

***Clostridium botulinum* TİP A'DAN PROTEAZ ENZİMİNİN KİSMİ
OLARAK SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Şeyma DADI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KASIM 2012
ANKARA**

Şeyma DADI tarafından hazırlanan “*Clostridium botulinum* TİP A’DAN PROTEAZ ENZİMİNİN KISMİ OLARAK SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Elif LOĞOĞLU

.....

Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

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

Doç. Dr. Hatice ÖĞÜTÇÜ

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, Ahi Evran Üniversitesi

Prof.Dr. Elif LOĞOĞLU

.....

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Doç.Dr.Fatma ARSLAN

.....

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tarih: 23/11/2012

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

Prof.Dr.Şeref SAĞIROĞLU

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Şeyma DADI

***Clostridium botulinum* TİP A'DAN PROTEAZ ENZİMİNİN KISMI OLARAK SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

(Yüksek Lisans Tezi)

Şeyma DADI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Kasım 2012

ÖZET

Bu çalışmada *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den proteaz enziminin kısmi olarak saflaştırılması ve karakterizasyonu araştırılmıştır. Proteaz enzimi üretimi %1 tripton, %1 pepton, %0,5 maya ekstraktı, %0,1 çözünebilir nişasta, %0,3 CH₃COONa, % 0,05 L-sistein, %0,03 sodyum tiyoglikolat, %0,5 NaCl ve % 1 glukoz içeren besiyerinde 37 °C'de 20 saat süresince gerçekleştirilmiştir. Proteaz enzimi, %85 amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE selüloz anyon değişim kromatografisiyle %6,12 verimle ham ekstrakta göre 3,67 kat saflaştırılmıştır. Enzimin spesifik aktivitesi 650 U/mg'dır. Enzimin optimum pH ve sıcaklığı sırası ile 8 ve 50 °C'dir. Enzim 40 °C'de 3 saat boyunca aktivitesinin yaklaşık tamamını korumuştur. 60 ve 70 °C'de ise ilk 15 dakikada aktivitesinin büyük bir kısmını kaybetmiştir. Enzimin aktivitesi Zn²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Mg²⁺ ve Ni²⁺ iyonları varlığında artış gösterirken, Cd²⁺ ve Sn²⁺ iyonları enzimi inhibe etmiştir. Al³⁺, Fe³⁺, Na⁺ ve Sr²⁺ iyonları varlığında ise enzim aktivitesini korumuştur. Enzim kazein, jelatin, soya fasulyesi unu ve BSA gibi doğal substratlar karşısında en yüksek aktiviteyi kazeine karşı göstermiştir. Enzim etanol, matanol, DMSO, 2-propanol ve asetonan etkilenmezken n-butanol ve hekzan varlığında aktivitesini sırası ile %39 ve %23 oranında kaybetmiştir. Deterjan katkı maddelerinden olan Triton X-100 ve Tween 80 enzim aktivitesini artırmıştır. SDS karşısında ise enzim aktivitesini korumuştur. %2'lik ve %5'lik

H₂O₂ varlığında enzimin aktivitesinde artış gözlenmiştir. Enzim metaloproteaz inhibitörü olan EDTA tarafından inhibe edilmiştir. PMSF varlığında ise aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Bu inhibisyon profili enzimin metaloproteaz olduğunu ve aktif merkezinin yakınında serin kalıntılarının bulunduğunu göstermiştir.

Bilim Kodu : 201.1.020
Anahtar Kelimeler : Metaloproteaz, *Clostridium botulinum*, saflaştırma karakterizasyon
Sayfa Adedi : 81
Tez Yöneticisi : Prof.Dr. Elif LOĞOĞLU

**PARTIALLY PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF
PROTEASE FROM *Clostridium botulinum* TYPE A**

(M.Sc. Thesis)

Şeyma DADI

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

November 2012

ABSTRACT

In this study, partially purification and characterization of protease from *Clostridium botulinum* Type A ATCC 7948 was investigated. Protease production was grown in %1 tripton, %1 peptone, %0,5 yeast extract , %0,1 soluble starch, %0,3 CH₃COONa, % 0,05 L-cysteine, %0,03 sodium thioglycolate, %0,5 NaCl and % 1 glucose at 37 °C and 20 hour. Enzyme was purified by %85 ammonium sulfate precipitation and DEAE cellulose anion exchange chromatography with %6,12 yield and 3,67 fold. Specific activity was 650 U/mg. The optimum pH and temperature of protease was 8 and 50 °C, respectively. Protease activity was maintained %100 after 3 hours at 40 °C. Enzyme deactivated at 60 and 70 °C for 15 minute. While enzyme activity increased in the presence of Zn²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Mg²⁺ and Ni²⁺, Cd²⁺ and Sn²⁺ inhibited enzyme. Al³⁺, Fe³⁺, Na⁺ and Sr²⁺ showed no effect on protease activity. Protease showed highest activity towards casein among other native proteins such as gelatin, BSA, soy bean. Enzyme maintained activity in the presence of ethanol, methanol, DMSO, 2-propanol and acetone. But enzyme deactivated %39 and %23 in the presence of n-butanol and hexane, respectively. While Triton X-100 and Tween 80 increased enzyme activity, enzyme maintained activity towards SDS. It was observed that enzyme activity increased in the presence of %2 and %5 H₂O₂. Enzyme was inhibited by metalloprotease inhibitor EDTA. Also 2 and 5 mM PMSF inhibited enzyme at the rate of %18

and %30, respectively. This inhibition profile showed that enzyme was metalloprotease and there were serine residues near the active site.

Science Code : 201.1.020

Key Words : Metalloprotease, *Clostridium botulinum*, purification, characterization

Page Number : 81

Adviser : Prof. Dr. Elif LOĞOĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, tez çalışması sırasında yol göstericiliği ve hoşgörülü yaklaşımıyla katkılarını esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Elif LOĞOĞLU' na teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince zamanını benden esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini paylaşan Mustafa HACIÖMEROĞLU'na (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu) teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında desteklerini esirgemeyen Esma SARİ, Münteha Nur SONUÇ ve Araş. Gör. Eda ÇINAR AVAR'a teşekkür ederim.

Beni yetiştiren, maddi ve manevi destekleriyle her zaman olduğu gibi tez çalışmalarım süresince de yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BÖLÜM.....	3
2.1. Kuramsal Temeller.....	3
2.1.1. Proteazlar	3
2.1.2. Proteazların sınıflandırılması.....	4
2.1.3. Proteazların Endüstride Kullanım Alanları	22
2.1.4. <i>Clostridium botulinum</i> hakkında genel bilgi	27
2.2. Kaynak Araştırması.....	29
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	40
3.1. Kullanılan Kimyasallar	40
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	40
3.3. Kullanılan Mikroorganizma	40
3.4. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'in Çoğaltılması	41
3.5. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den Proteaz Enziminin Üretimi ..	41

