz üretici mikroorganizma**

Çalışmada materyal olarak kullanılan proteaz enzimi üretme yeteneğine sahip mikroorganizma; Çorum/Ulu Mezarlık mevkiinden alınan topraktan izole edilmiştir.

##### **3.1.2. Ekipman**

Çalışmada kullanılan tüm ekipmanların isim ve markaları aşağıdaki gibidir.

-80 °C Dondurucu (HETTICH), Buzdolabı (VESTEL BZP-L3302W), Çalkalamalı İnkübatör, (JEIO TECH SI-600), Dry bath (AOSHENG MK-10), Etüv (MEMMERT), Güç kaynağı (JUNYI JY300), Isıtıcı-Manyetik karıştırıcı (MTOPO MS300HS), Kar makinesi (VISION), Mikrodalga fırın (ARÇELİK MD-574), Otoklav (HICLAVE HV-50L), pH metre (INOLAB pH7110), Santrifüj (HETTICH 120), Santrifüj (HETTICH Mikro 22R), Santrifüj (HETTICH Rotixa/Rp), SDS-PAGE sistemi (WEALTECH), Tarayıcı ve yazıcı (HP 1510), UV/VIS Spektrofotometre (VARIAN CARRY 50), Vortex (SCIOLOGEX MX-S)

##### **3.1.3. Kimyasallar**

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup, isim ve markaları aşağıdaki gibidir.

2-Propanol (TEKKİM), Akrilamid (SİGMA), Amonyum Sülfat (TEKKİM), APS (VİVANTİS), Asetik Asit (TEKKİM), Aseton (MERCK), Bacteriological Agar (LABM), Bacteriological Pepton (LABM), Benzen (MERCK), Bis (FLUKA), Bromfenol blue (BİOMATİK), BSA (BIOSHOP), CaCl<sub>2</sub> (SİGMA-ALDRİCH), CoCl<sub>2</sub> (MERCK), Comassie brillant blue G-250 (APPLICHEM), Comassie brillant blue R-250

(APPLICHEM), CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (MERCK), DEAE Sepharose (SİGMA-ALDRİCH), D-Glukoz (MERCK), DMSO (MERCK), DTT (SİGMA), EDTA (SİGMA), Etil alkol (TEKKİM), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (MERCK), Fibrinojen (SİGMA), Gliserol (FLUKA), Glisin (BIOSHOP), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (SİGMA-ALDRİCH), HCl (MERCK), Kazein (SİGMA), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (SİGMA), L-Tirozin (SİGMA), Metil alkol (MERCK), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (MERCK), MnCl<sub>2</sub> (MERCK), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (SİGMA), NaOH (MERCK), PMSF (SİGMA), Protein Marker (See Blue Plus2), SDS (MERCK), Sephacryl S-200 (GE HEALTHCARE) Sodyum Asetat (SİGMA-ALDRİCH), TCA (SİGMA), TEMED (SİGMA), Toluen (SİGMA), Tris (MERCK), Triton X-100 (SİGMA), Tween-80 (SİGMA), Yağsız Süttozu (GÖKTÜRK), Yeast Extract (LABM), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (MERCK)

#### **3.1.4. Besiyerleri ve subsratlar**

##### **\*PCA (Plate Count Agar)**

5 g/L Casein Peptone, 2,5 g/L yeast extract, 1 g/L D-Glukoz, 15 g/L Agar ile 121 °C’de 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika sterilizasyon normu uygulanarak hazırlanmıştır.

##### **\*PCB (Plate Count Broth)**

5 g/L Casein Peptone, 2,5 g/L yeast extract, 1 g/L D-Glukoz, ile 121 °C’de 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika sterilizasyon normu uygulanarak hazırlanmıştır.

##### **\*PCSMA (Plate Count Skim Milk Agar)**

5 g/L Casein Peptone, 2., g/L yeast extract, 1 g/L D-Glukoz, 15 g/L Agar formülasyonda yer alan su miktarının yarısı kadar yumuşatılmış su ile 121 °C’de 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika sterilizasyon normu uygulanarak hazırlanmıştır. Daha sonra %5’lik hazırlanan skim milk ile bek alevi başında 60 °C’de birleştirilir. Proteaz aktif mikroorganizmaların geliştirilmesi ve ayrımı için kullanılmıştır.

### **\*PCSMB (Plate Count Skim Milk Broth)**

5 g/L Casein Peptone, 2,5 g/L yeast extract, 1 g/L D-Glukoz formülasyonda yer alan su miktarının yarısı kadar yumuşatılmış su ile 121 °C'de 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika sterilizasyon normu uygulanarak hazırlanmıştır. Daha sonra %10'luk hazırlanan skim milk ile bek alevi başında 60 °C'de birleştirilerek final konsantrasyonu %5'e ayarlanmıştır. Proteaz enzim üretim ortamı amacı ile kullanılmıştır.

### **\*Kazein Substrat**

0,3 g kazein 50 ml 50 mM pH 7,5 Tris-HCl ile ısı yardımıyla çözdürülür. Analizler için günlük taze hazırlanır. Proteaz enzim aktivitesinin kantitatif ölçümü için substrat olarak kullanılmıştır.

### **\*BSA Substrat**

0,3 g BSA 50 ml 50 mM pH 7,5 Tris-HCl ile çözdürülür. Proteaz enziminin substrat spesifitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

### **\*Fibrinojen Substrat**

0,3 g fibrinojen 50 ml 50 mM pH 7,5 Tris-HCl ile çözdürülür. Proteaz enziminin substrat spesifitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

### **\*Skim milk**

50 g/L skim milk formülasyonda yer alan su miktarının yarısı kadar yumuşatılmış su ile çözdürülür. 105 °C'de 1,1 atmosferde 5 dk sterilizasyon normu uygulanarak hazırlanmıştır. Proteaz enzim üretimi için indükleyici olarak kullanılmıştır.

### 3.1.5. Tampon ve çözeltiler

#### **\*50 mM Sodyum-Fosfat pH (6,0-6,5-7,0)**

6,80 g potasyum dihidrojen fosat ve 13,40 g di-sodyum hidrojen fosfat distile su ile 1 L'ye tamamlanır. Elde edilen pH'ya göre HCl yada NaOH ile istenilen pH'ya ayarlanır.

#### **\*50 mM Tris-HCl pH (7,5-8,0-8,5)**

6,057 g Tris distile su ile 1 L'ye tamamlanır. HCl ile istenilen pH'ya ayarlanır.

#### **\*50 mM Glisin-NaOH pH (9,0-9,5)**

3,753 gr Glisin distile su ile 1 L'ye tamamlanır. NaOH ile istenilen pH'ya ayarlanır.

#### **\*1 M Ditiyoeritrol (DTT)**

1,542 g DTT distile su ile 10 ml'ye tamamlanır. 1 ml'lik alikotlar halinde -20 °C'de depolanır. Protein örneklerinin SDS-PAGE'e yüklemeye önce disülfid bağlarını koparmak amacı ile SDS sample buffer içerisine katılmıştır.

#### **\*1 M Tris-HCl pH 6,8**

60 g Tris Base 500 ml distile su ile çözündürülür ve pH HCl ile 6,8'e ayarlanır. SDS-PAGE sisteminde konsantratör jelin hazırlanmasında kullanılmıştır.

#### **\*1,5 M Tris-HCl pH 8,8**

91 g Tris Base 500 ml distile su ile çözündürülür ve pH HCl ile 8,8'e ayarlanır. SDS-PAGE sisteminde ayırıcı jelin hazırlanmasında kullanılmıştır.

**\*5X Tris-Glisin pH 8,3**

15,1 g Tris Base, 94 g Glisin ve 50 ml 10'luk SDS 1000 ml distile su ile çözdürülür.

**\*Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30)**

İstenilen hacme göre 29:1 oranında akrilamid ve bisakrilamid tartılır ve distile suda çözdürülür. Akrilamid nörotoksik bir madde olduğu için deri ile temas etmemesine dikkat edilir. +4 °C'de depo edilir.

**\*APS Çözeltisi (%10)**

1 g APS 9 ml distile su içinde çözdürülür ve 22 µm filtreden geçirilir. 1 ml'lik alikotlar olacak şekilde -20 °C'de depo edilir.

**\*Bradford Reaktifi**

40 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 50 ml %95'lik etil alkol içinde çözdürülür ve üzerine 55 ml%88'lik fosforik asit ilave edilerek distile su ile 1 L'ye tamamlanıp filtre edilir. Güneş ışığından korunarak +4 °C'de depo edilir. Enzim örneklerinin protein miktarlarının belirlenmesi için kullanılmıştır.

**\*Destain Çözeltisi**

1 litre için; 400 ml metil alkol, 100 ml asetik asit ve 500 ml distile su karıştırılır. SDS-PAGE sonrası Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyanan jelden boyanın geri alınması için kullanılmıştır.

### **\*Diyaliz Tamponu**

50 mM Tris-HCl tamponu 0,5 M NaCl içerek şekilde istenilen hacme göre hazırlanır. Amonyum sülfat ile çöktürme sonrası elde edilen proteaz enzim karışımından amonyum sülfatın uzaklaştırılması amacıyla kullanılmıştır.

### **\*SDS Çözeltisi (%10)**

1 g SDS 9 ml distile su içinde çözündürülür. Kullanım öncesinde eğer beyaz tortu var ise 45 °C'ye ısıtılarak çözünmesi sağlanır ve kullanılır. SDS-PAGE sisteminde konsantratör ve ayırıcı jelin hazırlanmasında kullanılmıştır.

### **\*SDS Sample Buffer (2X jel loading buffer)**

1 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8; 4 ml %10 SDS; 2 ml gliserol; 1 ml 1M DTT; 2 ml distile su ve bir parçacık bromfenolblue karıştırılır. 1 ml'lik alikotlar halinde +4 °C'de stok hazırlanır. SDS-PAGE sistemine yüklenecek olan protein örneklerinin hazırlanması için kullanılmıştır.

### **\*Stain Çözeltisi**

250 ml için; 100 ml metil alkol, 25 ml asetik asit, 0,625 Comassie brillant blue R-250 ve 125 ml distile su karıştırılır. Renkli şişe veya güneş ışığı geçirmeyecek şekilde korunarak saklanır. SDS-PAGE sisteminde koşturulan protein örneklerinin görünür hale gelmesi için elde edilen jelin boyanmasında kullanılmıştır.

### **\*TCA Çözeltisi**

250 ml için, 1,798 g TCA, 2,99 g Na-asetat ve 1,88 ml asetik asit son hacim 250 ml olacak şekilde distile su ile karıştırılır. Proteaz enzim aktivitesinin belirlenmesi esnasında, reaksiyonu sonlandırmak ve tirozinin serbestleşmesini sağlamak amacıyla belirlenmiştir.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Proteaz üretici mikroorganizma izolasyonu ve karakterizasyonu**

Çalışmada Çorum/Ulu Mezarlık bölgesinden alınan toprak örneğinin, 1 gramı steril dH<sub>2</sub>O kullanılarak desimal dilüsyon yöntemi ile seyreltildikten sonra Plate Count Skim Milk Agar (PCsMA, pH 7,0) katı besiyerine dökme plaka yöntemi ile aktarılmıştır. İnoküle edilmiş petri kapları, 37 °C ve 24 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrası etrafında şeffaf zon oluşturan ve farklı morfolojik görünümüne sahip koloniler seçilmiş ve proteaz üreticisi organizmalar olarak tanımlanarak, %20 (v/v) olacak şekilde gliserol içinde -80 °C’de stok hazırlanmıştır.

Proteaz üreticisi olarak belirlenen mikroorganizmalar arasından birim zamanda en büyük zon oluşturan organizmanın en yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğuna karar verilmiş, ve bundan sonraki çalışmalar bu izolat kullanılarak yürütülmüştür.

Elde edilen izolatın tanılanması moleküler yöntemlerle 27F ve 1492R genel bakteri primerleri kullanılarak 16S rRNA dizisine göre REFGEN/Ankara firmasında gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.2. Proteaz enzimi üretimi için aktif kültürün hazırlanması**

Stok kültürden 50 µL 5'er ml steril Plate Count Broth (PCB) besiyeri içeren tüplere aktarılmış ve 18-24 saat 37 °C’de 150 rpm’de inkübe edilmiştir. Bu şekilde aktif hale getirilen stok kültür bir hafta boyunca aktif kültür olarak kullanılmıştır. Üretim yapılacağı zaman, aktif kültürden tekrar 18 saat boyunca 37 °C’de 150 rpm’de ikinci kez aktivasyon yapılmış ve üretim ortamına eklenmiştir

### **3.2.3. Optimum proteaz üretim zamanının belirlenmesi ve büyüme eğrisi**

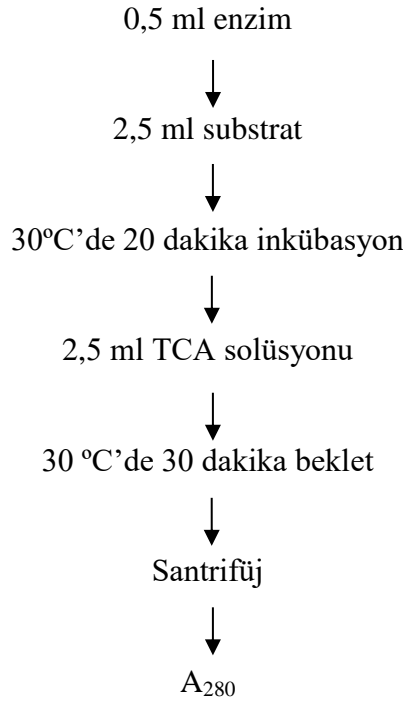
En yüksek enzim üretim zamanının belirlenmesi amacıyla, içerisinde 100 ml (PCsMB) besiyeri bulunan 500 ml’lik erlene %1 olacak şekilde 18 saatlik aktif kültürden inoküle

edilmiş ve 37 °C'de 150 rpm'de 24 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca her 3 saatte bir örnek alınarak kantitatif olarak proteaz aktivitesi bakılmış ve maksimum proteaz enzim aktivitesinin görüldüğü inkübasyon süresi belirlenmiştir. Her 3 saatte bir alınan örneklerden PCA besiyerine desimal dilüsyon yöntemiyle seyreltilmiş numunelerden inokülasyon miktarı 1 ml olacak şekilde dökme plaka yöntemi ile ekim yapılmış ve 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası petrilere gelişen koloniler sayılarak büyüme eğrisi çıkartılmıştır.

#### 3.2.4. Proteaz enzim aktivitesinin kantitatif olarak belirlenmesi

Belirlenen süre boyunca inkübe edilen besiyeri ortamı 6000 rpm'de 5 dakika boyunca +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası pellet atılmış ve elde edilen hücresiz süpernatant proteaz enzim karışımı olarak kullanılmıştır.

Proteaz enzim aktivitesi Nakiboğlu ve ark. (2001), tarafından tanımlanan ve substrat olarak kazeinin kullanıldığı yöntemin modifiye edilmesi ile belirlenmiştir. Yöntemin protokolü aşağıda belirtildiği gibidir.



0,5 ml enzim karışımı % 0,6'lık kazein substratı ile karıştırılarak 30 °C'de 20 dakika boyunca enzimin substratı hidroliz etmesi sağlanmıştır. İnkübasyon sonrası karışım üzerine 2,5 ml TCA çözeltisi ilave edilerek reaksiyon sonlandırılmış ve 30 dakika daha aynı sıcaklıkta proteinlerin presipite olması amacı ile bekletilmiştir. Süre bitiminde karışım 6000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenerek çökelen protein uzaklaştırılmış ve reaksiyon sırasında serbest kalan tirozin amino asidini içeren süpernatant alınarak, UV spektrofotometrede 280 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüştür. Yukarıda belirtilen prosedürde enzim yerine 100 °C'de kaynatılarak inaktif hale getirilmiş enzim kullanılan karışım kör olarak kullanılmıştır

Enzim aktivitesinin hesaplanması için (3.1)'de yer alan formülden ve hazırlanan tirozin standart grafiğindeki eğimden yararlanılmıştır.

$$\text{Aktivite } (\mu\text{g tirozin / ml.dk}) = \frac{(A_{280}/\text{Eğim}) \times \text{Toplam Hacim}}{\text{Enzim Hacmi} \times \text{İnkübasyon Süresi}} \times \text{Seyreltme Faktörü} \quad (3.1)$$

Bir ünite proteaz aktivitesi (U), 30 °C'de, pH 7,5'te gerçekleşen hidroliz reaksiyonu sonucu enzimin substrattan bir dakikada açığa çıkarttığı tirozinin  $\mu\text{g}$  cinsinden miktarı olarak ifade edilmiştir (Nakiboğlu ve ark., 2001 ve Sarı, 2011).

### **3.2.5. Tirozin standart eğrisinin hazırlanması**

Proteaz enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılacak olan tirozin standart eğrisinin çıkartılması amacıyla 50 mM pH 7,5 Tris-HCl tamponu ile 0,25 mg/ml konsantrasyona sahip tirozin stok çözeltisi hazırlanmıştır. Proteaz aktivitesinin kantitatif ölçümü için kullanılan prosedürün  $\frac{1}{4}$ 'ü oranında daha az hacim kullanılarak standart grafik çıkartılmıştır. Hazırlanan bu stok çözeltilerden Çizelge 3.1'de belirtilen miktarlarda çekilerek 30 °C'de 20 dakika bekletilmiş ve süre sonunda üzerine 625  $\mu\text{L}$  solüsyonu eklenmiş ve 30 °C'de 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve köre karşı 280 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerlerine karşı tirozin konsantrasyon eğrisi çizilerek elde edilen grafiğin eğimi hesaplanmıştır (Sarı, 2001).

**Çizelge 3.1.** Tirozin standart grafiğinin hazırlanması

	<b>Tirozin Stok Kons. (mg/ml)</b>	<b>İstenen Tirozin Kons. (µg/ml)</b>	<b>Stoktan Çekilecek Miktar (µl)</b>	<b>Eklenecek Tampon Miktarı (µl)</b>	<b>Eklenecek TCA Miktarı (µl)</b>
<b>1</b>	0,25	5	15	735	625
<b>2</b>	0,25	10	30	720	625
<b>3</b>	0,25	15	45	705	625
<b>4</b>	0,25	20	60	690	625
<b>5</b>	0,25	25	75	675	625
<b>6</b>	0,25	30	90	660	625
<b>7</b>	0,25	50	150	600	625
<b>8</b>	0,25	75	225	525	625
<b>9</b>	0,25	100	300	450	625
<b>10</b>	0,25	200	600	150	625
<b>KÖR</b>	-	-	-	750	625

### 3.2.6. Enzim üretimi

İzolata ait proteazın özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, enzim üretimi yapılmıştır. Bu amaçla, bir litre PCSMB besiyerine 18 saat boyunca aktive edilen kültürden %1 olacak şekilde inokülasyon yapılmış ve 37 °C’de 150 rpm’de çalkalamalı olarak optimum enzim üretiminin gerçekleştiği zamana kadar inkübasyon yapılmıştır. Süre sonunda kültür, +4 °C’de 6000 rpm hızı ile 20 dk santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırılmış ve kültür süpernatantı alınmıştır. Proteaz özelliklerinin belirlenmesi için ekstraselüler enzim karışımı saflaştırılmıştır.

### 3.2.7. Ekstraselüler proteaz enziminin saflaştırılması

#### 3.2.7.1. Amonyum sülfat ile çöktürme

Ekstraselüler proteaz enziminin konsantre edilmesi gradient (%30-60-80) amonyum sülfat yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Cadirci ve Yasa, 2011)

Bunun için gerekli amonyum sülfat miktarının hesaplanması ise (3.2)'de verilen formüle göre hesaplanmıştır.

Hesaplama (1 L için)

$$\text{Amonyum sülfat (g)} : 533 * (S_2 - S_1) / (100 - 0.3 * S_2) \quad (3.2)$$

$S_1$  : Başlangıç konsantrasyonu

$S_2$  : Son konsantrasyon

Enzim hacmine göre ilave edilecek amonyum sülfat miktarı belirlendikten sonra, tuzun daha iyi çözünmesi ve bu esnada proteine zarar vermemesi için kullanılmadan önce havanda iyice toz haline getirilmiş ve tüm işlemler +4°C'de gerçekleştirilmiştir. Yöntemin protokolü aşağıda verildiği gibidir.

#### Aşama-1

İnkübasyon sıvısı santrifüj edilir

(6000 rpm, 20 dk, +4 °C)



2 ml örnek alınır



Kalan hacim ölçülür ve amonyum sülfat miktarı ölçülür (%30 için)



Manyetik karıştırıcı ile +4 °C'de 4-6 saat düşük devirde karıştırılır



Tüm sıvı 6000 rpm'de 20 dk, +4 °C'de santrifüj edilir



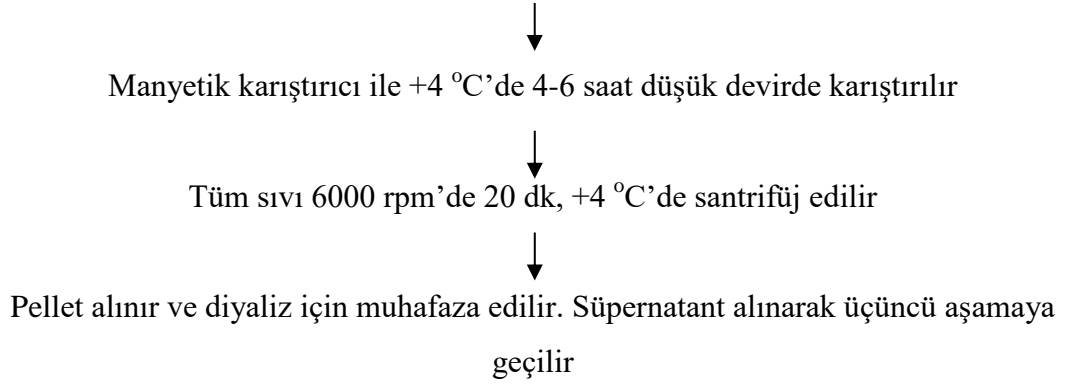
Pellet alınır ve diyaliz için muhafaza edilir. Süpernatant alınarak ikinci aşamaya geçilir

#### Aşama-2

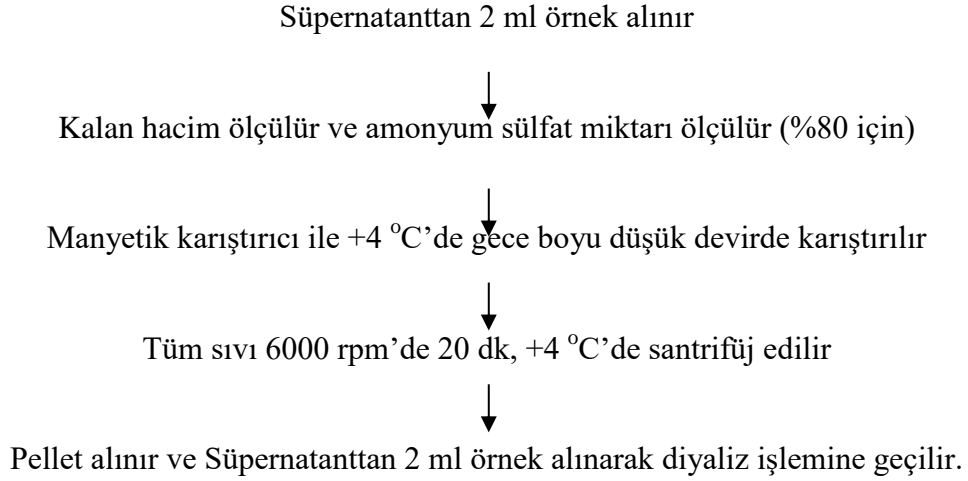
Süpernatanttan 2 ml örnek alınır



Kalan hacim ölçülür ve amonyum sülfat miktarı ölçülür (%60 için)



### Aşama-3



Alınan 2 ml'lik örnekler daha sonra protein miktarı ve SDS-PAGE analizleri için kullanılmak üzere -80 °C'de depolanmıştır. Elde edilen farklı konsantrasyonlara sahip amonyum sülfat çöktürme ürünleri diyalize tabi tutulmuştur.

#### **3.2.7.2. Diyaliz**

Amonyum sülfat ile gradient halde deriştirilen ham enzim ekstraktı, 10000 Da cut off değerine sahip diyaliz membranı kullanılarak 50 mM Tris-HCl tamponuna (pH 7,5) karşı +4 °C'de gece boyu diyaliz edilmiştir. Diyaliz aşamasında kullanılacak tampon miktarı diyaliz yapılan örneğin toplamda en az 50 katı oranında olmalı ve periyodik olarak yenilenmelidir. Diyaliz membranları kullanım öncesi diyaliz için seçilen tampon içerisinde bekletilmiş ve kullanıma uygun hale (yumuşatma) getirilmiştir. Daha sonra

%30, 60 ve 80 çöktürme ürünleri için ayrı ayrı diyaliz membranı kullanılarak diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Diyaliz işleminde enzim aktivitesinin azalmasını engellemek için sıcaklık +4 °C'de sabit tutulmuş ve kullanılan tampon içerisine 0,5 M olarak şekilde NaCl katılmıştır. Diyalizin ilk on iki saatinde her dört saatte bir olacak şekilde tamponun rejenere edilmesine dikkat edilmiş ve örnekler on ikinci saatin sonunda gece boyu diyalize bırakılmıştır. Diyaliz süresinde manyetik karıştırıcının devir hızının yüksek olmamasına ve diyaliz membranlarının tamamen tampon içerisinde olmasına dikkat edilmiştir.

Diyaliz işlemi sonrası her bir örnekteki proteolitik aktivite, kalitatif ve kantitatif olarak ölçülmüştür. En yüksek aktiviteye sahip olan fraksiyon ile diğer işlemlere devam edilmiştir.

### **3.2.8. Kısmi olarak saflaştırılan enzim karışımının termal aktivite ve termal stabilitesinin belirlenmesi**

Kısmi saflaştırma sonrası elde edilen proteaz enzim karışımlarının termal aktivitesinin belirlenmesi amacıyla 50 mM Tris-HCl pH 7,5 tamponu ile hazırlanmış % 0,6'lık (w/v) kazein substrat ile sırasıyla 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C'de inkübasyon sıcaklığında Bölüm 3.2.4'te verilen standart protokole göre proteaz enzim aktivite tayini yapılmış ve proteaz enziminin termal profili belirlenmiştir (Turus, 2011).

Termal stabilitenin belirlenmesi için ise kısmi saflaştırma sonrası elde edilen proteaz enzim karışımları sırasıyla 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C'de ön inkübasyona maruz bırakılmış ve Çizelge 3.2'ye göre periyodik olarak örnekler alınmıştır. Alınan enzim örnekleri 50 mM Tris-HCl pH 7,5 tamponu ile hazırlanmış %0,6'lık (w/v) kazein substrat ile Bölüm 3.2.4'te verilen standart protokole göre optimum sıcaklıkta inkübe edilerek proteaz enzim aktivite tayini yapılmıştır.

Ön inkübasyon yapılmayan (muamelesiz) proteaz enzimine ait aktivite 100 olarak kabul edilmiş ve muamele görmüş enzimlerin aktiviteleri oransal olarak kalan aktivite olarak verilmiştir (Turus, 2011).

Daha sonraki çalışmalarda reaksiyon, en yüksek proteaz aktivitesinin görüldüğü sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Proteaz enziminin termal stabilitesinin belirlenmesi

Süre (Saat)	0	0.5	0.75	1	1.5	2	3	4	24	36	48
30 °C	X	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X
40 °C	X	-	-	X	X	X	X	X	X	-	-
50 °C	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-

X : Proteaz aktivitesi için seçilen enzim örneğinin ön inkübasyon süresi ve sıcaklığı

### 3.2.9. Kısmi olarak saflaştırılan enzim karışımının optimum pH ve pH stabilitesinin belirlenmesi

Kısmi saflaştırma sonrası elde edilen proteaz enzim karışımlarının optimum pH değerinin belirlenmesi amacıyla, pH 6,0, 6,5 ve 7,0 için 50 mM Sodyum-Fosfat tamponu, pH 7,5, 8,0 ve 8,5 için 50 mM Tris-HCl tamponu, pH 9,0 ve 9,5 için 50 mM Glisin-NaOH tamponlarında %0,6'lık (w/v) kazein substratı hazırlanmıştır. Daha sonra bu substratlara karşı enzim karışımının göstermiş olduğu aktivite standart kantitatif yöntem ile optimum sıcaklık değerinde belirlenmiştir.

pH stabilitesinin belirlenmesi için ise, enzim karışımı 1:1 oranında pH 6,5, 7,5, 8,5 ve 9,5 tamponları ile karıştırılmış ve +4 °C'de 192 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca her 24 saatte bir örnek alınarak standart protokole göre proteaz enzim aktivitesi optimum sıcaklıkta ölçülmüştür.

Muamele görmeyen proteaz enzimine ait aktivite 100 olarak kabul edilmiş ve muamele görmüş enzimlerin aktiviteleri oransal olarak kalan aktivite olarak verilmiştir (Turus, 2011). Daha sonraki çalışmalarda, substrat hazırlanması için en yüksek proteaz aktivitesinin görüldüğü pH değerindeki tampon kullanılmıştır.

### 3.2.10. Kromotografik yöntemler ile ileri saflaştırma

#### Jel filtrasyon kromatografisi

##### *Sephacryl S-200 kolon dolgu maddesinin hazırlanması ve kolonun doldurulması*

Çalkalanarak homojen hale getirilen kolon dolgu maddesinden 50 ml alınarak bir beher içerisine aktarılmış ve içerisindeki %20'lik alkolün faz olarak ayrılması beklenmiş ve ayrılan faz pastör pipeti yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Alkol uzaklaştırma işlemi yapıldıktan sonra kolon dolgu maddesi kromatografi için kullanılacak 50 mM pH 7,5 Tris-HCl tamponu ile toplamda kolon dolgu maddesi hacminin 6-8 katı olacak şekilde yıkanmıştır (GE Healthcare).

Yıkama işlemi tamamlanan kolon dolgu maddesi kolona doldurulmadan önce kolon hazırlığı yapılmıştır. Bu amaç ile 50 ml'lik büret kullanılmış ve dolgu maddesinin zeminine dolgu maddesinin tutması için cam yünü sıkıştırılmıştır ve sonrasında kolon 50 mM pH 7,5 Tris-HCl tamponu ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi tamamlanmış ve homojen hale getirilmiş Sephacryl S-200 kolon dolgu maddesi sürekli akış sağlanacak ve hava boşluğu kalmayacak şekilde büret içerisine aktarılmıştır. Aktarma işlemi tamamlandıktan sonra dolgu maddesinin oturması ve sıkışması için gece boyu beklenmiştir. Bekleme süresinin sonunda kolon tekrardan kolon hacminin 3 katı olacak 50 mM pH 7,5 Tris-HCl tamponu ile yıkanarak örnek yüklemeye hazır hale getirilmiştir (GE Healthcare).

##### *Kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzim karışımının kolona yüklenmesi*

Hazırlanan kolona, 0,22 µm por çaplı şırınga filtresinden geçirilmiş proteaz enzim karışımından 1 ml örnek cam pipet ve puar yardımı ile, kolon dolgu maddesinin üst yüzeyine en yakın noktadan ve kolon içerisindeki tamponda dağılmasına izin vermeden yüklenmiştir. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra hemen büretin vanası açılmış ve 0,1 ml/dk akış hızında kromatografi işlemi başlatılmıştır. Kolon dolgu maddesi

hacminin 3 katı olacak şekilde toplam elüsyon, 1,5'er ml fraksiyonlar halinde ependorf tüplerine toplanmıştır.

Fraksiyon alma işlemi bittikten sonra örneklerin UV spektrofometre ile 280 nm'de absorbanları ölçülmüştür. 280 nm ölçümlerinde kör olarak 50 mM pH 7,5 Tris-HCl tamponu kullanılmıştır. Buna ek olarak tüm örneklerin protein miktarları Bradford yöntemiyle ölçülmüştür. 280 nm'de elde edilen ölçüm sonuçlarında pik veren fraksiyonlar ve Bradford analizi ile protein saptanan fraksiyonlar karşılaştırılmış ve paralellik gösteren örnekler seçilmiştir. Seçilen örneklerden kantitatif proteaz enzim aktivitesi tayini yapılmış ve spesifik aktivite hesaplanarak uygun görülen enzim fraksiyonları birleştirilmiştir.

### İyon değişim kromatografisi

#### *DEAE Sepharose iyon değişim kolonunun hazırlanması ve kolonun doldurulması*

25 ml kolon dolgu maddesi yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanmış ve kolona doldurulmuştur. Akış hızı peristaltik pompa kullanılarak 2 ml/dk akış hızına sabitlenmiştir. Kullanılacak olan tampon hacimleri 25 ml kolon dolgu maddesine göre hazırlanarak işlemler gerçekleştirilmiştir.

#### *Jel filtrasyonu ile elde edilen fraksiyonların kolona yüklenmesi*

Jel filtrasyon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar rejenere selüloz santrifüj filtresi (3 kDa cut off) kullanılarak 6000 rpm'de 30 dakika santrifüj ile konsantre edilmiş ve protein miktarı ölçülerek son hacim 0,5 ml olacak şekilde, kolon dolgu maddesinin üst yüzeyine yavaşça yüklenmiştir. DEAE Sepharose İyon Değişim Kolonu'nun özelliği gereği farklı iyonik şiddetlere ve yüklere sahip proteinlerin ayrımı sağlanmaktadır. Bu sebeple farklı NaCl (10 mM, 100 mM ve 1 M) konsantrasyonlarına sahip 50 mM pH 7,5 Tris-HCl elüsyon tamponu olarak kullanılmıştır. İlk yüklemeyi takiben başta NaCl içermeyen 50 mM pH 7,5 Tris-HCl olmak üzere sırasıyla artan konsantrasyonlardaki tuz konsantrasyonu içeren tamponlar ile kolon dolgu maddesi hacminin 2 katı olacak

şekilde elüsyon yapılmıştır. Akış hızı peristaltik pompa yardımı ile 2 ml/dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Fraksiyonlar 1,5 ml olacak şekilde ependorf tüplerine alınmıştır (Sigma-Aldrich).

Elüsyon işlemi tamamlandığında fraksiyonlardaki protein tayini, 50 mM pH 7,5 Tris-HCl tamponuna karşı 280 nm’de absorbans değerleri okunarak yapılmıştır. Ayrıca her bir fraksiyona ait protein miktarı Bradford yöntemiyle ölçülmüştür. 280 nm’de elde edilen ölçüm sonuçlarında pik veren fraksiyonlar ve Bradford analizi ile protein saptanan fraksiyonlar karşılaştırılmış ve paralellik gösteren fraksiyonlar proteaz enzim aktivitesi için seçilmiştir. Seçilen örneklerin proteaz enzim aktivitesi tayini yapılmış ve spesifik aktivite hesaplanarak uygun görülen fraksiyonlar birleştirilip, saflık derecelerinin belirlenmesi amacıyla SDS-PAGE yöntemi ile protein elektroforezi yapılmıştır.

### 3.2.11. Bradford yöntemi ile protein miktarının belirlenmesi

Tez çalışması süresince elde edilen tüm enzim örneklerinin protein miktarı Bradford yöntemi ile tayin edilmiştir. Yöntemin akım tablosu Çizelge 3.3’te verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Bradford yöntemi akım tablosu

Standart (ml)	Kör (ml)	Örnek (ml)	Kimyasal
---	<b>0,05</b>	---	Distile Su
<b>0,05</b>	---	---	Standart Çözelti
---	---	<b>0,05</b>	Örnek Çözeltisi
<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	Bradford Reaktifi

\*Tüpler karıştırılıp 10 dk karanlıkta oda sıcaklığında bekletilir  
\*595 nm dalga boyunda absorbanslar okunur

Yöntem; 50 µl enzim örneği üzerine 1 ml Bradford reaktifi eklenmiş ve 10 dakika boyunca karanlıkta bekletildikten sonra UV spektrofotometrede 595 nm’de kör örneğe karşı absorbans ölçümü şeklinde uygulanmıştır. Kör örnek hazırlanırken enzim yerine

50 µl distile su kullanılmış ve diğer örneklere uygulanan tüm basamaklar uygulanmıştır (Çadircı ve Yaşa, 2008).

Ölçüm sonucu elde edilen değerlerden protein miktarı (3.3)'de verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Protein (mg/ml)} = \left( \frac{ABS}{EĞİM} \right) \times \text{Seyreltme Faktörü} \quad (3.3)$$

### 3.2.12. BSA standart eğrisinin hazırlanması

BSA standart eğrisinin hazırlanması amacıyla 4 mg/ml konsantrasyona sahip ana stok hazırlanmıştır. Ana stok için 8 mg BSA hassas terazide tartılmış ve 2 ml distile su içerisinde çözdürülmüştür. Hazırlanan ana stoktan Çizelge 3.4'te belirttiği şekilde 0,02, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3 mg/ml konsantrasyonlara sahip BSA stokları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stoklardan protein tayini yapılmış ve elde edilen absorbans değerleri ile grafik çizilmiştir. Çizilen grafiğin eğimi bulunmuş ve protein miktarının hesaplanmasında kullanılmıştır.

**Çizelge 3.4.** Farklı konsantrasyonlarda BSA stok çözeltisi hazırlanması

	<b>BSA Stok</b>	<b>İstenen BSA</b>	<b>Stoktan Çekilecek</b>	<b>Eklenecek Distile</b>
	<b>Kons. (mg/ml)</b>	<b>Kons. (mg/ml)</b>	<b>Miktar (µl)</b>	<b>Su Miktarı (µl)</b>
<b>1</b>	4,00	0,02	5	995
<b>2</b>	4,00	0,05	12,5	987,5
<b>3</b>	4,00	0,10	25	975
<b>4</b>	4,00	0,15	37,5	962,5
<b>5</b>	4,00	0,20	50	950
<b>6</b>	4,00	0,25	62,5	937,5
<b>7</b>	4,00	0,30	75	925

### 3.2.13. SDS-PAGE yöntemi ile enzimin molekül ağırlığının belirlenmesi

SDS PAGE yöntemi, proteinlerin SDS ile kaplanarak farklı kütlelerde aynı yük değerine sahip olanlarının çapraz bağlı akrilamid porları içinden molekül büyüklüklerine göre birbirinden ayrılması prensibine dayanır.

Saflaştırma basamakları esnasında alınan örneklerin saflık derecelerinin ve molekül ağırlıklarının belirlenmesi için kullanılmıştır.

Çizelge 3.5'te belirtilen tabloya göre akrilamid konsantrasyonu %12,5 olarak belirlenmiş ve bantlar Coomassie Brilliant Blue R-250 boyası ile boyanmıştır. (Anonim, 2015b; Çadircı ve Yaşa, 2008).

**Çizelge 3.5.** Farklı molekül ağırlığına sahip proteinler için poliakrilamid konsantrasyonunun belirlenmesi (Anonim, 2015b).

Poliakrilamid Konsantrasyonu (%)	Molekül Ağırlığı Aralığı (kDa)
7,5	50-200
10	25-200
12	20-100
15	10-50
4-20	5-200
10-20	5-150
4-12	25-250
8-16	15-200

SDS-PAGE analizine başlamadan önce, jel ile teması olan tüm ekipmanlar yıkanıp alkolden geçirilmiş ve en son saf su ile yıkanıp kurularak kullanılmıştır. Elektroforez camları kartuşlara yerleştirilip sızdırmazlığı kontrol edildikten sonra alt (ayırıcı) jel için Çizelge 3.6'da verilen hacimler kullanılarak jel hazırlanmış ve elektroforez camları arasına dökülmüştür. Akrilamidin sıvı halde nörotoksik etkisi olması sebebiyle SDS-PAGE analizinin her aşamasında eldiven ile ve özenle çalışılmaya dikkat edilmiştir. Jel hazırlanırken en son TEMED'in eklenmesine dikkat edilmiştir. Jel dökülmeden önce konsantratör jeline yerleştirilen tarağın uç kısımlarının nereye geldiği belirlenmiş ve bu

seviyenin yaklaşık olarak bir parmak altına denk gelecek şekilde işaret konarak ayırıcı jelin bu seviyeye kadar doldurulmasına dikkat edilmiştir. Jel doldurma işlemi tamamlandıktan sonra üst kısımda oluşan düzensizlik ve kabarcıklardan kurtulmak için bütanol ya da propanol'den 0,5 ml eşit dağılması sağlanacak şekilde jel üzerine dökülmüştür.

**Çizelge 3.6.** %12,5'lik alt (ayırıcı) jel için formülasyon

Kimyasal	Hacim
Akrilamid/Bisakrilamid (%30)	6,0 ml
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	3,75 ml
SDS (%10)	150 µl
dH <sub>2</sub> O	5,03 ml
APS (%10)	75 µl
TEMED	7,5 µl

Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan (yaklaşık 1,5 saat) sonra üst jel üzerinde bulunan bütanol ya da propanol dökülmüş, alkol kalıntılarının uzaklaşması amacıyla bir miktar dH<sub>2</sub>O ile yıkanmış ve kurutma kağıdı ile kurutulmuştur. Bu işlemler tamamlandıktan sonra %4'lük konsantratör jelinin hazırlığına geçilmiş ve Çizelge 3,7'de verilen hacimler ile jel hazırlanmış ve yine en son TEMED eklenerek elektroforez camlarının arası tamamen dolacak şekilde doldurulmuştur. Akabinde yükleme kuyucuklarını oluşturmak için tarak yerleştirilmiştir. Tarak yerleştirilirken hava kabarcığı oluşturmamaya özen gösterilmiştir.

**Çizelge 3.7.** %4'lük üst (konsantratör) jel formülasyonu

Kimyasal	Hacim
Akrilamid/Bisakrilamid (%30)	400 µl
Tris-HCl 1,5 M (pH 6,8)	375 µl
SDS (%10)	30 µl
dH <sub>2</sub> O	2,2 ml
APS (%10)	30 µl
TEMED	4 µl

Polimerizasyon işlemi tamamlanana kadar SDS-PAGE için enzim örnekleri hazırlanmıştır. 2:1 oranında (kullanılan 150 e 75 µl) enzim örneği ve SDS sample buffer karıştırılmıştır. Karıştırma sonrası disülfid bağlarının parçalanması amacıyla örnekler 10 dakika kaynatılmış ve 5 dakika buz içerisinde bekletilmiştir. Jele yükleme öncesi santrifüjde çok kısa bir süre spin yaptırılmış ve sonra yüklenmiştir.

Polimerizasyon işlemi bittikten sonra tarak çıkartılmış ve her bir kuyucuğa eşit konsantrasyonda protein yüklemesi yapılmış ve belirlenen bir kuyucuğa da protein marker (firma tarafından tavsiye edilen miktar) yüklenmiştir. Yükleme işlemi ardından proteinler 150 V'de koşturulmuştur.