Sayfa

3.6. Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması	41
3.6.1. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948' den kısmi olarak saflaştırılan proteazın DEAE- selüloz anyon değıştirici kolona yüklenmesi	42
3.6.2. Proteaz aktivite tayini	42
3.6.3. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması	43
3.6.4. Protein miktarının belirlenmesi	43
3.6.5. Protein standart grafiğinin hazırlanması	44
3.7. <i>C. botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den Kısmi Olarak Saflaştırılan Proteaz Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları	45
3.7.1. Proteaz enziminin optimum sıcaklığının ve kararlılığının belirlenmesi	45
3.7.2. Proteaz enziminin optimum pH ve kararlılığının belirlenmesi	46
3.7.3. Proteaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi	47
3.7.4. Proteaz enziminin doğal substratlara olan özgülüğünün belirlenmesi	47
3.7.5. Proteaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisinin belirlenmesi	47
3.7.6. Bazı deterjan yüzey aktif maddelerin ve yükseltgenlerin proteaz enzime etkisinin belirlenmesi	48
3.7.7. Amino asit inhibitörlerinin enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi	48
3.7.8. Proteaz enziminin Michaelis Menten kinetik parametrelerinin belirlenmesi	49
4. BULGULAR	50
4.1 Proteaz Enziminin Üretimi	50
4.2. Proteaz Enziminin Saflaştırılması	51

Sayfa

4.3. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den Kısmi Olarak Saflaştırılan Proteaz Enziminin Karakterizasyonu	54
4.3.1. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları	54
4.3.2. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık stabilitesi	54
4.3.3. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH sonuçları	55
4.3.4. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin pH stabilitesi sonuçları	56
4.3.5. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimine bazı metal iyonlarının etkisi	57
4.3.6. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimine doğal substratların etkisi	58
4.3.7. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimine organik çözücülerin etkisi	59
4.3.8. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimine bazı deterjan yüzey aktif maddelerin ve yükseltgenlerin etkisi	60
4.3.9. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimine amino asit inhibitörlerinin etkisi	61
4.3.10. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'dan kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin Michaelis Menten kinetik parametreleri	62
5. TARTIŞMA VE DEĞERLENDİRME	64
KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	81

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Proteazların sınıflandırılması	5
Çizelge 2.2. Proteazların hidrolizleme biçimlerine göre sınıflandırılmaları.....	7
Çizelge 2.3. Endüstride proteazlar	27
Çizelge 3.1. Enzimin optimum pH ve kararlılığının belirlenmesinde kullanılan tamponlar.....	46
Çizelge 4.1 Proteaz enzimi üretimi için kullanılan besiyeri	50
Çizelge 4.2. İnkübasyon sürelerine bağlı olarak ham ekstraktın aktiviteleri	51
Çizelge 4.3. Kullanılan tamponun pH'sına göre enzim aktiviteleri.....	51
Çizelge 4.4. Proteazın saflaştırılma basamakları sonuçları.....	52
Çizelge 4.5. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCA 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara karşı spesifitesi	59
Çizelge 4.6. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A TCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimine bazı deterjan yüzey aktif maddelerin ve yükseltgenlerin etkisi	61
Çizelge 4.7. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimine bazı amino asit inhibitörlerinin etkisi	62

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Proteolizin şematik olarak gösterimi	3
Şekil 2.2. Serin proteazların (tripsin, kimotripsin ve elastaz) spesifisiteleri.....	9
Şekil 2.3. Kimotripsinin katalitik etki mekanizması.....	10
Şekil 2.4. Serin proteazın peptidil klorometil ketonla inhibisyon mekanizması.....	11
Şekil 2.5. Papainin katalitik mekanizması	12
Şekil 2.6. Aspartil proteazların genel mekanizması.....	14
Şekil 2.7. Termolizinin reaksiyon mekanizması	17
Şekil 2.8. Enzimlerin endüstride kullanım yüzdeleri	23
Şekil 3.1 Tirozin standart grafiği	43
Şekil 3.2. Protein standart grafiği.....	45
Şekil 4.1. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den DEAE selüloz iyon değişim kromatografisiyle kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin aktivite-absorbans grafiği	53
Şekil 4.2. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin DEAE selüloz anyon değiştirme kromatogramı	53
Şekil 4.3. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık profili.....	54
Şekil 4.4. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık stabilitesi.....	55
Şekil 4.5. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin pH profili	56
Şekil 4.6. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin pH stabilitesi	57

Şekil	Sayfa
Şekil 4.7. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimine bazı metal iyonlarının etkisi	58
Şekil 4.8. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimine organik çözücülerin etkisi	60
Şekil 4.9. <i>Clostridium botulinum</i> Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin Lineweaver-Burk Grafiği.....	63

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Kimotripsinin katalitik triadı	8
Resim 2.2. HIV-1 proteazının üç boyutlu konformasyonel yapısı.....	14
Resim 2.3. Termolizinin genel yapısı	16
Resim 2.4. Papain enziminin üç boyutlu yapısının gösterimi	18
Resim 2.5. Tripsin enziminin üç boyutlu yapısının gösterimi	20
Resim 2.6. Proteazın 24 saat 37 °C’de keçi kılıyla muamelesi	24

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler ve Kısaltmalar	Açıklama
AP	Amino peptidaz
CP	Karboksi peptidaz
Ser	Serin
His	Histidin
Asp	Aspartik asit
Cys	Sistein
DEAE	Dietilaminoetil
U	Ünite
SDS	Sodyumdodesil sülfat
PAGE	Poliakrilamit jel elektroforezi
KDa	Kilo Dalton
Tris	Trihidroksimetil aminometan
BSA	Sığır serum albumini
BoNT	Botulinum nörotoksini
C	<i>Clostridium</i>
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EGTA	Etilen glikol tetra asetik asit
PMSF	Fenil metil sülfonil florür
TCA	Trikloroasetik asit
DTT	Ditiyoteritol
TLCK	Tosil-L-lizin klorometil keton
DMSO	Dimetil sülfoksit
K_m, V_m	Michaels Menten kinetik sabitleri

1. GİRİŞ

Enzimler, biyolojik sistemlerin reaksiyon katalizörleridirler; biyokimyasal olayların vücutta yaşam ile uyumlu bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan kimyasal ajanlardır. Biyolojik katalizörler olarak da tanımlanan enzimler, besleyici moleküllerin yıkıldığı, kimyasal enerjinin depolandığı ve şeklinin değiştirildiği, basit prekürsörlerden biyolojik makromoleküllerin yapıldığı metabolik yollarda yüzlerce reaksiyon basamağını katalize ederler. Enzimler, spesifik kimyasal reaksiyonları hızlandırırlar; substratları için yüksek derecede spesifiteye sahiptirler; sulu çözeltilerde çok ılımlı sıcaklık ve pH durumları altında fonksiyon gösterirler [1].

İlk enzim çalışmaları, sindirime ilişkin enzimlerin araştırılmaya başlandığı 1760-1825 yılları arasındadır. İlk kez 1825 yılında Berzelius, nişastanın sindiriminde etkili bitkisel enzimler üzerinde çalışmış, 1860 yıllarında Pasteur fermentasyon enzimleri üzerinde alıştırımlar yapmıştır. 1897 yılında ilk kez maya hücrelerinden fermentasyon enzimlerini elde eden Buchner, hiçbir canlı hücrenin olmadığı ortamda maya hücresi özütünün şekerleri mayaladığını göstermiştir. Soya fasulyesi özütünden saf ve kristalize üreaz elde edilmesi ise 1930 yılında Northop tarafından gerçekleştirilmiştir. Saf enzimlerin elde edildiği bu önemli gelişmeler sonunda enzimlerin yapısı ve özelliklerine ilişkin ayrıntılı bilgiler elde edilmiştir [2].