Koşturma işlemi bittikten sonra elektroforez camları çıkartılmış ve ayrılarak jelin çıkarılması sağlanmıştır. Jel boya içerisine alınmadan önce boya uzaklaştırma aşamasında çözelti israfını engellemek için, konsantratör kısmı kesilerek uzaklaştırılmıştır. Konsantratör uzaklaştırıldıktan sonra jelin bir köşesinden ufak bir kısım kesilerek jelin ön-arka ve alt-üst kısmının belirlenmesinin kolaylaştırılması sağlanmıştır. Jel, stain çözeltisine (Coomassie Brilliant Blue R-250) alınarak mikrodalga fırın yardımıyla bir taşım kaynayacak şekilde ısıtılmıştır. Boyama işlemi sonrası jel boya giderme çözeltisine aktarılarak fazla boyanın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Boya tamamen uzaklaştıktan sonra ortaya çıkan protein bantları incelenmiş ve tarayıcı yardımıyla bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

### **3.3. Saflaştırılmış Proteaz Enziminin Karakterizasyonu**

#### **3.3.1. Optimum sıcaklık ve termal stabilite**

Saf proteaz enziminin optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 50 mM Tris-HCl pH 7,5 tamponu ile hazırlanmış % 0,6'lık (w/v) kazein substrat ile sırasıyla 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C'de inkübasyon sıcaklığında Bölüm 3.2.4'te verilen standart protokole göre proteaz enzim aktivite tayini yapılmış ve proteaz enziminin termal profili belirlenmiştir (Turus, 2011).

Saf proteaz enziminin termal stabilitesinin belirlenmesi amacıyla 50 mM Tris-HCl pH 7,5 tamponu ile hazırlanmış % 0,6'lık (w/v) kazein substrat ile 30 °C'de ön inkübasyon uygulanarak belirli inkübasyon sürelerinde enzim örneği alınmış ve en yüksek aktivitenin görüldüğü reaksiyon sıcaklığında Bölüm 3.2.4'te verilen standart protokole göre proteaz enzim aktivite tayini yapılarak proteaz enziminin termal stabilitesi belirlenmiştir. Maksimum proteaz aktivitesi 100 olarak kabul edilmiş ve muamele görmüş enzimlerin aktiviteleri oransal olarak kalan aktivite olarak verilmiştir (Turus, 2011).

### **3.3.2. Optimum pH**

Saf haldeki proteazın aktivite gösterdiği optimum pH değerinin belirlenmesi amacıyla, pH 6,0, 6,5 ve 7,0 için 50 mM Sodyum-Fosfat tamponu, pH 7,5, 8,0 ve 8,5 için 50 mM Tris-HCl tamponu, pH 9,0 ve 9,5 için 50 mM Glisin-NaOH tamponlarında %0,6'lık (w/v) kazein substratı hazırlanmıştır. Daha sonra bu substratlara karşı enzim karışımının göstermiş olduğu aktivite standart kantitatif yöntem ile optimum sıcaklık değerinde belirlenmiştir.

### **3.3.3. İnhibitör ve metal iyonlarının proteaz enzimi üzerine etkisi**

Saf proteaz enziminin koenziminin belirlenmesi amacıyla EDTA ve PMSF'nin enzim üzerine etkisi araştırılmıştır. Yine aktivatör olabilecek metal iyonlarının belirlenmesi için  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$  metal iyonları kullanılmıştır. PMSF 0,5 ve 5 mM konsantrasyonlarında 2-propanol ile hazırlanmış ve diğer inhibitör ve aktivatörler 5 mM olacak şekilde pH 7,5 50 mM Tris-HCl tamponunda hazırlanmış ve saflaştırılmış enzim örneği ile her bir maddenin 1:1 oranında muamele edildikten sonra proteaz enzim aktivitesi tayin edilmiştir (Tekin, 2008; Sarı, 2011). Kör, 50 mM pH 7,5 Tris-HCl tamponu içinde çözülmüş 5 mM aktivatör/inhibitörün aynı tampon ile 1:1 oranında karıştırılması ile hazırlanmıştır.

Aktivatör/inhibitör ile muamele edilmemiş enzim örneğinin aktivitesi 100 olarak kabul edilmiş, muamele edilen örneklerin aktivitesi % (kalan aktivite) cinsinden verilmiştir.

### **3.3.4. Organik çözücülerin proteaz enzimi üzerine etkisi**

Saf haldeki proteaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisinin belirlenmesi amacıyla Sarı (2011)'de verilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Modifiye edilen yöntem, 2-Propanol, Aseton, Benzen, Etanol, DMSO ve Toluen çözücülerinin proteaz enzimi ile 1:1 oranında muamele edilmesi şeklinde uygulanmış ve derhal proteaz enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. Kör numuneler, her bir kimyasal madde için ayrı ayrı hazırlanmış ve inaktif enzim yerine çözücülerin 50 mM pH 7,5 Tris-HCl tamponu ile 1:1 oranında karıştırılması ile hazırlanmıştır. Organik çözücüler ile muamele edilmemiş enzim örneğinin aktivitesi 100 olarak kabul edilmiş, muamele edilen örneklerin aktivitesi % (kalan aktivite) cinsinden verilmiştir.

### **3.3.5. Hidrojen peroksit ve yüzey aktif maddelerin proteaz enzimi üzerine etkisi**

Saf proteaz enzimi üzerine hidrojen peroksit ve yüzey aktif maddelerin etkisinin belirlenmesi amacıyla 50 mM pH 7,5 Tris HCl tamponunda hazırlanmış Tween-80, Triton X-100 ve SDS'in %1 (v/v), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin % 2 ve 5'lik (v/v) çözeltileri proteaz enzimi ile 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra proteaz enzim aktivitesi tayini yapılmıştır (Tekin, 2008). Kör numuneler, her bir yüzey aktif madde ve hidrojen peroksit konsantrasyonları için ayrı ayrı hazırlanmış ve inaktif enzim yerine bu kimyasalların 50 mM pH 7,5 Tris-HCl tamponu ile 1:1 oranında karışımının kullanılması ile hazırlanmıştır. Yüzey aktif madde ve hidrojen peroksit ile muamele edilmemiş enzim örneğinin aktivitesi 100 olarak kabul edilmiş, muamele edilen örneklerin aktivitesi % (kalan aktivite) cinsinden verilmiştir.

### **3.3.6. Proteaz enziminin substrat spesifitesinin belirlenmesi**

Proteaz enziminin kazein, BSA ve fibrinojen substratlarına karşı aktivitesi araştırılmıştır. Substrat spesifitesinin belirlenmesi amacıyla Sarı (2011)'de verilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla, kazein, BSA ve fibrinojen %0,6'lık (w/v) olacak şekilde 50 mM pH 7,5 Tris-HCl tamponu içerisinde hazırlanmış ve standart protokolde substrat yerine kullanılmış ve proteaz enzim aktivitesi tayin

edilmiştir. Her bir substrat çeşidi için ayrı kör hazırlanmış ve inaktif enzim kullanılmıştır.

Proteaz enziminin substrat spesifitesinin belirlenmesinde substrat olarak kazeinin kullanıldığı reaksiyon sonucu aktivite 100 olarak kabul edilmiş ve diğer substratlardan elde edilen aktivite % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır.

### 3.3.7. Michaelis Menten Eşitliği ve Lineweaver Burke grafiği

Saflaştırılan proteaz enziminin kinetik sabitlerinin belirlenmesi için Sarı (2011) ve Kumarı ve ark., (2015)'te verilen yöntemleri birleştirip modifiye edilmiştir. Bu amaçla 50 mM pH 7,5 Tris-HCl tamponu ile %0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4 ve 1,6'lık (w/v) kazein substrat çözeltisi hazırlanmış ve proteaz enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. Substratların başlangıç konsantrasyonları "S", enzim aktiviteyi "V" olarak kabul edilmiş, grafiğe 1/S ve 1/V şeklinde yerleştirilerek Lineweaver-Burke grafiği oluşturulmuştur. Elde edilen grafiğin eğimi Michaelis Menten eşitliğinde kullanılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  sabitleri bulunmuştur. Farklı konsantrasyonlara sahip kazein substratı hazırlanmak için %1,6 (w/v) stok hazırlanmış ve Çizelge 3.8'de verilen hacimler çekilerek diğer konsantrasyonlarda substratlar hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyon değeri için ayrı kör numune hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.8.** Farklı konsantrasyonlara sahip substratların hazırlanması

İstenen Kazein Kons. (%)	Kazein Stok Kons. (%)	Stoktan Çekilecek Miktar (µl)	Eklenecek Tampon Miktarı (µl)	Final Hacim (ml)
0,2	1,6	250	1750	2,00
0,4	1,6	500	1500	2,00
0,6	1,6	750	1250	2,00
0,8	1,6	1000	1000	2,00
1,0	1,6	1250	1250	2,00
1,2	1,6	1500	1500	2,00
1,4	1,6	1750	1750	2,00

Yukarıda anlatılan yönteme göre göre  zilen Lineweaver-Burk grafiğinde, eğim  zgisinin “-“ (eksi) değerleri de göstermesi için grafik üzerine saç tıklama yapılıp, eğim  zgisini biçimlendir sekmesi seçilmiştir. Karşımıza çıkan ekranda “ ng r ” bölümde yer alan “ileri” ve “geri” dönemler kutucularına 10 değerleri girilerek eğim  zgisinin “-“ değerleri de göstermesi sağlanmıştır.  zilen grafik sayesinde elde edilen eğim “m” olarak kabul edilmiştir. Aşağıda verilen Michaelis Menten eşitliği ve  $y = mx + b$  denklemlerinde yerine konularak  $K_m$  ve  $V_{max}$  kinetik sabitleri bulunmuştur. Ek olarak, sadece eğimin kullanılması yetmemekte, herhangi bir konsantrasyon ve bu konsantrasyona ait hız ( $1/S$  ve  $1/V$ ) değerleri seçilerek (3.4) ve (3.5)’te verilen eşitlikte yerine konulmuştur.

#### Michaelis Menten Eşitliği

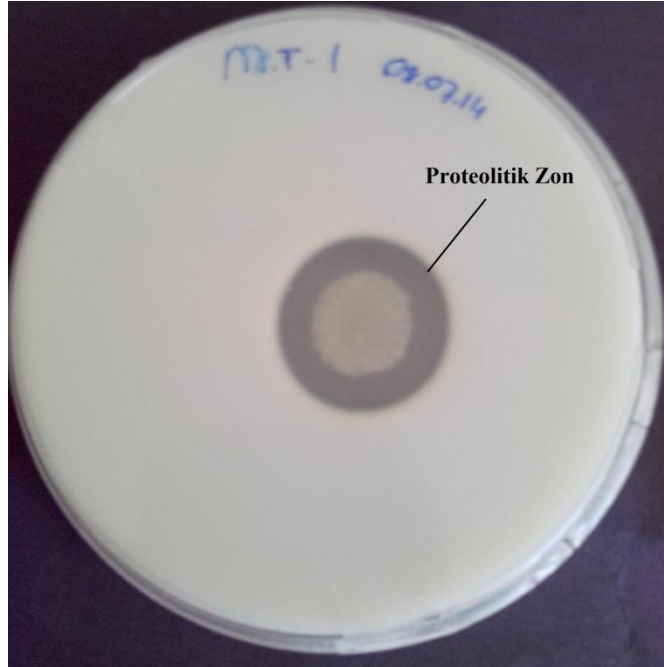
$$\left(\frac{1}{V}\right) = \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right) * \left(\frac{1}{S}\right) + \left(\frac{1}{V_{max}}\right) \quad (3.4.)$$

$$m = \frac{K_m}{V_{max}} \quad (3.5)$$

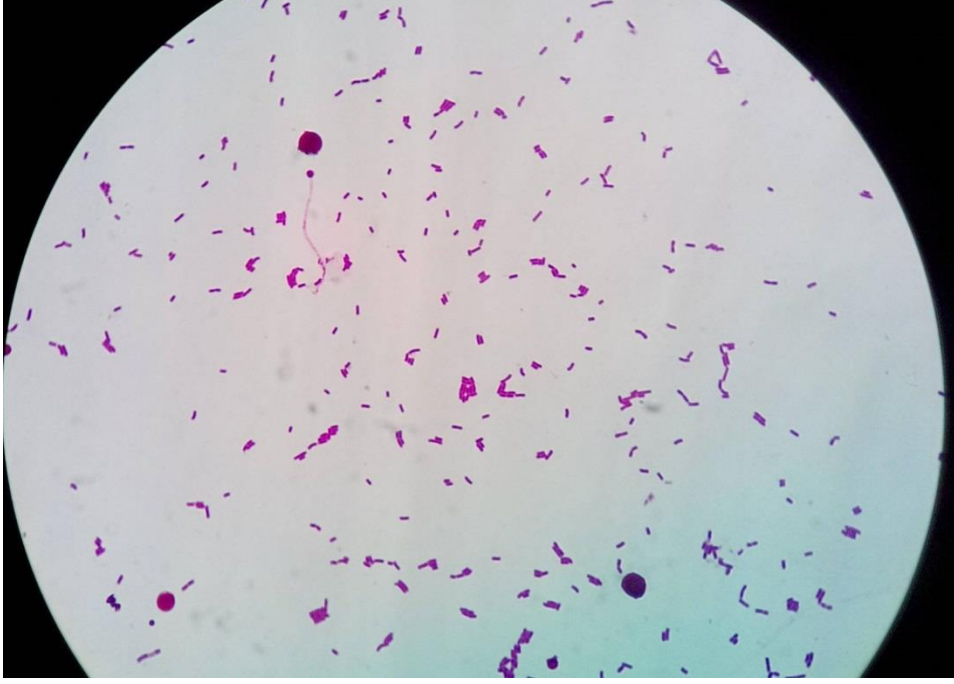
## 4. BULGULAR

### 4.1. Proteaz Üretici Mikroorganizma

En iyi proteaz üreticisi mikroorganizmanın elde edilmesi amacıyla, Çorum/Ulu Mezarlık mevkiinden alınan topraktan PCSMA katı besiyerinde yapılan ekimler sonucunda koloni etrafında şeffaf zon oluşturan, morfolojik görünümleri farklı 6 adet koloni izole edilmiştir. Elde edilen kolonilerden PCSMA katı besiyerine çizgi ekim metoduyla tekrar ekim yapılmış ve 24 saatlik inkübasyon sonrasında en büyük şeffaf zon oluşturan MT01 numaralı izolat seçilmiştir ve bu izolata ait proteolitik aktivitenin şeffaf zonu Şekil 4.1’de gösterildiği gibidir. Seçilen izolata gram boyama ve mikroskopik yöntemler ile saflık kontrolleri yapıldıktan sonra, identifikasyonu amacıyla 16 s rRNA dizi analizi yaptırılmıştır. Seçilen MT01 mikroorganizmasının ışık mikroskobu görüntüsü Şekil 4.2’de verilmiştir.

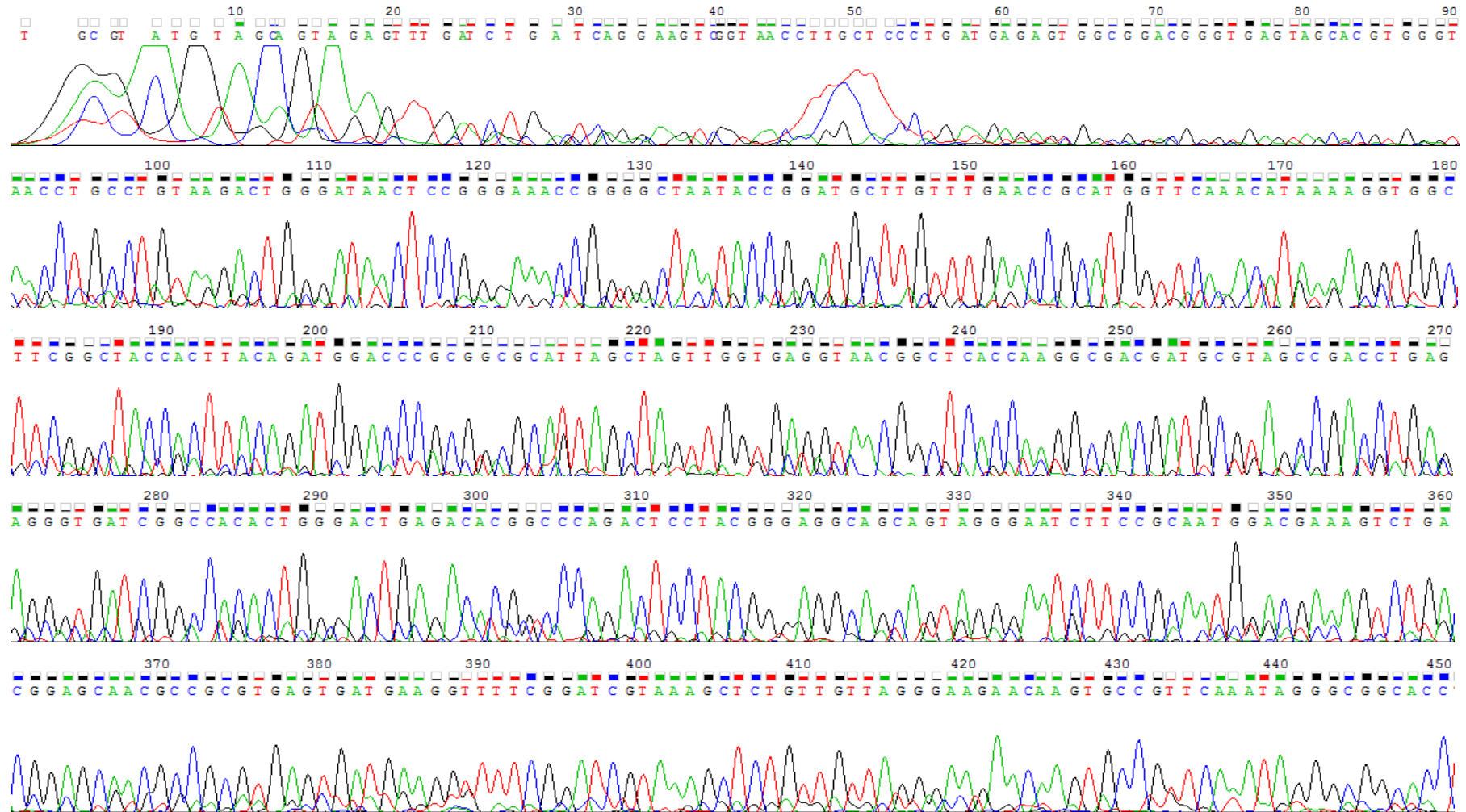


Şekil 4.1. MT01 mikroorganizmasının proteolitik aktivitesi sonucu oluşan şeffaf zon

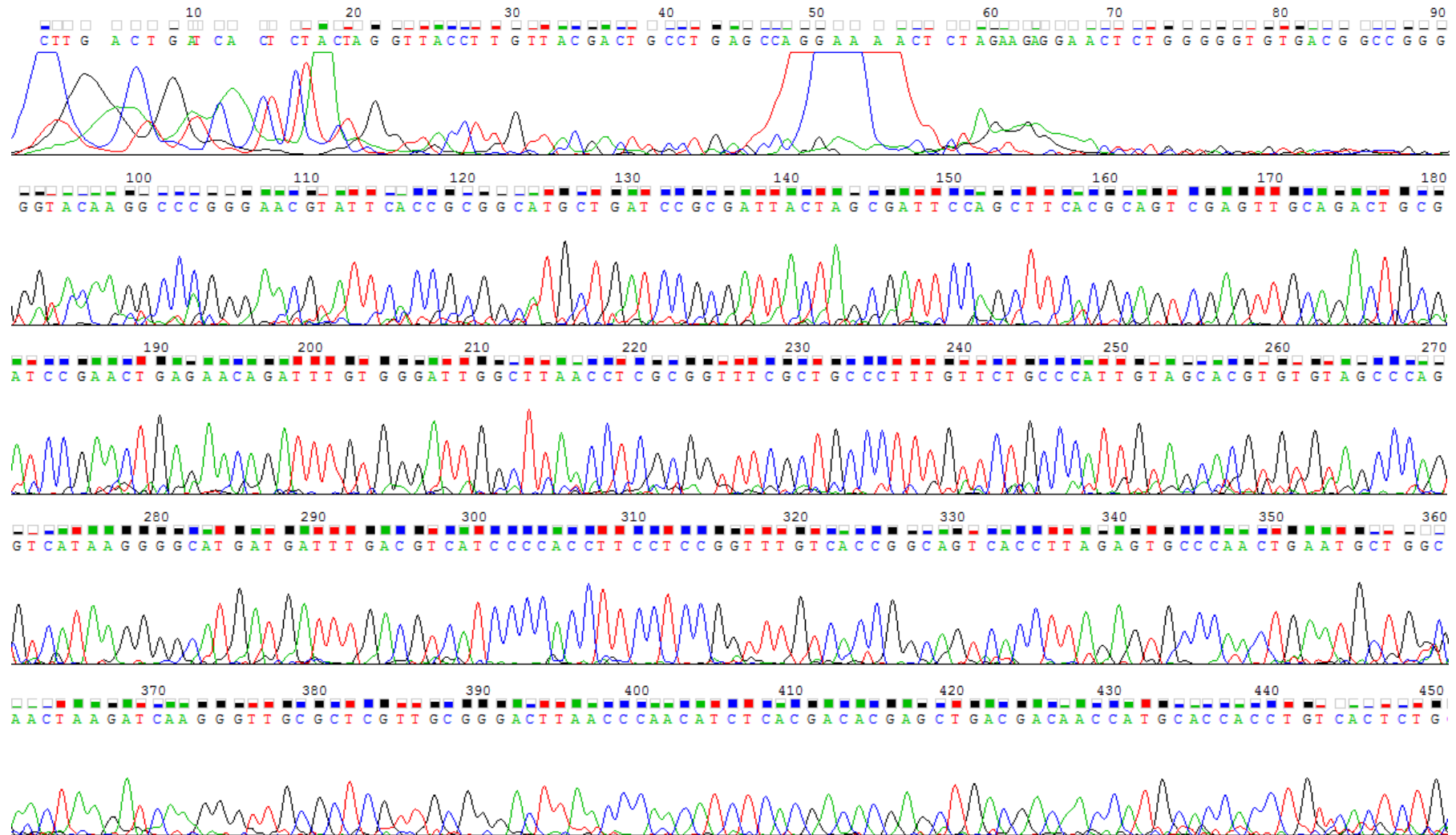


**Şekil 4.2.** MT01 mikroorganizmasının ışık mikroskobu görüntüsü

Gram pozitif basil görünümündeki proteaz üretici mikroorganizmanın 27F ve 1492R bakteri primerleri ile yapılan 16s rRNA dizi analizi sonucu “Chromas” programı ile elde edilen kromotogram görüntüleri ve nükleotid dizisi sırasıyla Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’te verilmiştir.



Şekil 4.3. 27F primeri ile elde edilen 16s rRNA dizi analizi kromotogramı

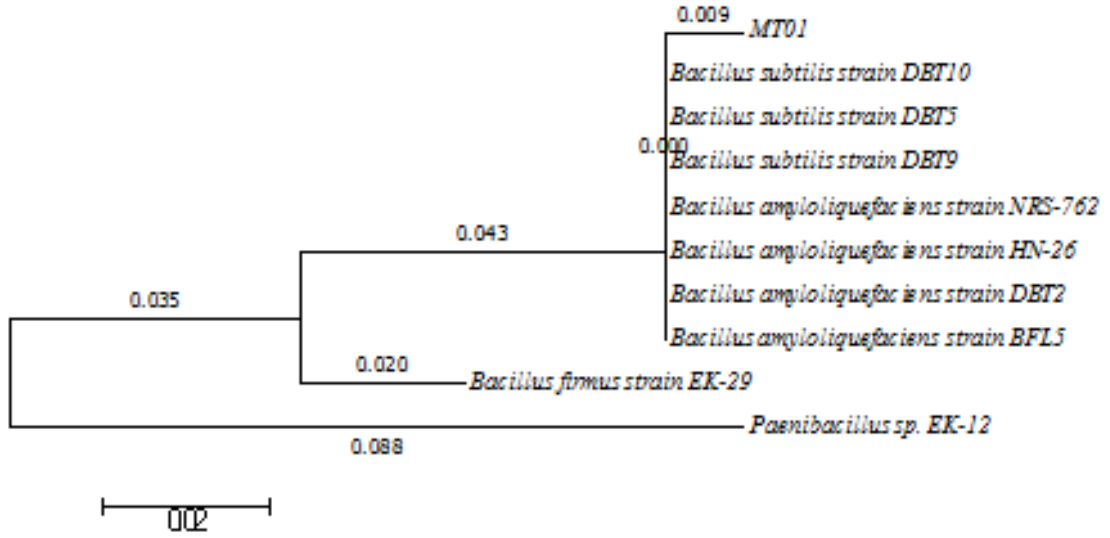


Şekil.4. 4. 1492R primeri ile elde edilen 16s rRNA dizi analizi kromotogramı

TGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCG  
CCTGGGGAGACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG  
GTGGAGCATGTGGTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTCTTGACATCC  
TCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGG  
TTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTG  
ATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAG  
GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA  
CAATGGGCAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTT  
CTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGC  
GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACCCCCGGCCGTCACACCC  
CCAGTCCCTGATGAGAGTGGCGGACGGGTGAGTAGCACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGA  
CTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTC  
AAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGT  
TGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC  
CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC  
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGT  
AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTA  
CCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA  
AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGT  
GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGTGAACCTGAGTGCAGAAG  
AGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGAGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGT  
CCGAAGGCGA

**Şekil 4.5.** 16s rRNA dizi analizi sonucu elde edilen nükleotid dizisi

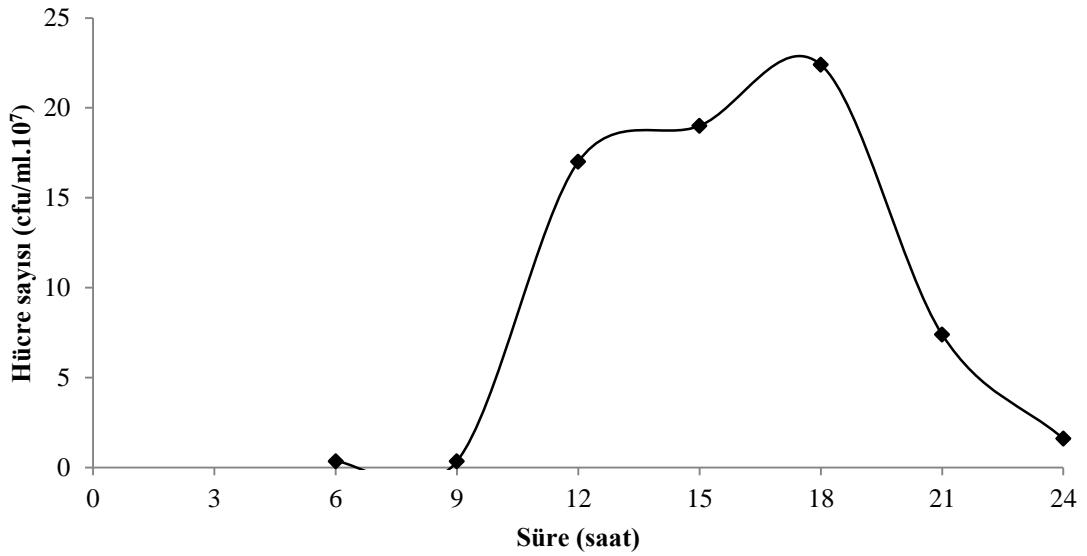
Elde edilen dizinin blast analizi sonucunda *Bacillus sp.* türü bakteri olduğu anlaşılmış ancak tam tür tayini tez kapsamında yapılmamıştır. Elde edilen dizi, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) adresinde blast edildikten sonra en yakın türler ile akrabalık ilişkisi Mega 6 programı kullanılarak clustalW programına göre sıralanmış ve bootstrap soy ağacı neighbourjoining algoritmasına göre belirlenmiştir. Elde edilen soyağacı Şekil 4.6'teki gibidir.



Şekil 4.6. *Bacillus* sp. MT01 izolatının soy ağacı

#### 4.1.1. *Bacillus* sp. MT01 izolatının Büyüme Eğrisi

*Bacillus* sp. MT01 izolatının büyüme eğrisinin çıkartılması amacıyla 24 saat boyunca her 3 saatte bir alınan örneklerden yapılan ekimler sonucunda elde edilen büyüme Şekil 4.7’de verilmiştir.

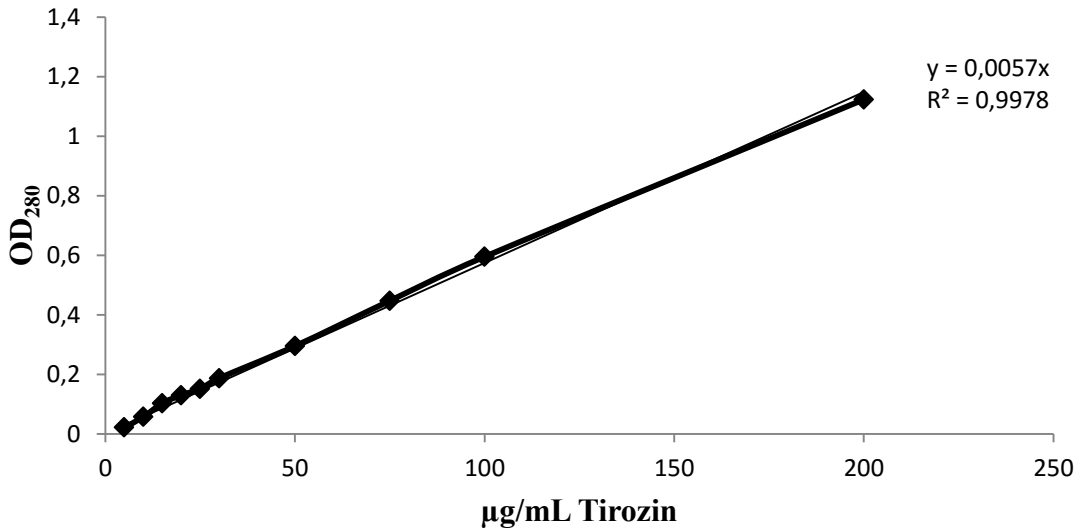


Şekil 4.7. *Bacillus* sp. MT01 mikroorganizmasına ait büyüme eğrisi

Bu grafiğe göre *Bacillus sp.* MT01 izolatı 12'nci saatte logaritmik büyümesini tamamlamaktadır. Organizmanın ikilenme süresi  $G=t/n$  formülüne göre hesaplandığında 32,345 dk olarak bulunmuştur.

#### 4.2. Kantitatif Proteaz Aktivitesi

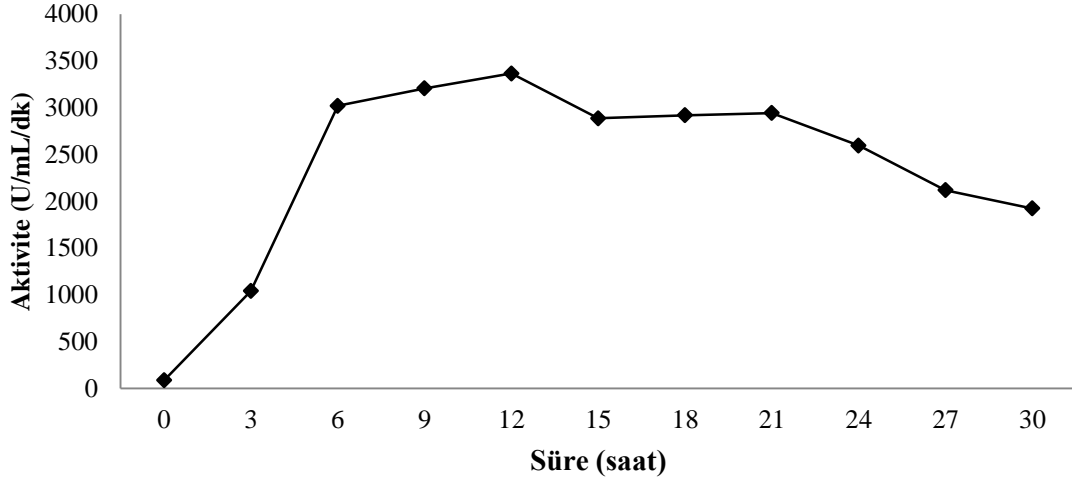
Kalitatif olarak PCSMA besiyerinde en yüksek açılma zonu gösteren koloninin salgılamış olduğu proteaz enzim aktivitesi, kantitatif olarak spektroskopik yöntemler ile ölçülmüştür. Bunun için, aktivite tanımına bağlı olarak, enzimin dakikada substratın hidrolizinden açığa çıkarttığı tirozin amino asidi miktarı hesaplanmıştır. Hesaplama için gerekli olan tirozin standart eğrisi Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8. Tirozin standart eğrisi

#### 4.3. Optimum Proteaz Enzim Üretim Zamanı

*Bacillus sp.* ekstraselüler proteazın saflaştırılması için enzim hasatının gerçekleştirilmesi gereken saatin belirlenmesi amacıyla 24 saat boyunca yapılan ölçümler sonucunda optimum proteaz üretim zamanı belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.9'da verilmiştir.



**Şekil 4.9.** Optimum proteaz enzim üretiminin gerçekleştiği inkübasyon süresi (Reaksiyon sıcaklığı 50°C ve pH: 7,5)

Şekil 4.9'da optimum enzim üretiminin inkübasyonun 12'nci saatinde gerçekleşmesinden yola çıkarak büyüme eğrisi üzerinden yorumlama yapıldığında; maksimum proteaz enzimi üretiminin logaritmik fazın sonu ve durgun fazın başlangıç kısmı arasında gerçekleştiği görülmektedir. Buna göre daha sonra yapılan enzim üretimi çalışmalarında mikroorganizma inkübasyonunun 12. saatinde enzim hasatı yapılmıştır.

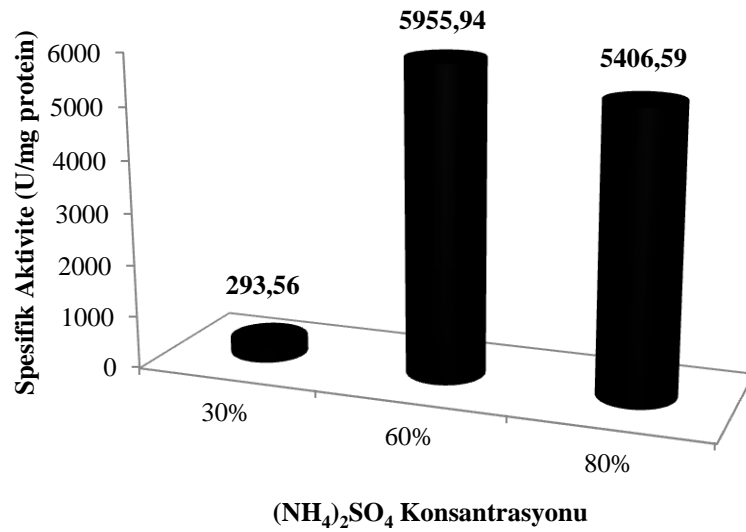
#### 4.4. Ekstraselüler Proteaz Enzim Üretimi ve Saflaştırılması

Bir litre PCSMB besiyerine 18 saat boyunca aktive edilen kültürden %1 olacak şekilde inokülasyon yapılmış ve 37 °C'de 150 rpm'de çalkalamalı olarak 12 saat boyunca inkübasyon yapılmıştır. Süre sonunda kültür, 6000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırılmış ve kültür süpernatantı alınmıştır. Alınan kültür süpernatantı içerisinde yer alan proteaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi olarak saflaştırılmıştır.

##### 4.4.1. Amonyum sülfat ile kısmi saflaştırma

Ekstraselüler proteaz enziminin kısmi olarak saflaştırma işlemi amonyum sülfat yöntemi kullanılarak %30-60 ve 80 konsantrasyonlarında konsantre edilerek gerçekleştirilmiştir. Amonyum sülfat ile çöktürme ile elde edilen fraksiyonlar 10000 Da

cut off değerine sahip diyaliz membranı kullanılarak 50 mM sodyum fosfat tamponuna (pH 6,5) karşı +4 °C'de gece boyu diyaliz edilmiştir. Diyaliz işlemleri sonrası tüm örneklerden 0,5 ml enzim karışımı alınmış ve %0,6'lık kazein substrat ile karıştırılarak 30 °C'de 20 dakika boyunca enzimin substratı hidroliz etmesi sağlanmıştır. Sonrasında 2,5 ml TCA çözeltisi ilave edilerek reaksiyon sonlandırılmış ve 30 dakika daha aynı sıcaklıkta proteinlerin presipite olması amacıyla bekletilmiştir. Süre bitiminde karışım 6000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve UV spektrofotometrede 280 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek proteaz enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Protein miktarının belirlenmesi içinse diyaliz işlemi sonrası tüm örneklerden 0,05 ml enzim karışımı alınmış ve üzerine 1,0 ml Bradford reaktifi eklenerek karanlık ortamda oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. Süre sonunda 595 nm dalga boyun absorbans ölçülerek protein miktarı hesaplanmıştır. Elde edilen proteaz enzim aktivitesi ve protein miktarı sonuçlarından spesifik aktivite hesaplanmıştır. Elde edilen spesifik aktivite grafiği Şekil 4.10'da verilmiştir.



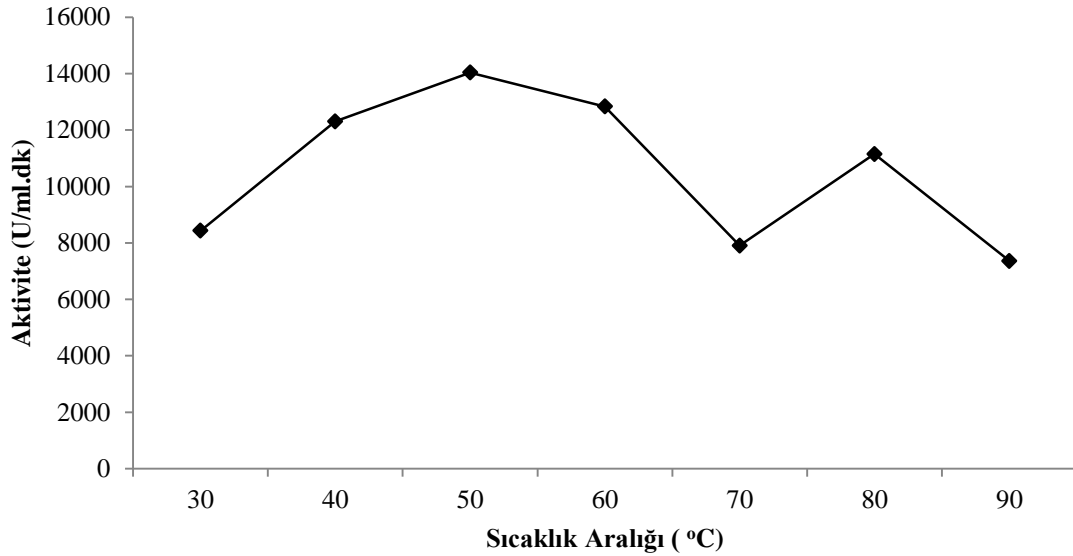
**Şekil 4.10.** Diyaliz sonrası elde edilen fraksiyonların spesifik aktiviteleri (Reaksiyon sıcaklığı 30°C ve pH: 6,5)

Diyaliz sonrası elde edilen fraksiyonların spesifik aktiviteleri Şekil 4.10'da verildiği gibidir. %60'lık konsantrasyona sahip fraksiyon en yüksek spesifik aktiviteye sahip olmasına rağmen ileri ileri saflaştırma ve karakterizasyon işlemleri için %80'lik fraksiyon ile işlemlere devam edilmiştir. Sebebi ise; %60'lık fraksiyonun protein

miktarının çok düşük olması ve ileri saflaştırma işlemlerinde yüksek verim elde edilmesinin amaçlanmasıdır.

#### Kısmi olarak saflaştırılan enzim karışımının termal aktivite ve termal stabilitesi

Kısmi saflaştırma sonrası elde edilen proteaz enzim karışımının termal aktivitesi ve termal stabilitesi belirlenmiştir. Optimum sıcaklığın belirlenmesi için; 0,5 ml enzim karışımı 50 mM sodyum fosfat pH 6,5 tamponu ile hazırlanmış % 0,6'lık (w/v) kazein substratı ile rastgele seçilen 7 farklı sıcaklıkta (30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C) inkübe edilerek standart proteaz enzim aktivitesi protokolüne göre reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.11'de verildiği gibidir. Buna göre proteaz enzim karışımının optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 50 °C olarak ölçülmüştür.

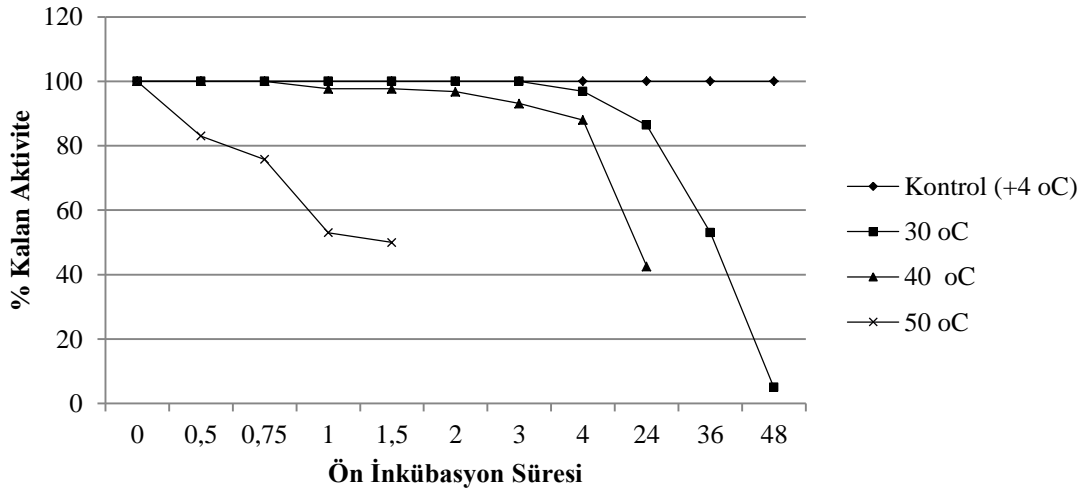


**Şekil 4.11.** Kısmi olarak saflaştırılan enzim karışımının termal aktivitesi (pH: 6,5)

Elde edilen grafiklere göre amonyum sülfat çöktürme sonrasında iki adet optimum sıcaklık değerinin gözlemlenmesinin gerekçesi, enzim karışımının saf olmamasından ileri geldiği öngörülmüştür. Bu nedenle enzim ileri saflaştırma teknikleri ile saflaştırılmıştır. Daha yüksek enzim aktivitesi elde edilen sıcaklık değeri olan 50°C

optimum sıcaklık olarak belirlenmiş ve bundan sonraki çalışmalarda enzimatik reaksiyon, 50°C’de gerçekleştirilmiştir.

Proteaz enzim karışımının sahip olmuş olduğu termal stabilitenin belirlenmesi için, 0,5 ml enzim karışımı, optimum olarak belirlenen sıcaklık (50 °C) ve bunun altındaki sıcaklıklarda enzim aktivitesi başlangıç aktivitesinin yarısına düşünceye kadar olan sürede inkübe edilmiş, daha sonra optimum sıcaklık değerinde aktivite reaksiyonuna tabi tutulmuşlardır. Buna göre elde edilen değerler Şekil 4.12’deki gibidir.