Enzimler, ileri derecede organize olmuş protein molekülleridir. Hayat canlı hücre içinde zircirleme devam eden biyokimyasal reaksiyonlar dizisi sonunda ya hücreye gerekli olan makromoleküllerin inşa edildiği ya da büyük moleküllerin parçalanarak enerji açığa çıkarıldığı bir süreçtir [3]. Enzimlerin ise bu süreçte amino asit, lipid ve karbonhidrat sentezi ve bunların yıkım reaksiyonlarından, nöronlar aracılığıyla uyarıların iletimi, kontrollü hücre ölümü ve doku farklılaşması, DNA' nın tamiri ve sentezi, kan pıhtılaşması, proteinlerin membranlar arasında alınması ve verilmesine kadar önemli görevleri vardır.

Enzimler, canlı hücrelerin fonksiyon ve özelliklerini düzenlemenin yanısıra endüstriyel ölçekli birçok reaksiyonlarda da geniş bir alanda faaliyet gösterir. Enzimler ekmek, peynir, bebek gıdalarının üretiminde, temizlik malzemelerinde, tıpta teşhis ve tedavi sürecinde, kimya, kâğıt, fotoğraf, biyoyakıt endüstrisinde, ziraatte, kontakt lens temizleyicilerinden biyolojik savaşta kullanıma kadar birçok alanda kullanılmaktadır. Enzimlerin bu kadar fazla alanda kullanılmalarının sebepleri; in vitro şartlarda aktif olması, maliyet bakımından ucuz olması ve enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmamasıdır [4].

Endüstriyel uygulaması olan ticari enzimlerin en önemli ve en büyük sınıfını proteolitik enzimler oluşturmaktadırlar. Dünya enzim pazarının % 60'ında proteinleri parçalayan proteolitik enzimler yer almaktadır. Proteazlar, çamaşır deterjanları, deri, et, süt, ilaç, bira, fotoğraf, organik sentezlerde ve atıkların muamelesinde kullanılmaktadır [7].

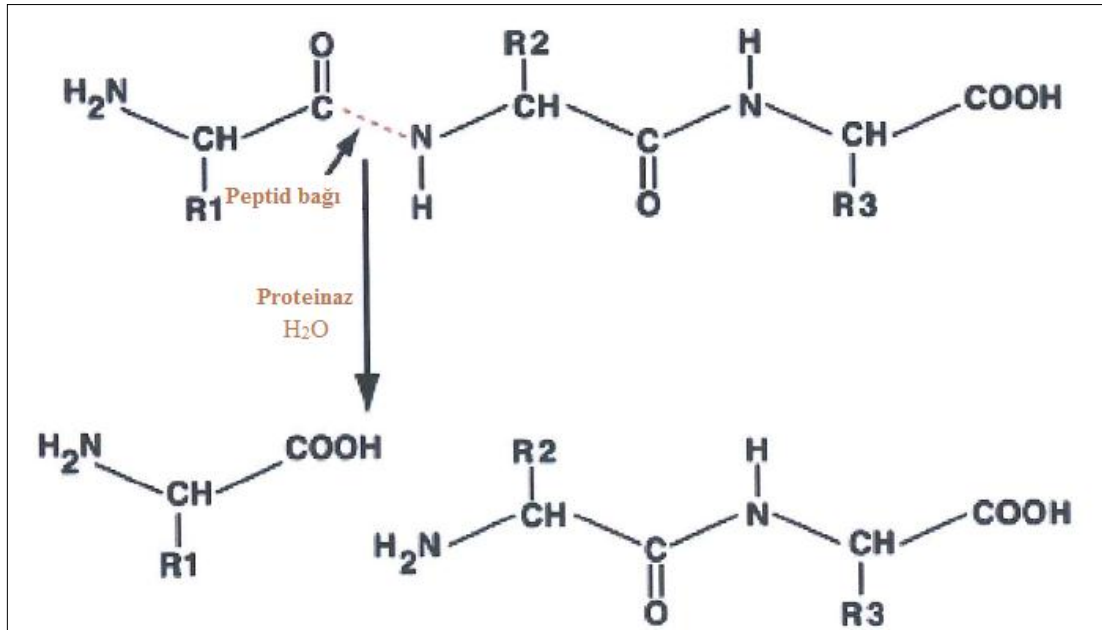
Bu çalışmada, *Clostridium botulinum* Tip A' dan proteaz enzimi kısmi olarak saflaştırılmış ve karakterizasyon çalışmaları kapsamında optimum sıcaklık ve pH, sıcaklık ve pH kararlılığı, enzime metal iyonlarının, doğal substratların, organik çözücülerin, deterjan yüzey aktif maddelerin, yükseltgenlerin ve amino asit inhibitörlerinin etkisi incelenmiştir.

2. GENEL BÖLÜM

2.1. Kuramsal Temeller

2.1.1. Proteazlar

Proteazlar, proteinlerin yapısındaki peptid bağlarının hidrolitik parçalanmasını katalize eden enzimlerdir. Peptid bağlarının H_2O 'nun varlığında proteazlar tarafından hidrolizi proteoliz olarak adlandırılır. Proteolizin ürünleri peptid fragmentleri, proteinler ve serbest amino asitlerdir [5] (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Proteolizin şematik olarak gösterimi

Proteazlar Uluslararası Biyokimya Birliği'nin Enzim Komisyonu tarafından, "proteazlar" ve "peptidazlar" olarak iki gruba ayrılmıştır. Proteazlar, protein molekülündeki iç peptid bağlarına, peptidazlar ise peptid zincirinin amino veya karboksil uçlarına etki etmekte ve buna göre de aminopeptidaz veya karboksipeptidaz adını almaktadır [6].

Proteazlar uzun amino asit dizilerini fragmentlere ayırarak bütün proteinlerin sentezinde, büyüklüklerinin kontrolünde, kompozisyonlarında, şekillerinde, döngülerinde ve son yıkılımları için gerekli olan fizyolojik süreçte rol oynarlar [7]. Proteinlerin dönüşümünü sentezini ve aktivasyonunu kontrol ederek birçok fizyolojik süreçleri düzenleyen proteazlar gebelikte, doğumda, gelişmede, olgunlaşmada ve hatta bütün organizmaların ölümünde önemli düzenleyici roller oynar [8]. Proteazların canlıların yaşamları boyunca düzenleyici rollere sahip olmasından dolayı kanser ve AIDS gibi öldürücü hastalıklara karşı gelişen terapötik ajanlar için potansiyel bir hedef olmuştur [9].

Proteazlar, proteinazlar veya peptidazlar organizmada sentezlenen proteinlerin kompozisyonunun, büyüklüğünün, biçiminin ve döngüsünün kontrolünde esansiyel olan enzimlerdir. Bu enzimler kanın pıhtılaşması, kontrollü hücre ölümü ve doku farklılaşması gibi yaşam için önemli biyolojik süreçlerde rol oynar [10]. Bu fonksiyonlarının bir sonucu olarak proteazlar DNA replikasyonu ve transkripsiyonunu, hücre çoğalması ve farklılaşmasını, doku morfojenезini ve yeniden yapılanmasını, anjiyogenezi, nörojenezi, ovülasyonu, döllenmeyi, yara iyileşmesini, kök hücre mobilizasyonunu, iç dengeyi, kan pıhtılaşmasını, inflammasyonu, bağışıklığı, otofajiyi, ihtiyarlılığı, kangren ve apoptozisi etkiler [11].

Proteazlar sadece metabolik süreçlerde rol oynamazlar, ayrıca endüstride de yaygın kullanım alanlarına sahiptirler. Bugün proteazlar deterjan, yiyecek, farmasötik, deri, atık yönetimi, fotoğraf gibi çeşitli endüstriyel sektörlerindeki toplam enzim satışlarının yaklaşık olarak % 60' ını oluşturur [12].

2.1.2. Proteazların sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği - Numaralandırma Komitesine göre proteazlar sınıf 3 ün (hidrolazlar) alt sınıf 4'e aittirler. Fakat yapılarının ve işlevlerinin çeşitliliğinden dolayı genel bir enzim sınıflandırılmasına uymamaktadır. Bu yüzden proteazlar 3 ana kriterle sınıflandırılmaktadır.

- i. katalizledikleri reaksiyon tipi
- ii. katalitik bölgenin kimyasal yapısı
- iii. yapılarıyla ilgili evrimsel ilişki [9].

Çizelge 2.1. Proteazların sınıflandırılması

1. Katalitik Bölgedeki İşlevlerine Göre
1.1 Ekzopeptidazlar
1.1.1 Aminopeptidazlar
1.1.2 Karboksipeptidazlar
1.1.2.1 Serin tipi
1.1.2.2 Sistein tipi
1.1.2.3 Metallo tipi
1.2 Endopeptidazlar
1.2.1 Serin proteazlar
1.2.2 Sistein proteazlar
1.2.3 Aspartil proteazlar
1.2.3 Metallo proteazlar
2. Aktif Bölgedeki Fonksiyonel Gruplara Göre
2.1 Serin proteazlar
2.2 Sistein proteazlar
2.3 Aspartil proteazlar
2.4 Metallo proteazlar
3. Kaynağına Göre
3.1 Bitkisel proteazlar
3.2 Hayvansal proteazlar
3.3 Mikrobiyal proteazlar

Katalitik bölgedeki işlevlerine göre proteazlar

Proteazlar etki gösterdikleri yere göre endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Ekzopeptidazlar, substratın amino yada karboksil ucuna yakın peptid bağlarını ayırırlar. Endopeptidazlar ise peptid zincirinin N- ve C- uçları dışında zincirin iç bölgelerindeki peptid bağlarına etki ederler.

Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar substratın C ya da N ucundan amino asit hidrolizini katalizlerler. Ekzopeptidazlar amino ucundan ya da karbonil ucundan katalizleyen türlerine göre alt sınıflara ayrılırlar.

Aminopeptidazlar, polipeptid zincirinin ucundaki serbest N terminalinde işlevseldirler [9]. Aminopeptidazlar (AP) amino ucundaki ilk iki kalıntıyı katalizleyen enzimler dipeptidil peptidaz, üç kalıntıyı katalizleyen enzimler tripeptidil peptidaz olarak sınıflandırılmıştır. Aminopeptidazlar hayvansal, bitkisel ya da mikroorganizma kaynaklı olabilirler. Bulundukları kaynaklarda sindirim, protein bağlanması, sinyal iletimi, peptid hormonlarının regülasyonu gibi fizyolojik ve patofizyolojik işlevlere sahiptirler. AP'lerin büyük çoğunluğunun optimum pH'sı nötral pH olup, optimal sıcaklıkları 37–50 °C civarında değişmektedir. Bazı AP'ler 100 kD'dan daha büyük molekül ağırlıklarına sahiptirler. [13].

Karboksipeptidazlar polipeptid zincirinin karboksil ucunda etkilidir. Karboksipeptidazlar (CP) kendi aralarında serin tip, metaloproteaz, sistein tip, dipeptidil dipeptidaz ve dipeptidaz olarak alt sınıflara ayrılmıştır. Karboksipeptidazlar karboksil uçtaki son peptid bağı hidrolyze ederler. Dipeptidil karboksipeptidazlar ise karboksi uca bulunan son peptid bağından bir önceki peptid bağı hidrolyz ederler [14].

Aminopeptidazlar ve karboksipeptidazların yanı sıra tanımlanmış iki ekzopeptidaz ailesi bulunmaktadır. Bunlar dipeptitleri hidrolyzleyen dipeptidazlar ve prostetik gruba bağlı aminoasitlerin karboksil veya amino uçlarındaki peptit bağlarının hidrolyzini katalize eden omegapeptidazlardır [15].

Endopeptidazlar

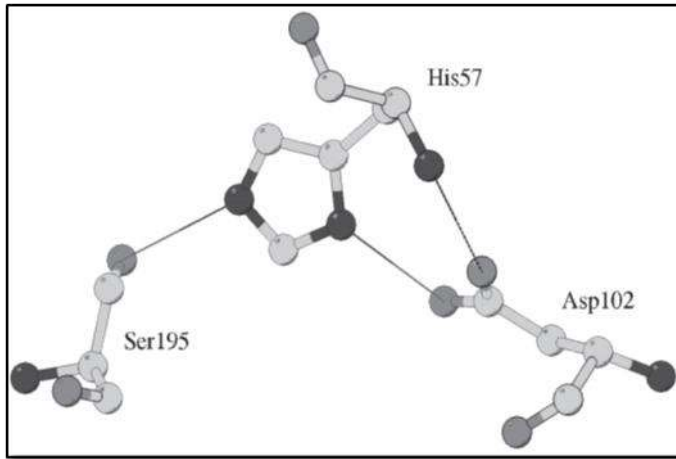
Endopeptidazlar N ve C uçlarından uzak polipeptid zincirinin daha iç bölgelerinin peptid bağlarındaki işlevleriyle karakterize edilir. Serbest amino veya karboksil gruplarının varlığının enzim aktivitesi üzerinde negatif etkisi vardır. Endopeptidazlar katalitik mekanizmalarına göre serin proteaz, aspartik proteaz, sistein proteaz, metalloproteaz olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır [9].

Çizelge 2.2. Proteazların hidrolizleme biçimlerine göre sınıflandırılmaları [16].

Proteaz	EC No
Ekzopeptidazlar	
<i>Aminopeptidazlar</i>	3.4.11
Dipeptidil peptidazlar	3.4.14
Tripeptidil peptidazlar	3.4.14
<i>Karboksipeptidazlar</i>	
Serin tip proteaz	3.4.16
Metalloproteaz	3.4.17
Sistein tip proteaz	3.4.18
Dipeptidil dipeptidaz	3.4.15
Dipeptidaz	3.4.13
<i>Omegapeptidaz</i>	
Endopeptidazlar	
Serin proteaz	3.4.21
Sistein proteaz	3.4.22
Aspartik proteaz	3.4.23
Metalloproteaz	3.4.24