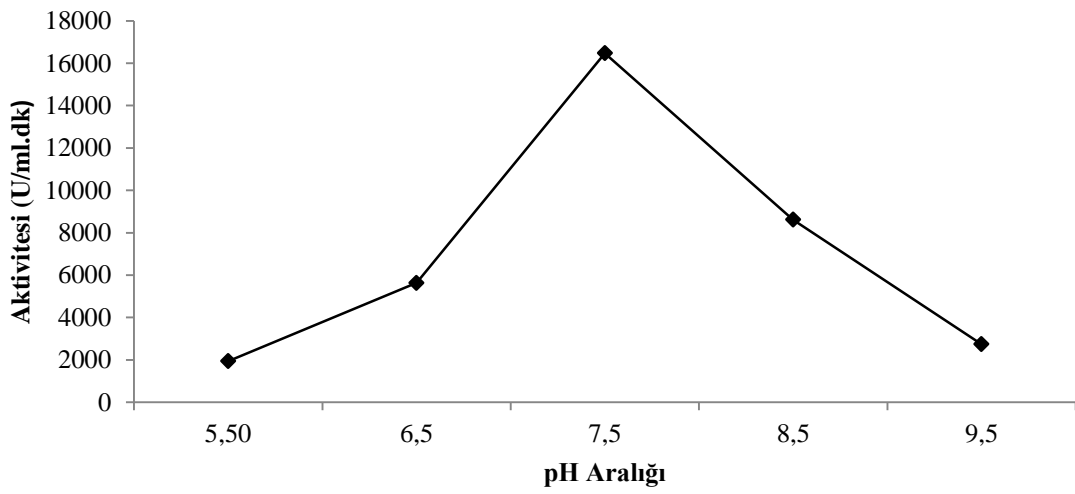
**Şekil 4.12.** Kısmi olarak saflaştırılan enzim karışımının termal stabilitesi

Buna göre proteaz enzim karışımı 30 °C’de 36 saat ve 40 °C’de 24 saat inkübe edildikten sonra aktivitelerinin %50’sini korunduğu görülmüştür. 50 °C’de ise proteolitik aktivitenin 1,5 saat sonunda %50 oranında korunduğu görülmüştür.

#### Kısmi olarak saflaştırılan enzim karışımının optimum pH ve pH stabilitesi

Kısmi saflaştırma sonrası elde edilen proteaz enzim karışımının optimum pH aralığı pH 6,0, 6,5 ve 7,0 için 50 mM Sodyum-Fosfat tamponu, pH 7,5, 8,0 ve 8,5 için 50 mM Tris-HCl tamponu, pH 9,0 ve 9,5 için 50 mM Glisin-NaOH tamponlarında hazırlanmış %0,6’lık (w/v) kazein substratı ile 0,5 ml enzim karışımının en yüksek aktivitenin görüldüğü sıcaklıkta inkübe edilmesi ile belirlenmiştir. Proteaz enzim karışımının en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri 7,5 olarak ölçülmüştür. Kısmi olarak saflaştırılan

proteaz enzim karışımının pH profili Şekil 4.13'te verilmiştir. Enzim karışımının pH stabilitesinin belirlenmesi amacıyla; enzim karışımı 1:1 oranında pH 6,5, 7,5, 8,5 ve 9,5 tamponları ile karıştırılmış ve +4 °C'de 192 saat inkübe edilmiştir ve inkübasyon süresi boyunca her 24 saatte bir örnek alınarak standart protokole göre proteaz enzim aktivitesi optimum reaksiyon sıcaklığında ölçülmüştür. Bu süre sonunda proteaz enzim karışımlarının aktivitelerini büyük ölçüde koruduğu görülmüştür. Enzim karışımının pH stabilitesine ait veriler detaylı olarak Çizelge 4.1'de verilmiştir.



**Şekil 4.13.** Kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzim karışımının pH profili (Reaksiyon sıcaklığı 50°C)

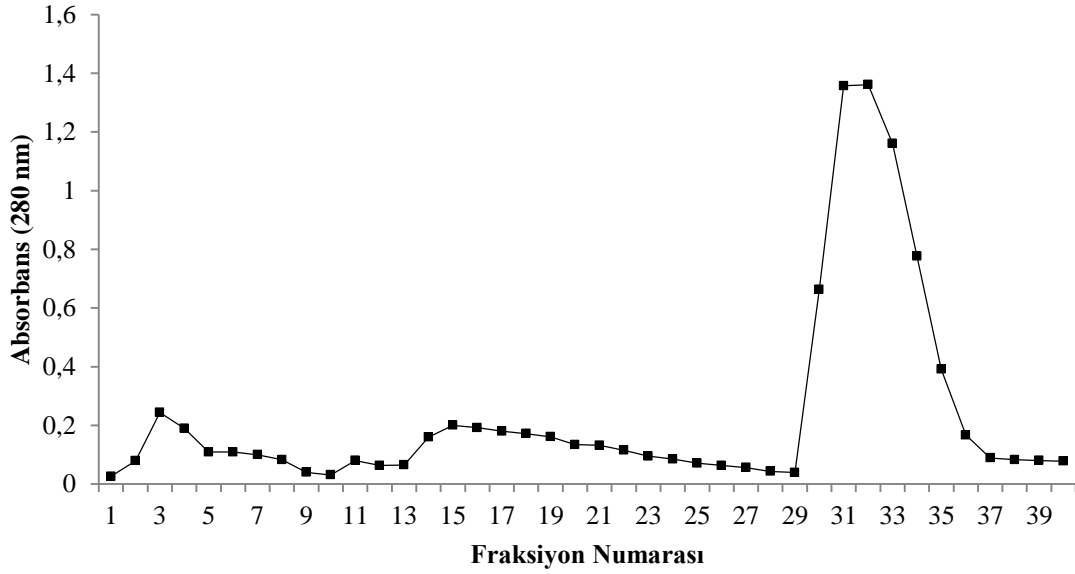
Şekilde görüldüğü gibi optimum pH 7,5 olarak belirlenmiş ve bundan sonraki çalışmalarda substrat 50 mM Tris-HCl pH: 7,5 kullanılarak hazırlanmıştır.

**Çizelge 4.1.** Kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzim karışımının pH stabilitesi (Aktiviteler % kalan aktivite cinsinden verilmiştir)

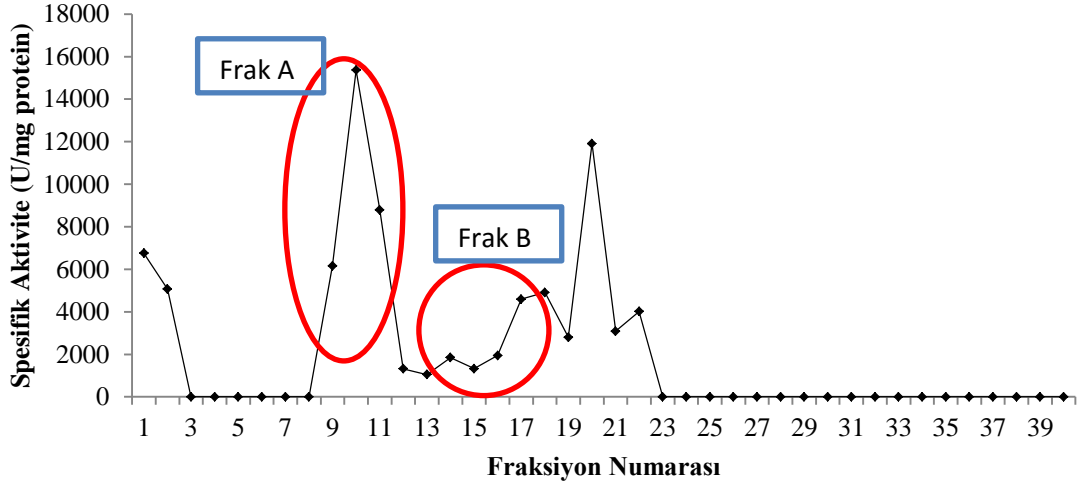
pH	0.h	24.h	48.h	72.h	120.h	168.h	192.h
5.5	100	79,6	73,28	75,36	74,32	75,83	73,09
6.5	100	86,26	81,35	81,50	80,03	79,85	78,46
7.5	100	81,84	73,21	75,73	74,84	73,77	72,75
8.5	100	79,42	74,04	74,66	74,66	71,73	72,48
9.5	100	78,92	76,81	73,83	70,11	66,10	60,47

#### 4.4.2. Jel Filtrasyon kromotografisi

Kısmi saflaştırma sonrası elde edilen konsantre örneklerden %80'lik amonyum sülfat çöktürme fraksiyonu seçilmiş ve 1,11 mg/ml protein olacak şekilde Jel filtrasyon kolonuna yüklenmiştir. Jel filtrasyon kromotografisi; 0,22 µm por çaplı şırınga filtresinden geçirilmiş proteaz enzim karışımından 1 ml olacak şekilde dolgu maddesinin üst yüzeyine yüklenmesi ve yer çekimi kuvveti yardımıyla toplamda kolon dolgu maddesi hacminin 3 katı olacak şekilde elüsyon sıvısının geçirilmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Jel filtrasyon kromotografisi sonucu elde edilen fraksiyonların 280 nm ölçümleri, proteaz aktiviteleri ve protein miktarları belirlenerek spesifik aktivite kromotogramı elde edilmiştir. Elde edilen 280 nm absorbansı ile spesifik aktivite kromotogramı sırasıyla Şekil 4.14 ve 4.15'te verilmiştir. Kromotografi işlemi 0,1 ml/dk olacak şekilde yer çekimi kuvveti ile yapılmış ve kromotografi süresince toplamda 60 ml olacak şekilde 40 fraksiyon toplanmıştır.

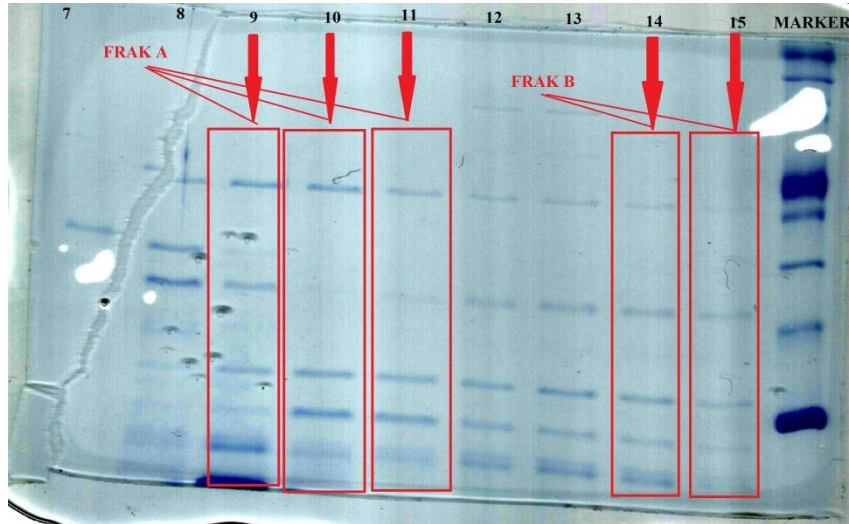


Şekil 4.14. Jel filtrasyon kromotografisi fraksiyonlarının 280 nm'deki absorbansları



**Şekil 4.15.** Jel filtrasyon kromatografisi fraksiyonlarının spesifik proteaz enzim aktiviteleri

Elde edilen fraksiyonlar spesifik aktiviteleri ve SDS-PAGE’de göstermiş oldukları bantların büyüklükleri dikkate alınarak 9-10-11 ve 14-15-16-17 no’lu fraksiyonlar birleştirilmiştir (Şekil 4.16). Yüksek spesifik aktivite gösteren 20 no’lu fraksiyonda Coomasie Brilliant Blue boyama ile dikkate değer bir protein bandı görülmüştür.

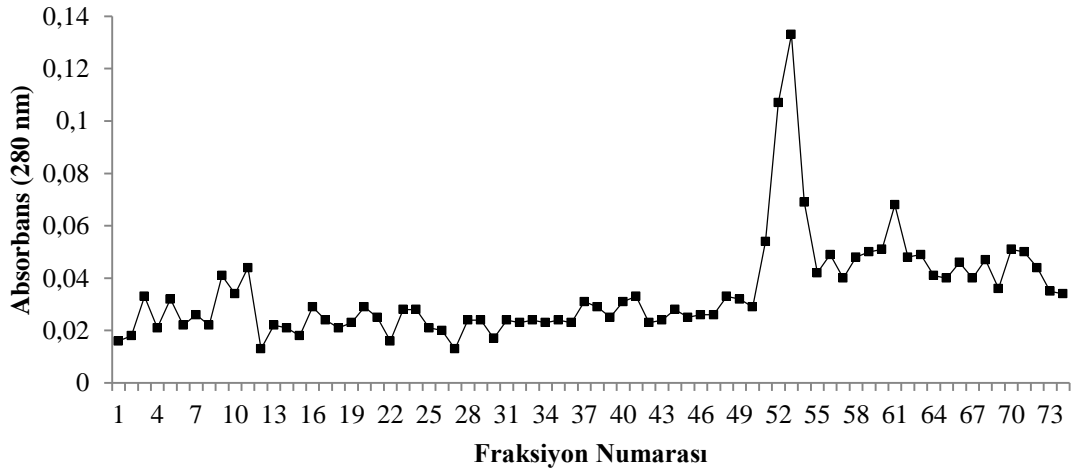


**Şekil 4.16.** Frak A ve Frak B fraksiyonlarının birleştirme öncesi SDS-PAGE görüntüleri

Birleştirilen fraksiyonlara sırasıyla Frak A ve Frak B isimleri verilerek iyon değişim kromatografisi ile daha ileri saflaştırma basamağına geçilmiştir.

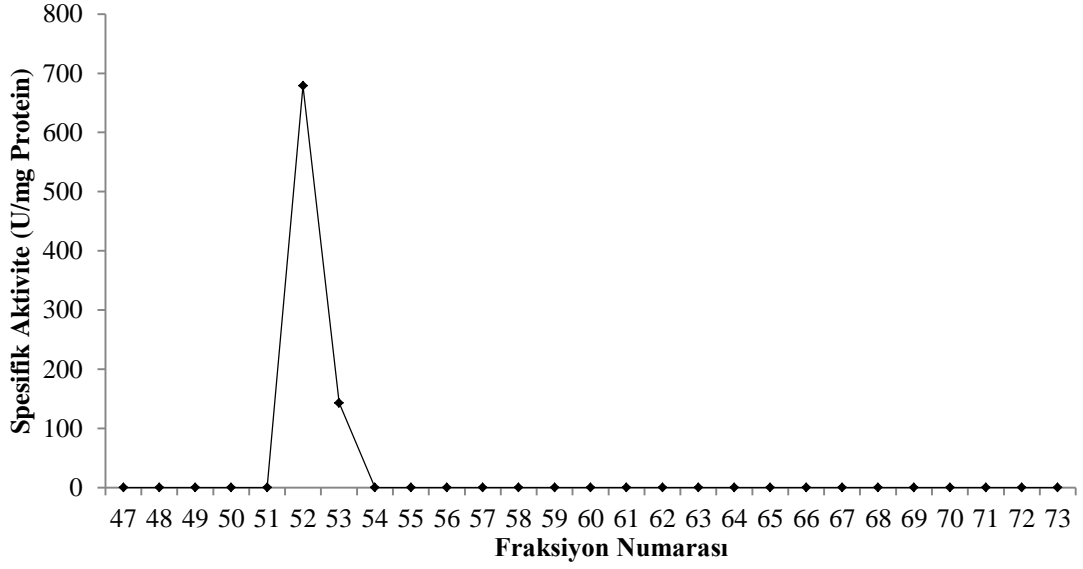
#### 4.4.3. DEAE iyon değişim kromatografisi

Jel filtrasyon kromatografisi ile elde edilen Frak A ve Frak B rejenere selüloz santrifüj filtresi (Millipore, 3 kDa cut off) kullanılarak 6000 rpm'de 30 dakika santrifüj ile konsantre edilmiş ve protein miktarları sırasıyla 0,046 ve 0,3 mg/ml olacak şekilde DEAE iyon değişim kolonuna yüklenmiştir. DEAE iyon değişim kolonu ile saflaştırma işlemi; jel filtrasyon kromatografisi ile elde edilen örneğin konsantre edilerek son hacim 0,5 ml olacak şekilde kolona yüklenmesi ve farklı tuz (NaCl) konsantrasyonlarına sahip (10 mM, 100 mM ve 1 M) 50 mM pH 7,5 Tris-HCl elüsyon tamponlarının kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. İşlem gradient olarak gerçekleştirilmiş ve farklı tuz konsantrasyonlarına sahip her bir tampondan, kolon dolgu maddesi hacminin iki katı olacak şekilde kullanılmıştır. Saflaştırma işlemi sonucunda Frak A'ya ait 73, Frak B'ye ait 41 adet fraksiyon toplanmıştır. Frak A'ya ait 280 nm kromotogramları Şekil 4.17'de verilmiştir.

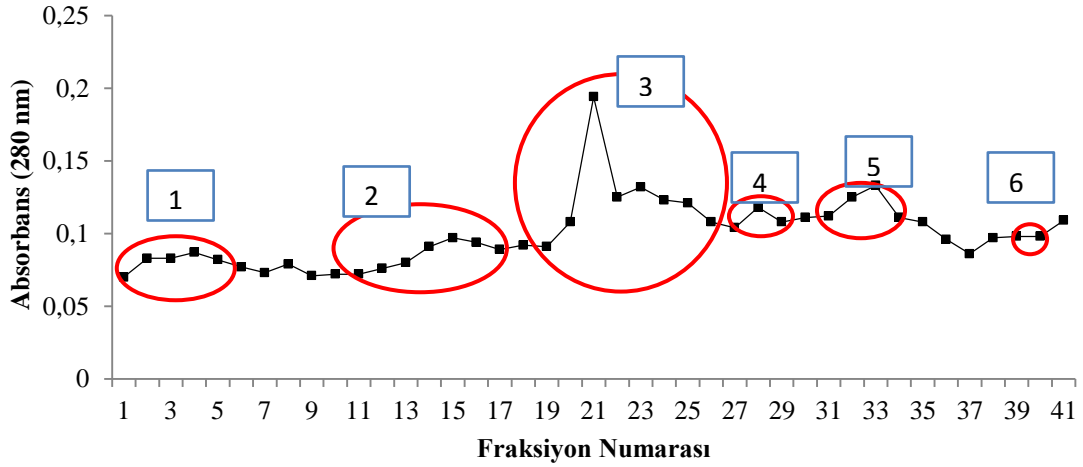


Şekil 4.17. Frak A'ya ait 280 nm kromotogramı

Kromotogramlar incelenmiş ve Frak A'ya ait fraksiyonlardan 47-73 arasındaki tüm örneklerden proteaz enzim aktivitesi ve protein miktarı belirlenerek spesifik aktivite hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.18'de verildiği gibidir.



Şekil 4.18. Frak A spesifik proteaz enzim aktivitesi kromotogramı



Şekil 4.19. Frak B'ye ait 280 nm kromotogramı. SDS-PAGE görüntülerine göre birleştirilen fraksiyonlar kırmızı halka içine alınmıştır.

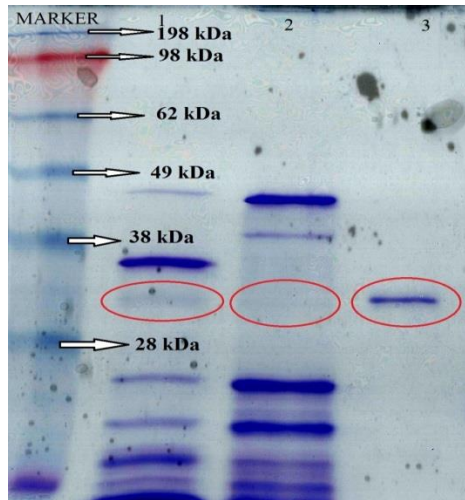
Frak B'den elde edilen fraksiyonlarda 280 nm ölçümlerindeki piklere göre birleştirmeler yapılmış ve fraksiyonlara ait proteaz enzim aktivitesi ve protein miktarı belirlenerek spesifik aktivite hesaplanmıştır (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.2.** Fraksiyon B'nin birleştirilen fraksiyonlarına ait spesifik aktivite değerleri

	<b>Birleştirilen Fraksiyonlar</b>	<b>Spesifik Aktivite (U/mg protein)</b>
<b>1</b>	1-5	19422,15
<b>2</b>	11-17	8422,75
<b>3</b>	19-26	40571,44
<b>4</b>	27-29	16130,81
<b>5</b>	31-34	0
<b>6</b>	40	1466,44

Elde edilen grafikler incelenmiş ve Frak A'dan elde edilen fraksiyonların kayda değer bir spesifik aktiviteye sahip olmaması ve Frak B'den elde edilen fraksiyonların spesifik proteaz enzim aktivitelerinin yüksek olması sebebiyle bundan sonraki işlemler için Frak B' üzerine yoğunlaştırılmıştır. Birleştirilen fraksiyonların spesifik aktiviteleri ve SDS-PAGE görüntüleri dikkate alındığında, Coomassie brilliant blue boyaması ile kayda değer protein bandı 3 no'lu fraksiyonda yaklaşık 32 kDa tek bant halinde elde edilmiştir.

Saflaştırma öncesi ve saflaştırma sonrasındaki aşamalarda alınan örnekler SDS-PAGE'e yüklenmiş ve adım adım saflaştırma basamakları jelde incelenmiştir. Elde edilen SDS-PAGE jel görüntüsü Şekil 4.20'de verilmiştir.