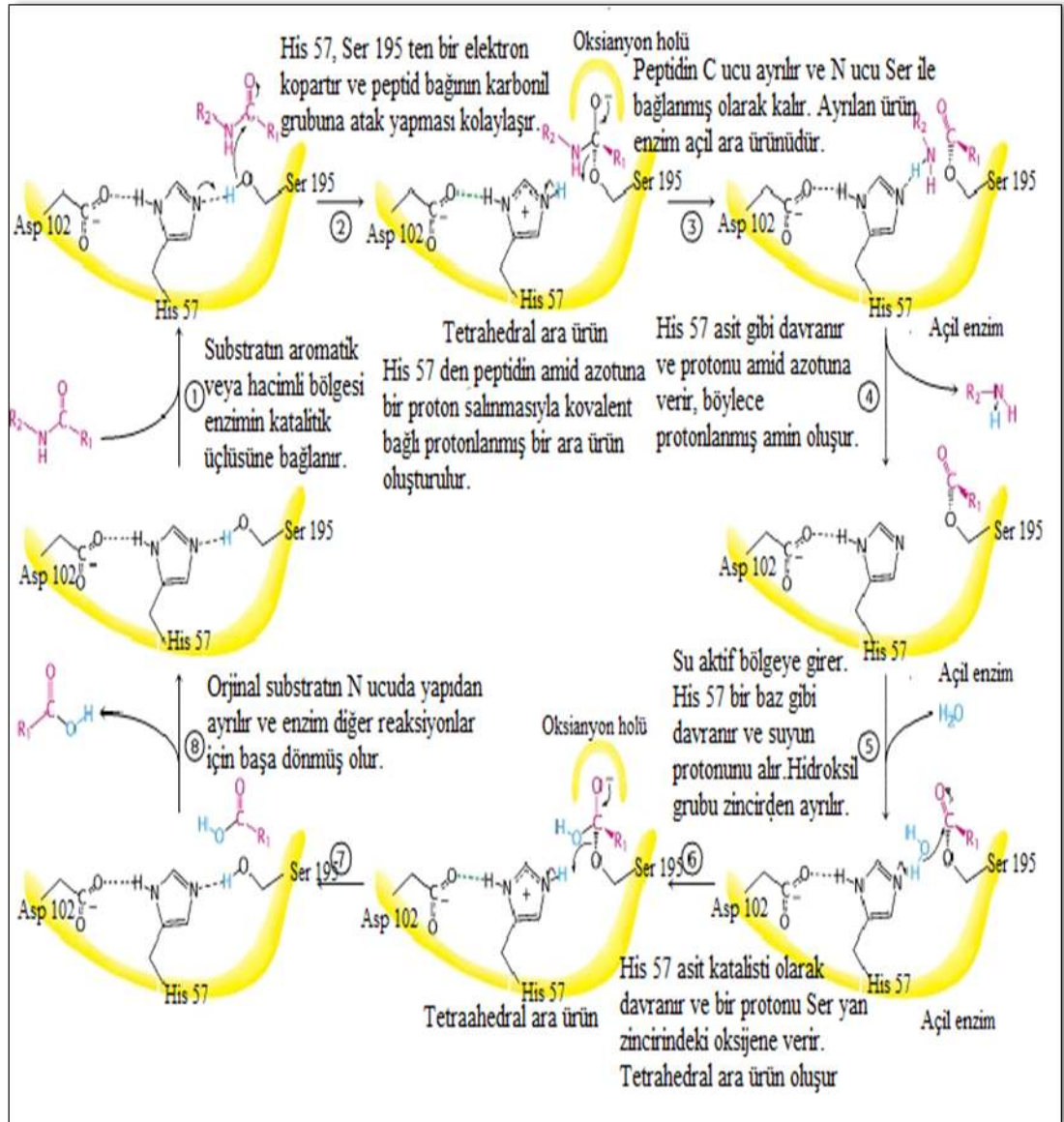
Serin Proteazlar (3.4.21)

Serin proteaz aktif merkezlerindeki serin grubunun varlığıyla karakterize edilir. Organizmalar için gerekli olduğundan dolayı ökaryotlar, bakteri ve virüslerde bulunur. Yapısal benzerlik açısından proteazlar 20 familya içinde gruplanır ve ortak atalarıyla 6 klana ayrılır. Kimotripsin (SA), subtilisin (SB), karboksipeptidaz C (SC) ve *Escherichia* D-Ala–D-Ala peptidaz A (SE) klanlarının bireyleri arasında akrabalık ilişkisi yoktur. Bu da serin proteazların en az 4 ayrı evrimsel kökeni olduğunu gösterir. Klan SA, SB ve SC serin (nükleofil), aspartat (elektrofil) ve histidin (baz) aminoasitlerini (katalitik triad) içeren reaksiyon mekanizmaları vardır. Bu bölgelerin geometrik oryantasyonları benzer olmasına rağmen proteindeki katlanmalar farklıdır. Bu farklılıkta bu üç klanı birbirinden ayırmaktadır. SE ve SF klanlarının Ser-His-Asp triadları olmamasından dolayı katalitik mekanizmaları SA, SB ve SC'ninkinden farklıdır [17].



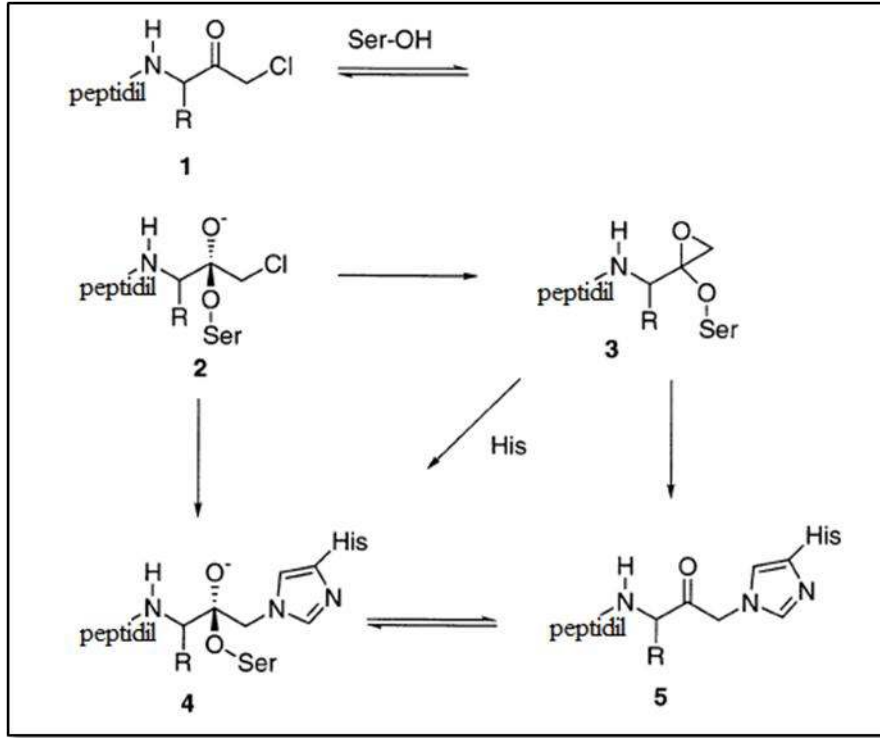
Resim 2.1. Kimotripsinin katalitik triadı [18].

Serin proteazlar (EC 3.4.21), substrat tercihlerine göre 3 grupta toplanır. Tripsin benzeri serin proteazlar, pozitif yüklü amino asitten sonraki peptid bağına hidrolizlerler. Kimotripsin benzeri serin proteazlar, büyük hidrofobik aminoasitten sonraki peptid bağına hidrolizlerler. Elastaz benzeri serin proteazlar ise küçük hidrofobik aminoasitten sonraki peptid bağına hidrolizlemektedirler [9].



Şekil 2.3. Kimotripsinin katalitik etki mekanizması [21].

Serin proteazlar fenil metil sülfonil florür (PMSF), di-izopropil floro fosfat (DFP), tosil-L-lizin klorometil keton (TLCK), 3,4- dikloroizokumarin (3,4-DCI) gibi inhibitörler tarafından dönüşümsüz olarak inhibisyona uğratılmasıyla tanınır. Serin proteazlarının bazıları aktif merkezlerinin yakınında sistein kalıntıları olduğu için p-kloromerküribenzoat (PCMB) gibi tiol reaktifleriyle de inhibe olur [9].



Şekil 2.4. Serin proteazın peptidil klorometil ketonla inhibisyon mekanizması [22].

Serin proteazlar genelde nötral ve alkali pH'larda aktiftirler. Optimum pH aralığı 7-11 arasındır. Esterolitik ve amidaz aktivitelerini içeren geniş substrat spesifitesi mevcuttur. Molekül ağırlıkları 18 ve 35 kDa arasında değişir. İzoelektrik noktaları genelde 4- 6 arasındadır [9].

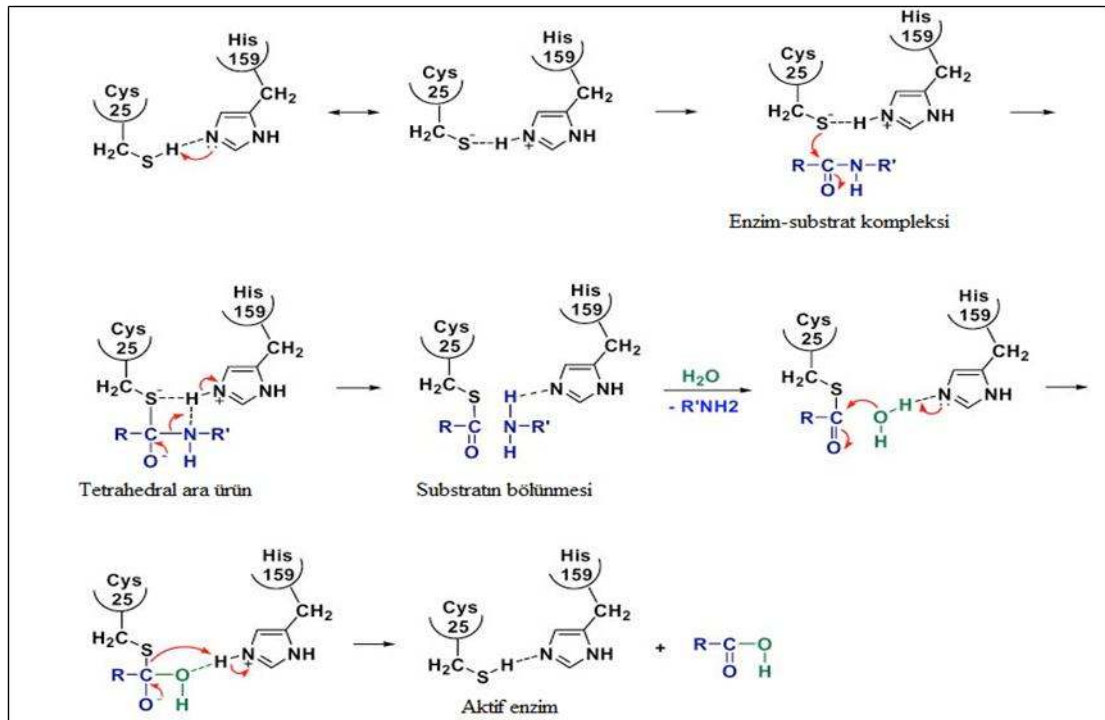
Serin alkalin proteazlar bakteriler, mayalar, küfler ve mantarlar tarafından üretilirler. Serin alkalin proteazlar DFP veya patates proteaz inhibitörüyle inhibe edilmelerine rağmen, tosil-L-lizin klorometil keton (TLCK) tarafından inhibe olmazlar. Alkalin proteazların optimum pH'ları 10 ve izoelektrik noktalarının da pH'ı 9 civarındadır. Molekül kütleleri ise 15-30 kDa arasındadır.

Sistein Proteaz (E.C 3.4.22)

Ökaryot ve prokaryotlarda bulunan sistein proteazlar 20 alt sınıfına sahiptir. Sistein proteazların aktiviteleri histidin ve sistein içeren katalitik triada bağlıdır. Sistein ve histidin kalıntılarının sırası (Cys-His veya His-Cys) familyalar arasında farklılık

gösterir [23]. Genelde sistein proteazlar HCN veya sistein gibi indirgeyici ajanların varlığında aktiftir. Yan zincirleri temel alınarak 4 gruba ayrılırlar. (i) papain benzeri, (ii) tripsin benzeri, (iii) glutamik asite özgü olanlar, (iv) diğerleri. Papain sistein proteazların en bilinenidir.

Papain ailesine ait sistein proteazların aktif bölgesi V-seklinde olup, katalitik diadını Cys ve His kalıntıları oluşturmaktadır. Katalitik işlevin ilk basamağı serbest enzimin substrata nonkovalent bağlanmasına ve enzim-substrat kompleksi oluşturmaya dayanır. Enzimin açılması ile enzimden ilk ürün R_1NH_2 ayrılır. Bir sonra ki basamakta açıl enzim H_2O ile reaksiyona girer ve serbest enzim oluşur. Serbest enziminde rejenarasyonu gerçekleşir [9]. Papainin katalitik mekanizması Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



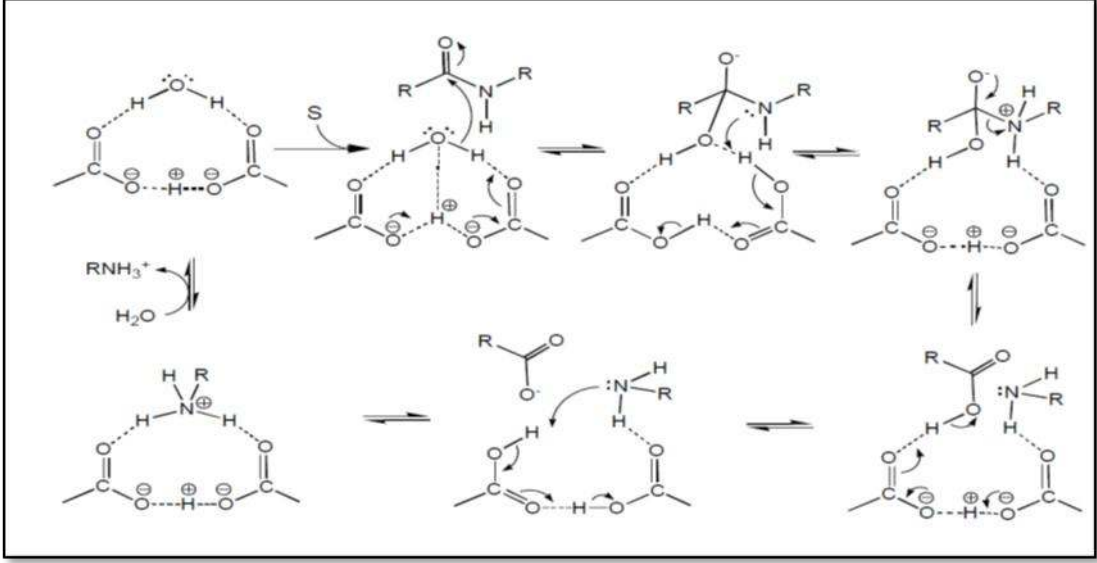
Şekil 2.5. Papainin katalitik mekanizması [24].