**Şekil 4.20.** SDS-PAGE jel görüntüsü(1: Amonyum sülfat çöktürme öncesi süpernatant; 2: Amonyum sülfat çöktürme sonrası ham enzim ekstraktı; 3: İleri saflaştırma sonrası elde edilen saf enzim)

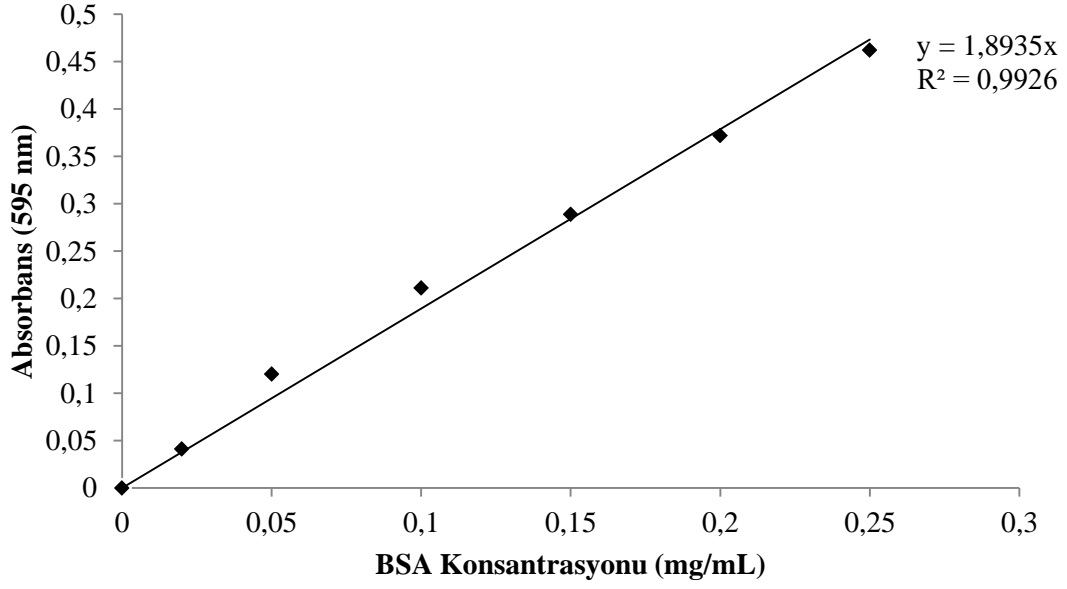
Ayrıca proteaz enziminin amonyum sülfat çöktürme öncesi süpernatant, amonyum sülfat çöktürme sonrası, jel filtrasyon ve DEAE sepharose iyon kromatografisi ile ileri saflaştırma aşamalarına ait saflaştırma profili çıkartılmış ve Çizelge 4.3'te verilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Elde edilen proteaz enzimine ait saflaştırma profili

Aşama	Toplam Hacim (ml)	Toplam protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U mg <sup>-1</sup> )	Saflaştırma Verimi (%)	Saflaştırma Katsayısı
Ham Enzim	230	51,38	771213	150010	100	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Çöktürmesi (%80)	20	19,54	329476,2	16861,6	42,7	1,12
Jel Filtrasyon Kromatografisi	6	1,8	3671,82	2039,9	0,48	0,14
DEAE Sepharose ile İyon Değişim Kromatografisi	10	0,53	2046,70	3861,7	0,27	0,26

#### 4.4.4. BSA Standart Eğrisi

Protein konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla kullanılan Bradford yöntemi için BSA standart eğrisi 4 mg/ml konsantrasyona sahip BSA stok çözeltisinden hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki BSA çözeltilerinden 0,05 ml alınarak üzerlerine 1,0 ml Bradford reaktifi eklenmesi ve karanlık ortamda oda sıcaklığında 10 dk bekletilmesi ve süre sonunda 595 nm dalga boyunda absorbansların ölçülerek elde edilen verilerin grafiğe aktarılması ile elde edilmiştir. Elde edilen grafik ve eğimi Şekil 4.21'de verilmiştir.

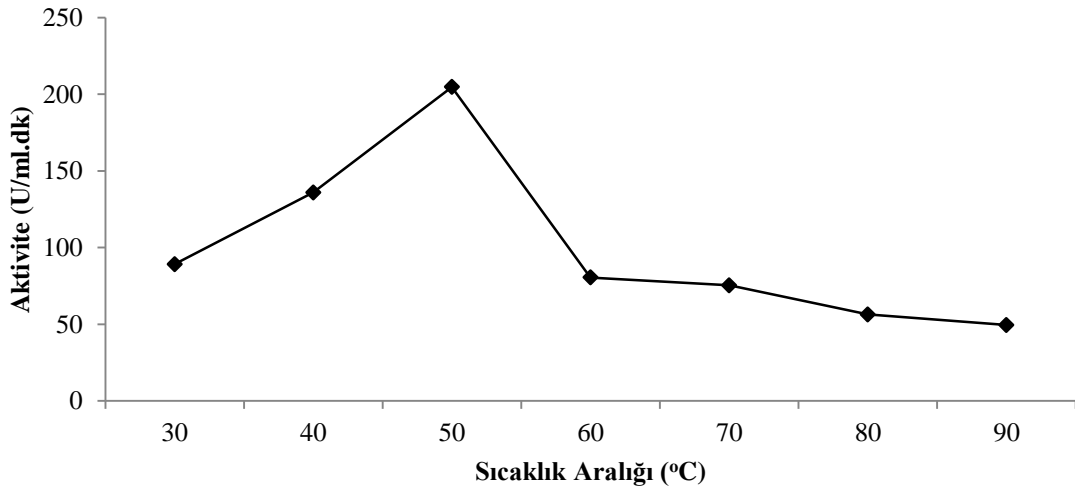


Şekil 4.21. BSA standart eğrisi

#### 4.5. İleri Saflaştırılmış Proteaz Enziminin Karakterizasyonu

##### 4.5.1. Optimum Sıcaklık ve Termal Stabilité

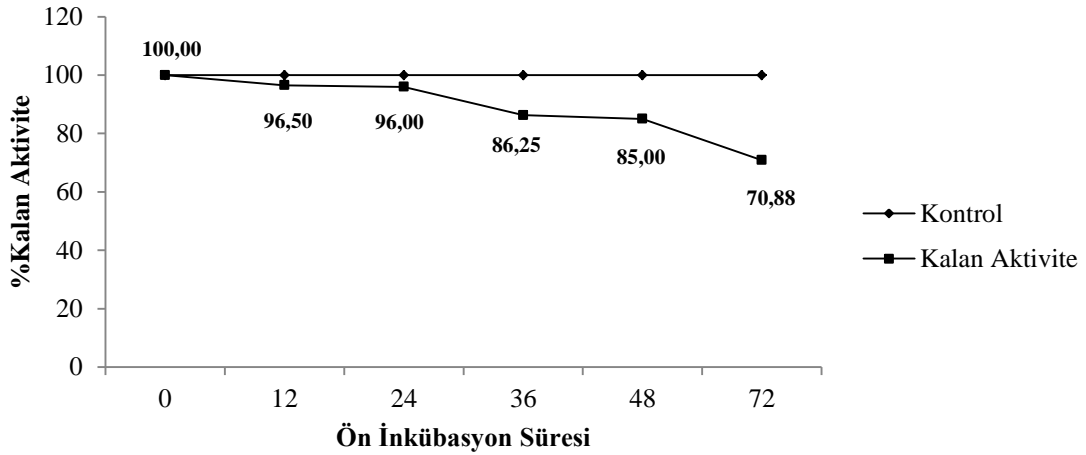
Saf proteaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık; 0,5 ml proteaz enziminin 50 mM Tris-HCl pH 7,5 tamponu ile hazırlanmış % 0,6'lık (w/v) kazein substrat ile sırasıyla 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C'de inkübasyon edilmesi ve 280 nm dalga boyunda absorbansların ölçülmesi ile belirlenmiştir.



Şekil 4.22. Saf proteaz enziminin optimum sıcaklık değeri

Saf proteaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri Şekil 4.22’de gösterilmiştir. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 50 °C olduğu tespit edilmiştir.

Saf proteaz enziminin genel kullanım sıcaklığı olarak belirlenen 30°C’deki termal stabilitesi, bu sıcaklıkta ön inkübasyona maruz bırakılmış proteaz enzim örneğinin 0,5 ml’si ile 50 mM Tris-HCl pH 7,5 tamponu ile hazırlanmış % 0,6’lık (w/v) kazein substrat reaksiyona sokulması ve 280 nm dalga boyunda absorbanların ölçülmesi ile belirlenmiştir. Ön inkübasyon işlemi uygulanmayan enzimin aktivitesi 100 kabul edilmiş ve muamele görmüş enzim örneklerinin aktiviteleri % kalan aktivite cinsinden verilmiştir. Saf proteaz enziminin termal stabilitesi Şekil 4.23’te gösterilmiştir.



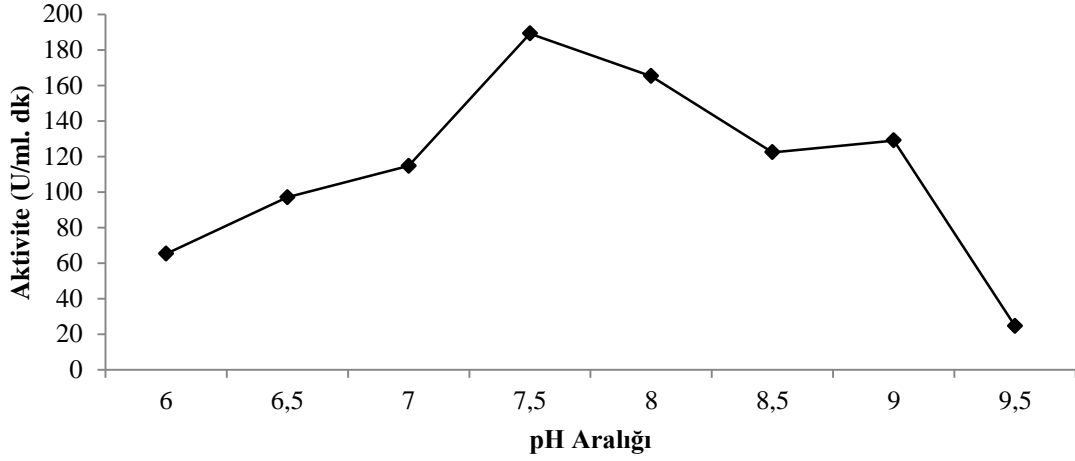
**Şekil 4.23.** Saf proteaz enziminin termal stabilitesi (Sıcaklık denemesine başlarken 0. saatte ölçülen aktivite kontrol olarak adlandırılmıştır)

Saf proteaz enziminin 30 °C ön inkübasyon koşullarında aktivitesini 72 saat boyunca %70,88 oranında koruduğu saptanmıştır. Daha önce saflaştırılmamış enzim ile karşılaştırıldığında, saf enzimin stabilitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

#### 4.5.2. Optimum pH

Saf proteaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri; 0,5 ml proteaz enziminin pH 6,0, 6,5 ve 7,0 için 50 mM sodyum-fosfat tamponu, pH 7,5, 8,0 ve 8,5 için 50 mM

Tris-HCl tamponu, pH 9,0 ve 9,5 için 50 mM Glisin-NaOH tamponlarında hazırlanmış %0,6'lık (w/v) kazein substratı ile en yüksek aktivitenin görüldüğü reaksiyon sıcaklığında inkübe edilmesi ve örneklerin 280 nm dalga boyunda absorbanlarının ölçülmesi ile belirlenmiştir. Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değeri Şekil 4.24'te göstermiştir.



**Şekil 4.24.** Saf proteaz enziminin optimum pH aralığı

Saf proteaz enziminin pH 7,5 değerinde maksimum proteaz enzim aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir.

#### 4.5.3. İnhibitör/aktivatör ve metal iyonlarının saf proteaz enzimi üzerine etkisi

Saf proteaz enzimi üzerine inhibitör/aktivatör ve metal iyonlarının etkisi; 5 mM olacak şekilde pH 7,5 50 mM Tris-HCl tamponunda hazırlanmış için  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$  metal iyonları ile saf proteaz enziminin 1:1 oranında muamele edilmesi ve muamele edilen enzim karışımının 0,5 ml'sinin pH 7,5 50 mM Tris-HCl tamponu ile hazırlanmış %0,6'lık kazein substrat ile en yüksek aktivitenin görüldüğü reaksiyon sıcaklığında inkübe edilmesi ve sonrasında 280 nm dalga boyunda absorbanların ölçülmesi ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.4'te verilmiştir. EDTA varlığında enzim aktivitesi neredeyse tamamen kaybolmuştur. 5 mM ve 0,5 mM PMSF varlığında enzim aktivitesi sırasıyla yaklaşık %86 ve %83 oranında azalmıştır.  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  varlığında enzim aktivitesi

yaklaşık %93 oranında azalmıştır. Diğer metal iyonları varlığında ise enzim aktivitesi yaklaşık %10 oranında artış göstermiştir.

**Çizelge 4.4.** İnhibitör/aktivatör ve metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri

<b>İnhibitör/Aktivatör ve Metal İyonları</b>	<b>Konsantrasyon (mM)</b>	<b>Kalan Aktivite (%)</b>
Muamelesiz Enzim	-	100
EDTA	5 mM	1,03
PMSF	5 mM	13,36
PMSF	0,5 mM	16,97
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5 mM	110,9
NaCl	5 mM	106,9
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	5 mM	6,59
CaCl <sub>2</sub>	5 mM	101,44
MnCl <sub>2</sub>	5 mM	102,9
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5 mM	101,8
CoCl <sub>2</sub>	5 mM	108,87
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5 mM	107,52

#### **4.5.4. Organik çözücülerin saf proteaz enzimi üzerine etkisi**

Saf proteaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisi; 2-propanol, aseton, benzen, etanol, DMSO ve toluen çözücülerinin proteaz enzimi ile 1:1 oranında muamele edilmesi ve muamele edilen enzim karışımının 0,5 ml'sinin pH 7,5 50 mM Tris-HCl tamponu ile hazırlanmış %0,6'lık kazein substrat ile en yüksek aktivitenin görüldüğü reaksiyon sıcaklığında inkübe edilmesi ve sonrasında 280 nm dalga boyunda absorbanların ölçülmesi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'te verilmiştir. Aseton varlığında enzim aktivitesinin yaklaşık %47 oranında kayb olduğu görülmüştür. Diğer organik çözümler varlığında ise %10-20 aralığında aktivite kaybı gözlenmiştir.

**Çizelge 4.5.** Organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkisi

<b>Organik Çözücü</b>	<b>Konsantrasyon</b>	<b>Kalan Aktivite (%)</b>
Muamelesiz Enzim	-	100
2-Propanol	1:1	74,2
Aseton	1:1	53,4
Benzen	1:1	94,3
Etanol	1:1	82,2
DMSO	1:1	97,8
Toluen	1:1	95,2

#### **4.5.5. Hidrojen peroksit ve yüzey aktif maddelerin saf proteaz enzimi üzerine etkisi**

Saf proteaz enzimi üzerine hidrojen peroksit ve yüzey aktif maddelerinin etkisi; 50 mM pH 7,5 Tris HCl tamponunda hazırlanmış Tween-80, Triton X-100 ve SDS'in %1 (v/v), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin % 2 ve 5'lik (v/v) çözeltileri proteaz enzimi ile 1:1 oranında muamele edilmesi ve muamele edilen enzim karışımının 0.5 ml'sinin pH 7,5 50 mM Tris-HCl tamponu ile hazırlanmış %0,6'lık kazein substrat ile en yüksek aktivitenin görüldüğü reaksiyon sıcaklığında inkübe edilmesi ve sonrasında 280 nm dalga boyunda absorbanların ölçülmesi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir. SDS kullanılan analizlerde oluşan beyaz renk nedeniyle ölçüm yapılamamış ve sonuç alınamamıştır. En yüksek aktivite artışı %5'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında gözlenirken, Triton X-100 varlığında yaklaşık %10'luk aktivite kaybı gözlemlenmiştir.

**Çizelge 4.6.** Saf proteaz enzimi üzerine hidrojen peroksit ve yüzey aktif maddelerinin etkisi

<b>Yüzey Aktif Madde</b>	<b>Konsantrasyon (%)</b>	<b>Kalan Aktivite (%)</b>
Muamelesiz Enzim	-	100
Tween-80	1	103,3
Triton X-100	1	90,5
SDS	1	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2	109,5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5	122,6

#### 4.5.6. Saf proteaz enziminin substrat spesifitesi

Saf proteaz enziminin substrat spesifitesi; 50 mM pH 7,5 Tris-HCl tamponu içerisinde %0,6'lık (w/v) olacak şekilde hazırlanan kazein, BSA ve fibrinojen substratlar ile 0,5 ml proteaz enziminin en yüksek enzim aktivitesinin görüldüğü reaksiyon sıcaklığında inkübe edilmesi ve sonrasında 280 nm dalga boyunda absorbanların ölçülmesi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7'de verilmiştir. Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu substratın kazein olduğu gözlemlenmiştir.

**Çizelge 4.7.** Saf proteaz enziminin substrat spesifitesi

Substrat	Konsantrasyon (%)	Aktivite (U/ml.dk)
Kazein	0,6	190,73
BSA	0,6	8,64
Fibrinojen	0,6	11

Ayrıca saf proteaz enziminin fibrinolitik aktivitesi detaylı olarak incelenmiş ve bu amaçla farklı inkübasyon süreleri uygulanarak en yüksek fibrinojen hidrolizinin gerçekleştiği reaksiyon süresi hesaplanmıştır. Yapılan uygulama sonucunda 30 dakikalık inkübasyon uygulanan denemede 11 U aktivite ile en yüksek sonuç elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar detaylı olarak Çizelge 4.8'de verilmiştir.

**Çizelge 4.8.** Farklı inkübasyon sürelerinin fibrinolitik aktiviteye etkisi

İnkübasyon Süresi	Aktivite (U/ml.dk)
20 dakika	8,64
30 dakika	11
60 dakika	9,75
120 dakika	6,28
360 dakika	2,68
720 dakika	1,59
1440 dakika	0,94

#### 4.5.7. Lineweaver Burke grafiği

Lineweaver Burke grafiği; 50 mM pH 7,5 Tris-HCl tamponu ile % 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4 ve 1,6'lık (w/v) kazein substrat çözeltilerinin 0,5 ml proteaz enzimi ile en yüksek aktivitenin görüldüğü reaksiyon sıcaklığında inkübe edilmesi ve sonrasında 280 nm dalga boyunda absorbansların ölçülmesi ile elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9'da verilmiştir. Veriler Michaelis Menten eşitliği kullanılarak hesaplama yapılmış ve  $K_m$  ve  $V_{max}$  sabitleri sırasıyla 0,574 mg/ml ve 338,1234  $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{dk}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Lineweaver Burke grafiği Şekil 4.25'da verilmiştir.

**Çizelge 4.9.** Lineweaver Burke grafiği için ham veriler

Substrat Kons. (S)	Aktivite (V)	1/S	1/V
0,2	88,98214	5,0	0,011238
0,4	143,3929	2,5	0,006974
0,6	177,375	1,666667	0,005638
0,8	196,8214	1,25	0,005081
1	217,25	1,0	0,004603
1,2	229,0357	0,833333	0,004366
1,4	252,4107	0,714286	0,003962
1,6	248,6786	0,625	0,004021

$$\left(\frac{1}{V}\right) = \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right) * \left(\frac{1}{S}\right) + \left(\frac{1}{V_{max}}\right)$$

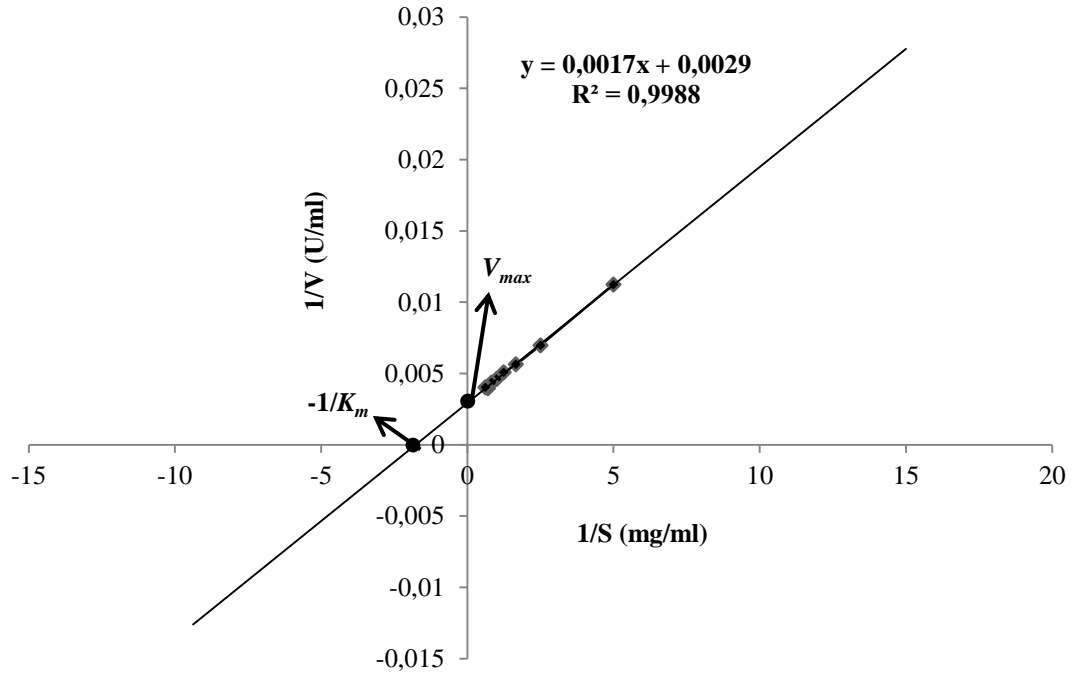
$\frac{K_m}{V_{max}}$  = Eđim; grafikte görüldüđü üzere eđim 0,0017 dir. Denklemdede bu deđeri yerine koymak için öncelikle herhangi bir 1/S deđeri ve bu deđere ait 1/V deđeri sečilir ve denklemdede yerine konarak ařađıdaki gibi hesaplama yapılır.

$$0,004021 = 0,0017 * 0,625 + (1/V_{max})$$

$$1/V_{max} = 0,0029575$$

$$V_{max} = 338,123 \mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{dk}^{-1}$$

$$K_m = 0,574 \text{ mg/ml}$$



Şekil 4.25. Lineweaver Burke grafiği

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikrobiyal kaynaklı proteazlar üretim kolaylığı ve sürekliliği gibi avantajlar nedeniyle bitkisel ve diğer proteaz kaynaklarına göre daha fazla ilgi görmektedirler. Bunun yanı sıra proteaz üretici kaynaklarının çokluğu ve buna bağlı olarak elde edilen proteazların spesifik özelliklerindeki farklılıklarda kullanım alanlarına uygun olarak diğer bir avantaj sağlamaktadır. Bakteriyal proteazların popüler hale gelmesinin en büyük nedenlerinden biri uygulama alanlarının çok geniş olmasıdır. Deri işlenmesi, farmasötik, tekstil, gıda endüstrisi, evsel ve endüstriyel atıkların giderimi, biyoaktif peptid üretimi, gıda alerjenlerinin giderimi, kontakt lens temizliği, ipek işlenmesi gibi alanlar başta gelen uygulamalardır.

Proteaz üretici kaynak olarak en çok tercih edilen tür *Bacillus* türleridir. Bu tür içerisinde ise en çok ilgi gören ve kullanılan türler *B. amyloliquifaciens*, *B. mojavensis*, *B. subtilis* ve *B. licheniformis*'tir. Tez kapsamında topraktan izole edilen altı proteaz üreticisi arasında en yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenen izolatın 16s rRNA bölgesi, universal bakteri primerleri ile çoğaltılmış ve 1249 nükleotidlik amplikon elde edilmiştir. Dizi analizi sonrası soyağacı çıkartıldığında izolatımızın *Bacillus* türü olduğu kesinleşmiş ancak tür olarak *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens* türleri ile eşit uzaklıkta akrabalık göstermiştir.

Bakteriyel sınıflandırmada daha önce kullanılan moleküler teknikler, GC içeriği (Sigal ve ark., 1963), plazmid profileme ve genetik transformasyona uyumluluk (Perry ve Slade, 1961) temellerine dayanmaktayken günümüzde, nükleotid dizi analizi ve hibridizasyona dayalı iki temel moleküler uygulama, bakteri taranması ve tanımlama yaygın kullanılan yöntemlerdir. Southern (Inacio ve ark., 2008; Nilsson ve ark., 2000), PCR (Owen ve ark., 1999), real-time PCR (Lund ve ark., 2004; Richards ve ark., 2004), mikrodizileme (Mitterer ve ark., 2004; Yasuoka, 2002), evrensel etiketleme yöntemi (Lelie ve ark., 2006) ve döngü-aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) gibi hibridizasyon temelli uygulamalar mikroorganizmaların saptanması ve tanımlanması için duyarlı ve spesifik tekniklerdir. Tez kapsamında hibridizasyon testleri

yapılamadığından dolayı izolatomuz, 16s rRNA dizi analizine göre *Bacillus sp.* olarak tanılanmış ve MT01 suş numarası verilmiştir.

Çalışmamızda, *Bacillus sp.* MT01'in salgıladığı ekstraselüler proteaz enzimi üretimi ve saflaştırma işlemleri yapılmıştır. *Bacillus sp.* MT01'in PCSMB besiyerinde en yüksek enzim üretim zamanının belirlenmesi ve üretimin, büyüme süreci ile korelasyonunun belirlenmesi amacıyla büyüme grafiği çıkartılmıştır. Buna göre maksimum proteaz enzimi 50 °C reaksiyon sıcaklığı ve pH 7,5'de 3353,1 U/mL ve 15010 U/mg protein olarak üretiminin logaritmik fazın sonu ve durgun fazın başlangıç kısmı arasında gerçekleşmektedir. Pant ve arkadaşlarının (2015) *B. subtilis* kullanarak ürettikleri proteaz dakikada 143.73 U/mL aktivite göstermektedir.

Proteaz enzimi öncelikle gradient amonyum sülfat çöktürme ile kısmi olarak saflaştırılmış ve sonrasında diyaliz işlemi uygulanmıştır. Spesifik aktivite olarak bakıldığında 30°C reaksiyon sıcaklığı ve pH 6,5'da, %60'lık amonyum sülfat çöktürmesi 5955,94 U/mg protein ile daha yüksek aktivite göstermiştir. Ancak, protein miktarı (0,23 mg/mL) ileri saflaştırma için yeterli görülmediğinden, ikili gradient uygulandığında ise aktivite düştüğünden, %80'lik (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürme sonucu elde edilen proteaz karışımı ile saflaştırmaya devam edilmiştir.

Ayrıca amonyum sülfat ile kısmi saflaştırma sonucunda % 80'lik (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesi sonrasında optimum değerler olan 50 °C reaksiyon sıcaklığı ve pH 7,5'de, 16473,81 U/mL ve 16861,6 U/mg protein olarak ölçülmüştür. Sarı (2011)'nın *Bacillus circulans* M34 ile yaptığı çalışmada, %30-80'lik (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürme sonrası elde ettiği proteaz enziminin 1002,64 U/mg spesifik aktiviteye, Asker ve ark. (2013) *Bacillus megaterium*'dan elde ettiği proteaz enziminin, %60'lık (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürme sonrası 250,27 U/mg spesifik aktiviteye sahip olduğunu, Mathew ve Gunathilaka (2015) ise *Bacillus licheniformis* NMS-1'den elde ettiği proteaz enziminin, %90'lık (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürme sonrası 453 U/mg spesifik aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu bağlamda diğer *Bacillus* türleri ile kıyaslandığında, *Bacillus sp.* MT01'in 16861,6 U/mg protein ile oldukça yüksek miktarda proteaz salgıladığı görülmektedir. *Bacillus*

dışındaki diğer türler arasındaki enzim aktivitemizin yerini belirlemek amacıyla yaptığımız araştırmada Çadircı ve ark. (2014) *Aspergillus parasticus*'dan elde ettiği proteaz enziminin,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  çöktürme sonrası 2182,9 U/mg spesifik aktiviteye, Kumari ve ark. (2015)'nin *Solanum melongena*'dan elde ettiği proteaz enziminin, %35-70'lik  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  çöktürme sonrası 10,47 U/mg spesifik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Rahman ve ark. (2006) *Pseudomonas aeruginosa* Strain K'dan elde ettikleri proteaz enziminin,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  çöktürme sonrası 2503,04 U/mg spesifik aktiviteye, Singh ve ark. (2011)'nin *Pseudomonas putida* SKG-1 ile yaptığı bir çalışmada elde ettikleri proteaz enziminin, %40-60'lık  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  çöktürme sonrası 5762 U/mg spesifik aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Buna göre, elde ettiğimiz enzim, şimdiye kadar izole edilen pek çok proteazdan daha yüksek spesifik aktiviteye sahiptir.

Kısmi olarak saflaştırılmış proteaz enzim örneği, Sephacryl S-200 jel kromatografisi ve sonrasında DEAE Sepharose iyon değişim kromatografisi ile ileri saflaştırma işlemleri uygulanmıştır. İyon değişim kromatografisi sonucunda 3861,7 U/mg protein spesifik aktiviteye sahip proteaz tek bant halinde elde edilmiştir. Süreç sonunda saflaştırma verimi ve saflaştırma katsayıları sırasıyla 0,27 ve 0,26 şeklindedir. Saflaştırma katsayısı, herhangi bir basamaktaki spesifik aktivitenin, başlangıç spesifik aktivitesine bölünmesiyle elde edilir, yani, bu durumda, spesifik aktivitedeki artış değerini ifade eder. Saflaştırma verimi ise, her adımdan sonra enzim aktivitesinin geri kazanımını gösterir. Saflaştırma tablosuna bakıldığında, gerek saflaştırma katsayısı bakımından, gerek ise verim bakımından başarılı bir saflaştırma gerçekleşmediği görülmektedir. İleri saflaştırmalarda her saflaştırma basamağının, saflaştırma verimini azalttığı bilinmektedir. Verim kaybına rağmen yüksek saflıkta proteaz üretmemizin sebebi, enzimin saf haldeki özelliklerini belirlemek ve ticari anlamda medikal uygulamalar gibi yüksek saflıkta enzim gerektiren alanlar için enzim özelliklerini belirlemektir. Ancak enzim, deri endüstrisi gibi yüksek saflık gerektirmeyen endüstriyel alanlarda kullanılacak ise, amonyum sülfat çöktürmesi sonrası kullanılması daha uygundur.

Ayrıca, amonyum sülfat çöktürmesi sonrası yapılan optimum sıcaklık ve pH denemeleri sonrası bulunan değerler ile (50°C ve pH 7,5) çalışmalar yapıldığında, başlangıç koşullarına göre (30°C ve pH 6,5) aktivitede de artış olduğu gözlenmiştir.

Kromatografik yöntemler ile saflaştırılan *Bacillus sp.* MT01'den elde edilen proteaz enziminin molekül ağırlığının yaklaşık 32 kDa olduğu tespit edilmiştir. Karşılaştırma amacıyla literatür taraması yapılmış ve benzer çalışmalar incelenmiştir. Deng ve ark. (2010)'nın *Bacillus sp.* B001 ile yaptığı çalışmada, elde ettikleri proteaz enziminin molekül ağırlığının 28 kDa olduğunu bildirmişlerdir. Sarı (2011)'nin *Bacillus circulans* M34 ile yaptığı çalışmada elde ettiği proteaz enziminin molekül ağırlığının 27,5 kDa olduğunu bildirmiştir. Vijayaraghavan ve ark. (2014)'nin *Bacillus cereus* strain AT'den elde ettiği proteaz enziminin molekül ağırlığının 42 kDa olduğunu bildirmişlerdir. Öztürk (2007)'ün *Bacillus licheniformis* BA17 ile yaptığı çalışmada elde ettiği alkalın proteaz enziminin molekül ağırlığının 19,7 kDa olduğunu bildirmiştir. Asker ve ark. (2013)'nin *Bacillus megaterium*'dan elde ettiği iki farklı termostabil proteaz enziminin (P1 ve P2) molekül ağırlıklarının sırasıyla 28 ve 25 kDa olduğunu bildirmişlerdir.

*Bacillus sp.* MT01'den elde edilen saf proteaz enziminin optimum sıcaklık isteğinin 50 °C ve optimum aktivite gösterdiği pH değerinin 7,5 olduğu bulunmuştur. Buna göre saflaştırdığımız *Bacillus sp.* MT01 proteazı termofilik bir nötral proteazdır. *Bacillus* cinsi bakteriler genellikle nötral ve alkalın proteazlar üretmektedirler. Bakteriyal nötral proteazlar pH 5.0-8.0 aralığında aktivite gösterir ve nispeten termal stabiliteleri düşüktür. *Bacillus sp.* MT01 nötral proteazın optimum sıcaklığı 50°C'dir. Ancak optimum sıcaklıktaki stabilitesi düşüktür. 30 °C'de 72 saat boyunca aktivitesinin %70,88'ini koruduğu görülmüştür. Medikal ve gıda uygulamalardaki kullanım sıcaklığı gözetilerek 30 °C'deki stabilite araştırılmıştır. Nötral proteazlar, aktivite gösterdikleri pH aralığı ve hayvansal proteazlara göre hidrolize edilmiş gıda proteinlerinde daha az acı tat oluşturmaları nedeni ile gıda endüstrisinde tercih edilmektedir. Termotoleranslarının az olması nedeni ile düşük sıcaklık hidrolizi ile gıda hidrolizatlarının üretiminde avantaj sağlamaktadır (Deshpande ve ark., 1998). Ancak burada dikkat edilmesi gereken husus, gıda endüstrisindeki bakteriyal kökenli enzimlerin kullanım izinlerinin kısıtlı olmasıdır. Aqel ve ark. (2012) *Bacillus sp.*

HUTBS62'nin optimum 80°C ve pH 6,8'de aktivite gösteren bir nötral termofilik proteaz olduğunu kazeini substrat olarak kullanarak göstermişlerdir. Yine Zhang ve ark. (2008) 65°C ve pH: 7,5'teki optimum koşullarda 16530 U/mg spesifik aktiviteye sahip 35 kDa büyüklüğünde *B. stearothermophilus* proteazını *B. subtilis* DB104 hücresinde eksprese ettirmişlerdir.

*Bacillus sp.* MT01'in kısmi saflaştırılmış proteaz enziminin 30 °C'de 36 saat boyunca aktivitesinin %53'ünü ve 40 °C'de 24 saat boyunca %48'ini koruduğu görülmüştür. Saf olmayan enzimin 30 °C'deki stabilitesi ile karşılaştırıldığında, saflaştırma sonucu stabilitenin arttığı görülmüştür. Bunun sebebi olarak, ortamda bulunan diğer proteazların, non-spesifik olarak enzimleri hidroliz ettiğinden olabileceği düşünülmüştür. 50 °C'de ise 1,5 saat boyunca aktivitesinin yaklaşık olarak %50'sini koruduğu görülmüştür. Konu dahilinde literatür taraması yapılmıştır. Afşin (2010)'nin *Bacillus licheniformis* ATCC 14580'den SSF ile üretmiş olduğu proteaz enzimi üzerine sıcaklığın etkisini incelemiş ve enzimin 60 °C'ye kadar stabilitesini koruduğunu, 60 °C'den sonra stabilitede çok hızlı bir azalma olduğunu bildirmiştir. Alpan (2008)'in ekstrem termofil anaerobik bakteriler ile yapmış olduğu çalışmada termostabil proteaz enzimi üretmiş ve ürettiği enzimin 80 °C'de ise %50'sini kaybettiğini bildirmiştir. Gençkal (2004)'in *Bacillus sp.* L21 ile ürettiği alkali proteaz üzerine yapmış olduğu bir çalışmada, proteaz enziminin 80 °C'de orijinal aktivitesinin %90'ını koruduğunu bildirmiştir. Arabacı ve ark. (2012)'nin *Bacillus sp.* CY7 ile üretmiş oldukları termostabil alkali proteaz çalışmasında, ürettikleri proteaz enziminin 100 °C'de aktivitesinin %88'ini koruduğunu bildirmişlerdir. Tez kapsamında elde ettiğimiz proteaz enziminin 40 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda stabilitesini koruyabildiği ve düşük sıcaklık tekniği içeren proseslere uygun olduğu, yüksek sıcaklıklarda kısa süreli proseslere uygun olduğu saptanmıştır.

*Bacillus sp.* MT01'den elde edilen proteaz enzimi üzerine inhibitör/aktivatör ve metal iyonlarının etkisi incelenmiştir. Öncelikle proteaz inhibitörlerinden 5 mM konsantrasyonlarındaki metallo proteaz inhibitörü olan EDTA ve serin proteaz inhibitörü olan PMSF ile enzim ile muamele edilmiştir. Reaksiyon sonucunda EDTA varlığında %99, PMSF varlığında ise %87 oranlarında proteaz inaktive olmuştur.

Özellikle PMSF'in non-spesifik inhibisyon etkisi gösterme ihtimaline karşı konsantrasyonu 0,5 mM'a düşürülmüş ve tekrar enzim ile muamele edildikten sonra da yine %83'ler seviyesinde inhibisyonun gerçekleştiği görülmüştür. Enzimin EDTA varlığında çok yüksek aktivite kaybına uğraması nedeniyle aslında bir metallo proteaz olduğu ancak muhtemelen enzimin aktif konformasyonuna ulaşması veya stabilizasyonu için gerekli bir bölgesinde serin aminoasitine gereksinim duyduğu için PMSF varlığında da aktivitede kayba uğradığı düşünülmüştür. Konu ile ilgili yapılan literatür araştırmasında, Chudasama ve ark. (2015) *B. subtilis* CC2 straini ile yapmış oldukları çalışmada, proteaz enziminin 1mM PMSF varlığında tamamen, 5 mM EDTA varlığında ise %93,5 oranında inhibe olduğunu belirlemişler ve izole ettikleri proteaza metallo-serin proteaz adını vermişlerdir. Chaudhari ve ark. (2013) *Chryseobacterium gleum*'dan elde ettikleri proteaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisini araştırdığı bir çalışmada, 1 mM PMSF ve EDTA'nın enzim aktivitesini sırasıyla %10 ve %68 oranında düşürdüğünü bildirmişlerdir. Yogesh ve Halami (2015) *Bacillus circulans* CFR11'den elde ettikleri fibrinolitik proteazın EDTA ve PMSF ile muamelesi sonucu sırasıyla ancak %45 ve %42 oranında aktif olduğunu bildirmişlerdir ve bu sebeple de enzimin bir serin metallo proteaz olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmada metal iyonlarının etkisi araştırıldığında,  $Fe^{+2}$ ,  $Na^{+1}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonları aktivatör etkisi göstermiştir. Bir metallo-enzim olduğu belirlenen *Bacillus* sp. MT01 proteazının metal iyonları varlığında aktif olmaları beklenen bir sonuçtur. Ancak  $Cu^{+2}$  metal iyonu inhibitör etkisi göstermiş ve enzim aktivitesi yaklaşık olarak %93 oranında azalmıştır. Okumuş (2004)'un *Bacillus* sp.'den elde ettiği alkalın serin proteaz üzerine inhibitör/aktivatör ve metal iyonlarının etkisini incelediği bir çalışmada enzimin;  $Hg^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$ 'nin enzim aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir. Kumaran ve arkadaşları (2011), EDTA varlığında inhibe olan bir metalloproteaz olan *Ganoderma lucidum* Vk12'a ait fibrinolitik proteazın, bakır varlığında tamamen inhibe olduğunu belirtmişlerdir. Buna karşın, Karlström ve Levine (1991) HIV virüsü ile yaptıkları çalışmada, bakırın proteaz içinteki sistein kalıtlarına bağlanarak geri dönüşümsüz bir inhibisyona yol açtığını, sistein kalıtı olmayan sentetik proteazların ancak ortama ditiyotritol gibi ekzojen tiyol grupları oluşturan ajanlar ilave edildikten sonra bakırın inaktive edici etkisi olduğunu belirlemişlerdir. Bakır inhibisyon etkisi

nedeniyle, çeşitli alanlarda kullanılabilir. Örneğin, inaktif olarak sentezlenen proparatroid hormon, proalbümin gibi proteinlerin aktif hale gelmesi için sentezlenen bir subtilisin benzeri proteaz olan furin, yine bakterilerde protoksinlerin toksin haline gelmesi veya ebola, HIV, kuş gribi gibi virüslerin glikoprotein yapıdaki kılıflarının olgunlaştırılması için kullanılmaktadır. Bu nedenle furin biyoterör ajanı olarak ilgi görmektedir. Bakır ve çinko ise bu tarz ataklara karşı savunma amaçlı kullanılmaktadır (Thomas, 2002). Çalışmamızın bir sonucu olarak bakırın çeşitli endüstriyel kullanımlarda bazı proteazlar üzerindeki inhibisyon etkisi nedeniyle kullanılabileceği görülmüştür.

*Bacillus sp.* MT01'den elde edilen proteaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisi incelenmiştir. En yüksek aktivite kaybı %46,6 ile Aseton varlığında gözlenmiştir ve bunu sırasıyla %25,8 ve %17,8'lik aktivite kaybıyla 2-propanol ile etil alkol izlemiştir. Diğer organik çözücüler olan DMSO, benzen ve toluen varlığında ise çok az aktivite kaybı gözlenmiştir. DMSO, toluen ve benzen'e karşı stabilitesinin oldukça iyi olduğu görülmüş ve solvent tolerant proteazlar ile ilgili yapılan literatür bilgileriyle uyumluluk gösterdiği görülmüştür (Sarı, 2011; Singh ve ark., 2011; Reddy ve ark., 2008). Organik çözücülerden toluen su içerisinde 0,52 g/L (20°C) oranında, benzen ise 1,84 g/L oranında çözünür. Bu düşük çözünürlük, toluen ve benzen varlığında proteazın %95 oranında aktivitesini korumasının sebebi olarak düşünülebilir. Ancak, organik çözücüler varlığında *Bacillus sp.* MT01 proteazının aktivitesini koruması, çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanım imkanını arttırmaktadır. Örneğin, mısırdan amiloz eldesi esnasında nişasta ekstraksiyonu, 1) toluen ve tuzlu su veya 2) nötral proteazlar kullanılarak yapılmaktadır (Wittrock ve ark., 2008). Etanol, 2-propanol, Aseton ve DMSO ise suda iyi çözünmektedir. DMSO'nun *Natrialba magadii* arkesinin halotolerant proteazı üzerine stabilizasyon etkisi olduğu bilinmektedir (Diego ve Castro, 2007). *Bacillus sp.* MT01 proteazının bu çözücülerde DMSO>Etanol>2-propanol>aseton sırasıyla aktivitesini koruması, su-organik çözücüler biyokatalizi gerektiren uygulamalarda potansiyel oluşturduğunu göstermektedir. Aseton varlığında aktivitedeki kaybın (% 46,4), asetonun proteinlerin çökmesine neden olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

*Bacillus sp.* MT01'den elde edilen proteaz enzimi üzerine yüzey aktif maddeler ve farklı konsantrasyona sahip H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin etkisi incelenmiştir. SDS ile ilgili analiz, aktivite ölçümü sırasında beyaz bulanık sıvı oluşması ve spektrofometrik olarak ölçüm yapılamayışı sebebiyle gerçekleştirilememiştir. % 2 ve % 5'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sırasıyla % 9,5 ve % 22 oranında aktiviteyi artırmıştır. Bu sonuçlar, literatür ile uyumludur (Sarı, 2011; Deng ve ark., 2010; Joo ve ark., 2003) Hidrojen peroksitin ortama ilavesi, kazein substratından kalsiyum iyonlarının artışına neden olduğu ve kazeinin çözünürlüğü arttırdığı için daha yüksek proteaz aktivitesi sağladığı bildirilmiştir (Fox ve Kosikowski, 1966). %1'lik Tween-80 aktiviteyi % 3,3 oranında artırırken, %1'lik Triton X-100 % 9,5 oranında düşürmüştür. Tween 80 gibi non-iyonik deterjanların, proteinin yapıdaki -SH grupları maskeleyerek substrat ile daha verimli bağlanmayı attırdıkları, bu gibi deterjanların özellikle hayvan gıdalarına ilave edildiğinde rumendeki sindirimi de kolaylaştıracağı bildirilmiştir (Kamande ve ark., 2000).