Sistein proteazlar nötral pH'da optimumdur. PCMB gibi sülfidril ajanlarına karşı hassastırlar, fakat DFP ve metal-şelat ajanlarından etkilenmezler [9]. Papain benzeri

birçok sistein proteazlar molekül ağırlığı 20–35 kDa olan bağıl olarak küçük proteinlerdir.

Aspartil proteazlar (3.4.23)

Genelde asidik proteazlar olarak bilinen aspartil proteazlar katalitik aktiviteleri için aspartik asit kalıntılarına bağlı olan endopeptidazlardır. Bitki, bitki virüsleri ve retrovirüslerde bulunurlar. Asidik proteazların doğada bulunabilirliği serin proteazlardan daha azdır. Asidik proteazlar 3 gruba ayrılırlar. Bunlar pepsin (A1) , retropepsin (A2), pararetrovirüslerden (A3) elde edilen enzimlerdir. A1 ve A2 nin birbirleriyle yakın ilgisi vardır fakat A3 bunlardan farklıdır. Aspartik asitler maksimum aktiviteyi pH 3-4 izoelektrik noktayı ise 3 ile 4,5 civarında gösterir. Molekül kütleleri 35-40 arasındadır. Aspartik proteazlar pepsatin tarafından inhibe edilirler. Ayrıca; bakır iyonları varlığında diazoasetil-DL-norlösin metil ester (DAN) ve 1,2 epeoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan (EPNP) gibi diazoketon bileşiklerine karşı da hassastırlar [9]. Aspartil proteazların proteinleri hidrolizleme mekanizması için genel asit–baz mekanizması önerilmiştir. Bu mekanizmada su; reaksiyona direk katılmaktadır. Mekanizma Şekil 2,6’da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Aspartil proteazların genel mekanizması [25].

HIV-1 proteazı X ışını kristalografi ile araştırılmış ve aspartik proteaz olduğu tespit edilmiştir. HIV-1 proteazı 99 aminoasitten oluşmuş alt gruplu bir homodimerdir. Aktif merkezde özdeş alt birimler mevcuttur ve Asp-Thr-Gly (Asp25, Thr26 ve Gly27) dizileri vardır. Enzimin aktif bölgesi iki alt birimin de yüzeyinde olup aktif bölge amino asit kalıntılarından biri olan Asp25'in bir alt biriminde eşleniği olan diğer Asp25' in de diğer alt biriminde yer aldığı gözlenmiştir.



Resim 2.2. HIV-1 proteazının üç boyutlu konformasyonel yapısı [26].

Metallo proteazlar (3.4.24)

Metallo proteazlar katalitik tür yönünden proteazların en farklısıdır. Diğer proteazlardan protein dizilimleri ve yapılarıyla ayrılmalarının yanı sıra aktiviteleri için çinko iyonuna gereksinim duymalarıyla karakterize edilirler. Bazı durumlarda, çinko; kobalt veya nikel gibi metallerle aktivitesini kaybetmeden yer değiştirebilir [27].

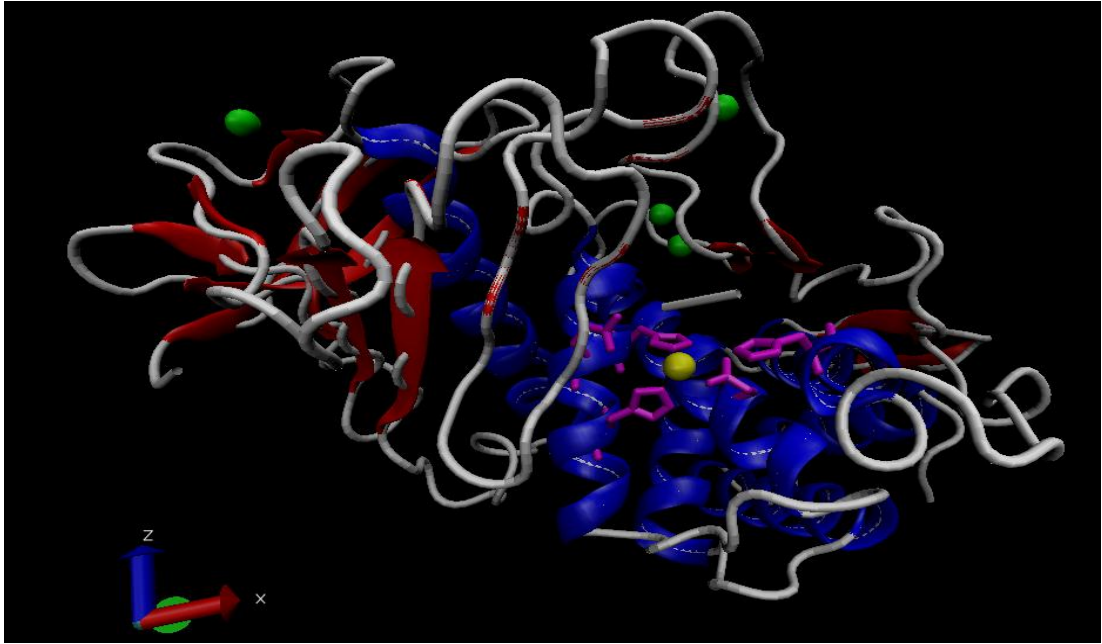
Metallopeptidazlarda çinko metal iyonu su molekülünü yerinde tutar ve yüklü aminoasit yan zincirleri metal iyonunun ligantları olarak iş görür. His, Glu, Asp ya da Cys kalıntıları ile oluşturulan kombinasyon aktif çinko bölgesinde üç çatalı (trident) bir yapı oluşturur ve aktif su molekülü koordinasyon küresini doldurarak tamamlar [28].

Metallo proteazlar yüksek organizmalarda kollogenaz, yılan zehirindeki hemorhagic toksin ve bakterilerde termolizin gibi proteazlar olarak canlılar arasında geniş yayılım göstermektedirler.

Metallo proteazların yaklaşık 30 familyası tanınmıştır. Bunlardan 17 si endopeptidaz, 12 si ekzopeptidaz ve 1'i hem endo hem de ekzopeptidazdır. Metallo proteazın familyaları metal bağlı bölgede ki amino asitin doğası temel alınarak farklı klanlara gruplandırılmıştır. Örneğin klan MA'nın HEXXH-E ve klan MB'nin HEXXH-H dizileri mevcuttur.