*Bacillus sp.* MT01'den elde edilen proteaz enziminin substrat spesifitesi kazein, BSA ve fibrinojen substratları üzerinde incelenmiştir. Böylelikle enzimin farklı kullanım alanlarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre saflaştırılan proteaz enziminin en yüksek aktiviteyi kazein substratı üzerine göstermiştir. Fibrinojen, kan pıhtılaşmasında meydana gelen fibrin'in öncü maddesidir. Fibrinojen kanın pıhtılaşmasında önemli bir role sahip olan ve kan plazmasının yaklaşık olarak yüzde beşini oluşturan bir kan proteindir. Bu proteinin sentezi karaciğerde yapılır ve kan plazmasının yanında iltihabi sıvılar, lenf sıvıları ve vücudun çeşitli yerlerinde biriken vücut sıvılarında da bolca bulunur. Normalde kanda fibrinjen miktarı yaklaşık beş gramdır. Bunun normalden farklı olması için karaciğerde bir hasar ya da karaciğer hastalıklarının olması gerekir. Karaciğerde görülen bir hastalıkla kanda fibrinojen miktarı giderek azalır. Gebelik, iltihabi durumlar ve eklem romatizması gibi durumlarda kanda fibrinojen miktarı artar. Bir rahatsızlıktan ötürü vücutta bulunan fibrinojen görevini yerine getirememiştir ya da çok az olduğu için etkisini pek gösterememiştir. Fibrin kanda pıhtılaşma sağlar. Ancak kanın pıhtılaşmasının fazla olması yani fibrinojenin yüksekliği kanın damar içerisinde pıhtılaşmasına ve bunun sonucunda da tromboza (damar tıkanıklığına ) neden olur. Hiper fibrinojenin görülme nedenleri de gebelikte pıhtılaşmanın artması, romatoid artrit, devamlı sigara kullanımı gibi

nedendir (Anonim, 2015c). Reaksiyon süresi optimize edilerek yapılan ön çalışmada, *Bacillus sp.* MT01 proteaz enziminin fibrinojen substratına karşı 11 U/mL.dk'lık aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Kim ve arkadaşlarının (1996) *Bacillus sp.* CK 11-4 suşundan elde ettikleri fibrinolitik proteazın saflaştırmadan önceki aktivitesi 1,84 U/mL iken, saf enzimde bu değer 874 U/mL'ye ulaşmıştır. *Bacillus sp.* MT01 proteazlarından saflaştırdığımız proteazın fibrinojeolitik aktivitesi literatürdeki çalışmalar ile kıyaslandığında çok yüksek bir değer olmasa da optimizasyonlar yapıldığında daha yüksek aktivite elde edilmesi beklenmektedir. Böylece fibrinojenolitik aktiviteye sahip proteaz, biyosensör yapımı gibi çeşitli medikal uygulamalarda kullanılabilir.

*Bacillus sp.* MT01'den elde edilen proteaz enziminin kazein substrat kullanılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  kinetik sabitleri belirlenmiştir. Bu sabitler sırasıyla 0,574 mg/ml ve 338,1234  $\mu$ mol/ml dk şeklindedir. Sarı (2011) *Bacillus circulans* M34 ile yaptığı çalışmada elde ettiği proteaz enziminin ait  $K_m$  ve  $V_{max}$  kinetik sabitlerini kazein substrat kullanarak belirlemiş ve sırasıyla 0,96 mg/ml ve 9,548  $\mu$ mol/ml dk olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda *Bacillus sp.* MT01'den elde edilen proteazın *Bacillus circulans* M34'ten elde edilen proteaza göre substrata ilgisinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Mesbah ve Wiegel (2014) *Alkalibacillus sp.* NM-Fa4'ten elde ettikleri proteaz enziminin kinetik sabitlerini belirlemek için çalışmalar yapmış ve bu amaçla substrat olarak kazein kullanılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  sabitlerini sırasıyla 1,3 mg/ml ve 1111 mg/ml.dk olarak elde edildiğini bildirmişlerdir. *Bacillus sp.* MT01'den elde edilen proteazın *Alkalibacillus sp.* NM-Fa4'ten elde edilen proteaza göre substrata ilgisinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Cheng ve ark. (2015) *Bacillus sp.*'den kalsiyum bağımlı bir serin proteaz üretmiş ve elde ettikleri proteaz enziminin kinetik sabitlerini belirlemek için çalışmalar yapmışlardır. Bu amaçla substrat olarak kazein kullanılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  sabitlerini sırasıyla 0,319 mg/ml ve 0,0498 mg/ml.dk olarak elde edildiğini bildirmişlerdir. *Bacillus sp.* MT01'den elde edilen proteazın *Bacillus sp.*'den elde edilen proteaza göre substrata ilgisinin daha düşük olduğu görülmüştür. Ancak genel olarak *Bacillus sp.* MT01 proteaz enziminin  $K_m$  ve  $V_{max}$  kinetik sabitleri tespit edildiğinde  $K_m$  üzerinden yapılan kıyaslama ile substrata olan ilgisinin literatürdeki çalışmaların çoğuna kıyasla yüksek olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak *Bacillus sp.* MT01'den elde edilen proteaz enziminin çok düşük ve çok yüksek sıcaklıklara kadar dahi hemen hemen her sıcaklıkta aktivite göstermesi ve aynı şekilde çok geniş bir pH aralığında aktif olması sebebiyle endüstride geniş yelpazede kullanım alanı bulabileceği öngörülmektedir. Aynı şekilde düşük sıcaklıkta oldukça kararlı olması, enzimin uzun süreli uygulama gereksinimi duyulan proseslerde mükemmel bir materyal olmasını sağlamaktadır. İnhibitör ve aktivatörler ile ilgili bilgiler bu enzimin deterjan endüstrisi için uygun olabileceğini göstermektedir. Yine aynı şekilde organik çözücülere karşı kararlı olması bu proteaz enzime kullanım açısından proseslerde oldukça kolaylık ve sürdürülebilirlik sağlamaktadır. *Bacillus sp.* MT01'den elde edilen proteaz enziminin farklı substratlara olan ilgisi, spesifik inhibitörleri ve aktivatörlerinin bilinmesi sayesinde özellikle tıbbi uygulamalar başta olmak üzere birçok laboratuvar ve endüstriyel açıdan kullanım için umut vaat etmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Alpan, L.G., 2008. Bazı Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin Alkali Proteazlarının Özelliklerinin Belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi), Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Anonim, 2015a. <http://academic.pgcc.edu>
- Anonim, 2015b. [www.lonza.com/research](http://www.lonza.com/research)
- Anonim, 2015c. <http://sagliklahayat.com/fibrinojen-yuksekligi/>
- Aqel, H., Al-Quadani F., Yousef, TK., 2012. A Novel Neutral Protease from Thermophilic *Bacillus* strain HUTBS62 J. BioSci. Biotech, 1(2): 117-123.
- Asker, M. M.S., Mahmoud, M.G., Shebwy, K.E., Abd el Aziz, M.S. 2013. Purification and Characterization of Two Thermostable Protease Fractions From *Bacillus megaterium*, Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 11: 103-109.
- Bulut, Ş., 2007. *Teredinobacter turnirae*'den Proteaz Üretiminde Farklı Stratejilerin Araştırılması, Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimi Dersigi, 19 (4) 561-568.
- Cadırcı, B.H., Yasa, I., Bitlisli, B.O., Karavana, H.A., 2014. By *Aspergillus parasticus* TEM Have Promising Activity In Enzymatic Dehairing Process, Journal of New Results in Science, 1304-7981.
- Chaudhari, N.P., Chaudhari, L.B., Chincholkar, B.S., 2013. Iron Containing Keratinolytic Metallo-protease Produced by *Chryseobacterium gleum*, Process Biochemistry, 48 (2013) 144-151.
- Cheng, Q., Xu, F., Hu, N., Liu, X., Liu, Z., 2015. A Novel Ca<sup>2+</sup>-dependent Alkaline serine-prtoease (Bvsp) from *Bacillus sp.* with Fibrinolytic Activity, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 117(2015)69-74.
- Chudasama, C. J., Parmar, S.R., Patel, H.N., 2015. Isolation and Characterization of Metallo-alkaline Serine Protease from *Bacillus Subtilis* STRAIN CC2 Journal of Cell and Tissue Research, 15(1) 4913-4919.
- Deng, A., Wu, J., Zhang, Y., Zhang, G., Wen, T., 2010. Purification and Characterization of A Surfactant-stable High-alkaline Protease from *Bacillus sp.* B001, Bioresource Technology, 101; 7100-7106.
- Deshpande, V.V., Rao, M., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62(3)597-635.
- Diego M., Ruiz, D.M., ve De Castro, R.E., 2007. Effect of Organic Solvents On The Activity and Stability of An Extracellular Protease Secreted by The Haloalkaliphilic Archaeon *Natrialba magadii*. J Ind Microbiol Biotechnol, 34:111–115.
- Dodia, M.S., Rawal, C.M., Bhimani, H.G., Joshi, R.H., Khare, S.K. and Singh, S.P., 2008. Purification and stability characteristics of an alkaline serine protease from a newly isolated *Haloalkaliphilic bacterium sp.* AH-6. J. Indian Microbiol Biotechnol, 35: 121-131.
- Fox, P.F., ve. Kosikowski, F.V., 1966. Some Effects of Hydrogen Peroxide on Casein and Its Implications in Cheese Making J. Dairy Science 50 (8) 1183-1188.
- Garrett, R. H. and Grisham, C. M., 2010. Biochemistry. Brooks/Cole Cengage Learning, 500-532, USA.
- Grzonka, Z., Kasprzykowski, F., Wiczak, W., 2007. Industrial Enzymes: Structure, Funtion and Applications Chapter 11, Edited by Julio Polaine and Andrew P.

- MacCabe, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Valencia, Spain.
- Gupta, A., Khare, S.K., 2006. A protease stable in organic solvents from solvent tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biores. Technol*, 97: 1788-1793.
- Ha, M., El-Din, A., Bekhit, A., Carne, A., Hopkins, D. L., 2012. Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin ve zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food Chemistry*. 134 (2012) 95-105.
- Horikoshi, K., 1999. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products For Biotechnology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), 735-750.
- Inácio J, Flores O., Martins I.S., 2008. Efficient Identification of Clinically Relevant *Candida* Yeast Species by Use of An Assay Combining Panfungal Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification with Hybridization to Species-specific Oligonucleotide Probes. *J Clin Microbiol*. 46:713–720.
- Joo, H.S., Kumar, C.G., Park, G.C., Paik, S.R., Chang, C.S., 2003. Oxidant and SDS-stabla Alkaline Protease From *Bacillus clausii* I-52: Production and Some Propterties, *Journal of Applied Microbiology*, 95; 267-272.
- Kamande, G.M., Baah, J., Cheng, K.J., McAllister, T.A., Shelford, J.A., 2000. Effects of Tween 60 and Tween 80 on Protease Activity, Thiol Group Reactivity, Protein Adsorption, and Cellulose Degradation by Rumen Microbial Enzymes *J Dairy Sci*, 83:536–542.
- Kammerdpetch, C., Weiss, M., Kasper, C., Scheper, T., 2007. An Improvement of Potato Pulp Protein Hydrolyzation Process by the Combination of Protease Enzyme Systems. *Enzyme and Microbial Technology*. 40: 508-514
- Katsaros, G.I., Tavantzis, G., Taoukis, P.S., 2010. Production of novel dairy products using actinidin and high pressure as enzyme activity regulatör. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11 (2010) 47-51.
- Ken McDonald, J., 1985. An Overview of Protease Specificity and Catalytic Mechanisms: Aspects Related to Nomenclature And Classification. *The Histochemical Journal*,17: 773-785.
- Kim, W., Choi, K., Kim, Y., Park, HH., Choi, J., Lee, Y., Oh, H., Kwon, I., Lee, S., 1996. Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 Screened from Chungkook-Jang, *Appied and Environmental Microbiology*, 62(7): 2482–2488.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and Shahidi, F., 2007. Antioxidative Activity and Functional Properties of Protein Hydrolysate of Yellow Stripe Trevally (*Selaroides leptolepis*) as Influenced by the Degree of Hydrolysis and Enzyme Type. *Food Chemistry*, 102: 1317-1327.
- Kumaran, S., Palani, P., Nishanthi, R., Srimathi, S., Kaviyarasan, V., 2011. Purification of an Intracellular Fibrinolytic Protease from *Ganoderma Lucidum* Vk12 and its Susceptibility to Different Enzyme Inhibitors *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10 (4): 413-420.
- Kumari, A., Kuar, B., Serivastava, R., Sangwan, S.R., 2015. Isolation and immobilization of alkaline protease on mesoporous silica and mesoporous ZSM-5 zeolite materials for improved catalytic properties, *Biochemistry and Biophysics Reports* 2: 108-114.
- Lelie, D, Lesaulnier C, McCorkle S, Geets J, Taghavi S, Dunn J., 2006. Use of Single-Point Genome Signature Tags as a Universal Tagging Method for Microbial Genome Surveys. *Appl Environ Microbiol.*;72:2092–2101.

- Lund, M., Nordentoft S., Pedersen K., Madsen M. 2004. Detection of *Campylobacter* spp. in Chicken Fecal Samples by Real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 42:5125–5132.
- Mesbah, N.M., Wiegel, J. 2014. Purification and Biochemical Characterization of Halophilic Alkalithermophilic Protease AbCP from *Alkalibacillus* sp. NM-Fa4, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 105 (2014) 74-81.
- Mitterer, G., Huber M., Leidinger E., Kirisits C., Lubitz W., Mueller M.W., Schmidt W.M. 2004. Microarray-based Identification of Bacteria in Clinical Samples by Solid-phase PCR Amplification of 23S Ribosomal DNA Sequences. *J Clin Microbiol.* 42:1048–1057.
- Moon, S.Y., Oh, T.K. and Rho, H.M., 1994. Purification and Characterization of an Extracellular Alkaline Protease from *Bacillus subtilis* RM615. *Korean Biochem.* 27(4) 323-329.
- Morita, Y., Kondoh, K., Hasan, Q., Sakaguchi, T., Murakami, Y., Yokoyama K. and Tamiya, E., 1997. Purification ve characterization of a cold-aktif protease from psychrophic *Serratia marcescens* AP3801. School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, Tatsunokuchi, Ishikawa, 923-12.
- Nakiboğlu, N., Toscalı, D., Yasa, İ., (2001). Silver recovery from waste photographic films by an enzymatic method. *Turkish Journal of Chemistry.* 25: 349-353.
- Nilsson, H., Taneera J, Castedal M, Glatz E, Olsson R, Wadström T. 2000. Identification of *Helicobacter pylori* and Other *Helicobacter* Species by PCR, Hybridization and Partial DNA Sequencing in Human Liver Samples From Patients with Primary Sclerosing Cholangitis or Primary Biliary Cirrhosis. *J Clin Microbiol.* 38:1072–1076.
- Okumuş, V., 2004. *Citrullus lanatus* (KARPUZ) ve *Cucumis melo* L (KAVUN) Kabuğu Kullanılarak Katı-Faz Fermentasyonu tekniği (SSF) ile Toprakdan İzole Edilen *Bacillus* sp.’den Alkalın Serin Proteaz Eldesi. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi-Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Owen, R. H., Dymock D, Booth V., Weightman A. J., Wade W. G. 1999. Detection of Unculturable Bacteria in Periodontal Health and Disease by PCR. *J Clin Microbiol.* 37:1469–1473.
- Öztürk, S., 2007. Ülkemizde İzole Edilen *Bacillus licheniformis* BA17 ‘den Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi –Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Pant, G., Prakash, A., Pavani, J.V.P., Bera, S., Deviram, G.V.N.S., Kumar, A., Panchpuri, M., Prasuna, R.G, 2015. Production, Optimization and Partial Purification of Potease from *Bacillus subtilis* *Journal of Taibah University for Science* 9(1): 50-55.
- Perry, D, Slade H. 1961. Transformation of Streptococci To Streptomycin Resistance. *J Bacteriol.* 83:443–449.
- Qihe, C., Guoqing, H., Yingchun, J., Hui, N., 2006. Effects of elastase from a *Bacillus* strain on the tenderization of beef meat. *Food Chemistry*, 98 (2006) 624-629.
- Rahman, R. N. Z. R. A., 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.

- Reddy, L. Wee, Y. and Ryu, H., 2008. Purification And Characterization of An Organic Solvent And Detergent-Tolerant Novel Protease Produced by *Bacillus* sp. RKY3, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 83: 1526-1533.
- Richards, G.P, Watson M.A, Fankhauser R.L, Monroe S.S. 2004. Genogroup I and II Noroviruses Detected in Stool Samples by Real-time Reverse Transcription-PCR Using Highly Degenerate Universal Primers. Appl Envir Microbiol., 70:7179–7184.
- Sarı, E., 2011. *Bacillus Circulans* M34'ten Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (Yüksek Lisans Tezi), Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Sevinç, N. 2010. Türkiye Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* sp. Suşlarından Proteaz Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi-Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Sigal, N., Senez, J. C., Le Gall, J., Sebald M. 1963. Base Composition of The Deoxyribonucleic Acid of Sulfate-reducing Bacteria. J Bacteriol. 85:1315–1318.
- Singh, S. K., Singh, S. K., Tripathi, V. R., Khare, S. K. 2011. A novel psychrotrophic, solvent tolerant *Pseudomonas putida* SKG-1 and solvent stability of its psychrothermoalkalstable protease, Process Biochemistry 46: 1430-1435.
- Son, E.S. and Kim, J.I., 2003. Multicatalytic Alkaline Serine Protease from the Psychrotrophic *Bacillus amyloliquefaciens* S94. The Journal of Microbiology, 41 (1) 58-62
- Tavano, O.L., 2013. Protein Hydrolysis Using Proteases: An Important Tool For Food Biotechnology. Journol of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 90: 1-11
- Tekin, N., 2008. Türkiye Kaynaklı *Bacillus* spp.'lerin Alkalen Proteaz Üretim Kapasiteleri ve Enzimlerin Kısmen Karakterizasyonu (Yüksek Lisans Tezi), Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Thomas, G., 2002. Furin at The Cutting Edge: From Protein Traffic To Embryogenesis and Disease Nature Rev. Molec. Cell Biol., 3 (10) 753–766.
- Turus, N., 2011. Alkali Soğukta Aktif Proteaz Üreticisi *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu, Enzim Üretimi, Karakterizasyonu ve Enzimin Biyoteknolojik Kullanım Olanakları (Yüksek Lisans Tezi), Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Uğuz, Ş., 2007. Pastırmadaki proteolitik değişmelere tuz miktarının etkisi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara. Yüksek Lisans Tezi.
- Ulus, Y., 2012. Endüstriyel Kullanım Amaçlı Kimozin Enziminin Alternatif Bir Sistemle Rekombinant Olarak Üretilmesi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (Doktora Tezi), Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat.
- Venugopal, M., and Saramma, A., 2007. An Alkaline Protease From *Bacillus Circulans* BM15, Newly Isolated From A Mangrove Station: Characterization And Application In Laundry Detergent Formulations, Indian Journal of Microbiology, 47: 298-303.
- Wittrock, E., Jiang, H., Campbell, M., Campbell, M., Jane, J.-l., Anih, E. and Wang, Y.-J. 2008. A Simplified Isolation of High-Amylose Maize Starch Using Neutral Proteases. Starch, 60:601–608.
- Yardımcı, E., 2014. *Geobacillus subterraneus* İle Proteaz Üretimi, (Yüksek Lisans Tezi), Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.
- Yasuoka, M.O., 2002. A Multiplex Polymerase Chain Reaction–based Diagnostic Method for Bacterial Vaginosis. Obst Gynecol, 100:759–764.

- Yogesh, D., Halami, M.P., 2015. A Fibrin Degrading Serine Metallo Protease of *Bacillus circulans* with  $\alpha$ -chain Specificity, *Food Bioscience*, 11 (2015) 72-78.
- Zare, H., Moosavi-Movahedi, A. A., Salami, M., Mirzaei, M., Saboury, A. A., 2013. Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica* cv. Sabz) latex. *Phytochemistry*. 87 (2013) 16-22.
- Zhang, M., Zhao C., Du LX., Lu FP, Gao, C., 2008. Expression, Purification, and Characterization of A Thermophilic Neutral Protease from *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus subtilis* *Science in China Series C: Life Sciences*, 51(1): 52-59
- Zhao, G., Zhou, M., Zhao H., Chen, C., Xie, B., Zhang, X., He, H., Zhou, B., Zhang, Y., 2012. Tenderization Effect of Cold-adapted Collagenolytic Protease MCP-01 on Beef Meat at Low Temperature and Its Mechanism. *Food Chemistry*. 134 (2012) 1738-1744.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mesut TOLAN

Doğum Yeri : Çorum/Merkez

Doğum Tarihi : 25.03.1990

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Mimar Sinan Lisesi (Çorum), 2007

Lisans : Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 2012

Yüksek Lisans : Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilimdalı, 2015

İletişim (Gsm) : 0506 795 08 87

e-Mail : mesuttolan@gmail.com