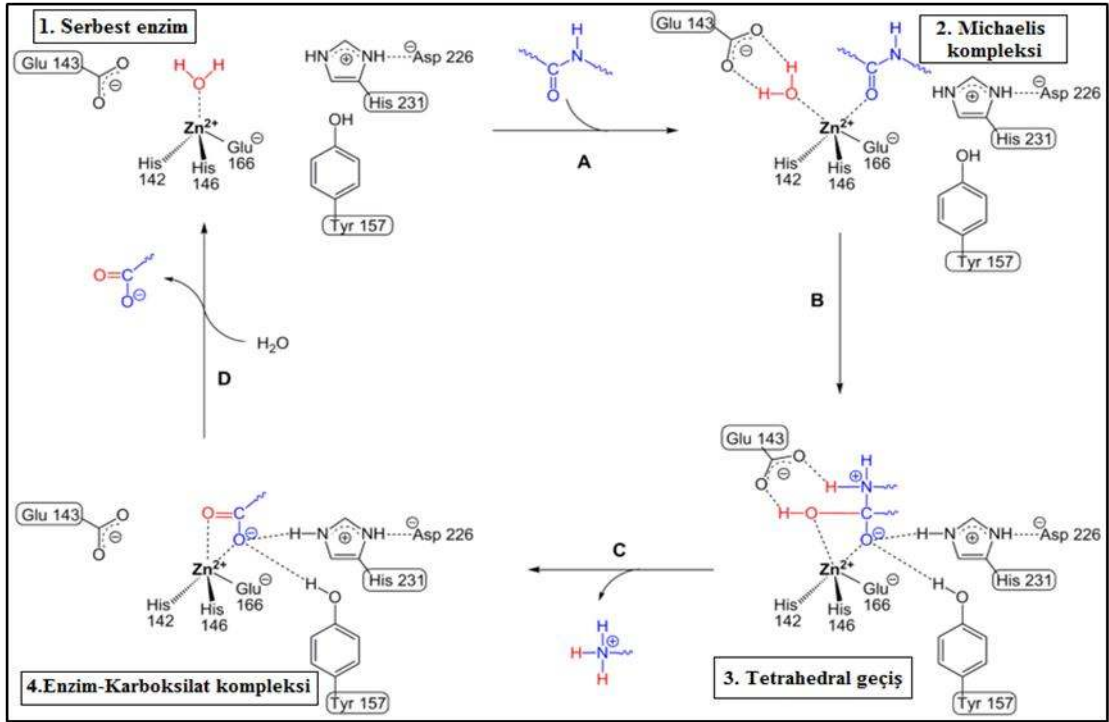
Etki spesifitelerine göre metallo proteazlar 4 gruba ayrılır. (i) nötral, (ii) alkalın, (iii) *Myxobacter* I, (iv) *Myxobacter* II. Nötral proteazlar sadece hidrofobik amino asitlere spesifiklik gösterirken alkalın proteazların çok geniş spesifiteleri vardır. *Myxobacter* I in küçük amino asit kalıntılarına spesifikliğı söz konusuyken diğer yandan *Myxobacter* II'nin peptid bağındaki lisin kalıntılarına spesifikliğı vardır. Metaloproteazlar etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) veya 1,10 fenantrolin gibi şelat yapıcı ajanlar ile muamele edildiklerinde metal iyonlarının taşınması dolayısıyla kolayca inaktive olurlar. Nötral metaloproteaz olan termolizin *B. stearothermophilus*

tarafından üretilmiştir. Tek zincirli bir peptittir ve molekül kütlesi 34 kDa'dur. İki katlı protein loblarının arasında Zn atomu gömülüdür ve Ca atomları proteinin termositabilitesini sağlar. Termolizin çok kararlı bir proteazdır ve 80 °C de yarım saat kalabilirler [9]. Termolizin bakteriler tarafından besin için egzojen proteinlerin yıkılmasında kullanılır [29].



Resim 2.3. Termolizinin genel yapısı (sarı: Zn^{2+} iyonları, yeşil Ca^{2+} iyonları) [30].

Metallo proteazın katalitik etki mekanizması diğer proteazlardan farklılık gösterir. Aktivite göstermeleri için aktif bölgesinde metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Termolizinin reaksiyon mekanizması Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Termolizinin reaksiyon mekanizması [31].

Kaynağına Göre Proteazlar

Proteazlar biyolojik kaynakların her bir parçasına dağılmıştır. Canlı organizmalarda farklı fizyolojik fonksiyonları yerine getiren proteazlar bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi kaynaklardan elde edilirler [32]. Proteazlar en çok bitkilerde bulunur. Bitkileri bakteriler, mantarlar, hayvanlar, algler ve virüsler takip eder [33].

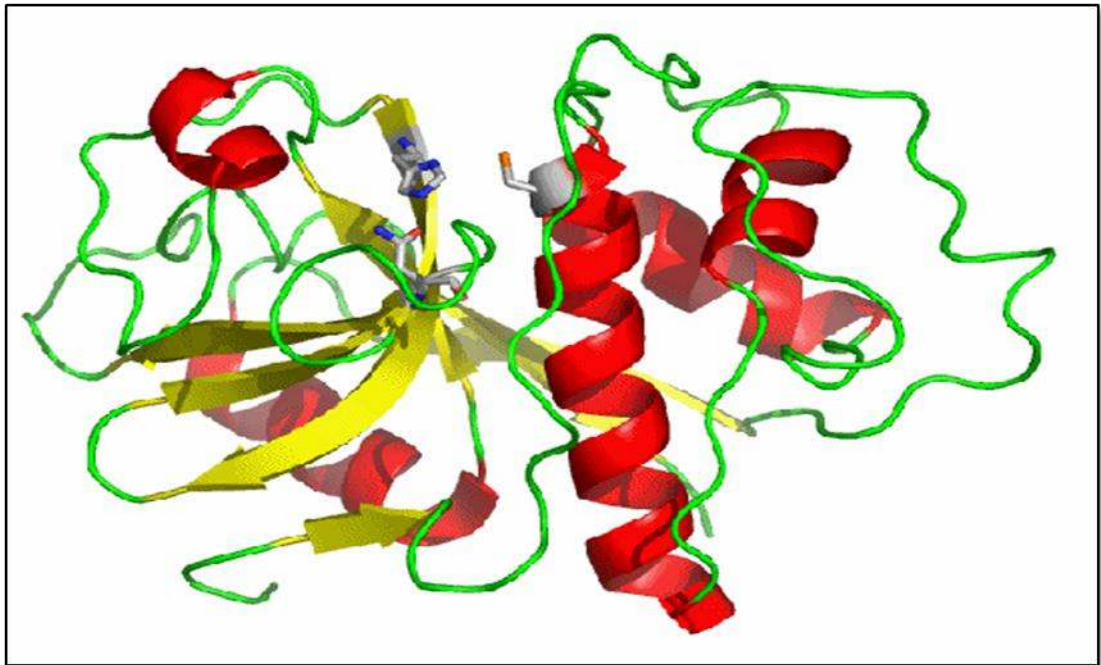
Bitkisel kaynaklı proteazlar

Enzimin saf elde edilmesi farklı proteinaz ve peptidaz izozimlerinin varlığından dolayı geniş spesifiklik gösterir. Enzimin performansı bitki kaynağına, bitkinin yetiştiği iklim koşullarına, ekstraksiyona ve saflaştırmada kullanılan metodlara bağlıdır. Örneğin bitki sağlıklıysa elde edilen enzim de o kadar aktiftir.

Bitki proteazları bitkinin hemen hemen her yerinde bulunmaktadır; kök, gövde, yaprak, çiçek, meyve, tohum, reçine ve lateks. Bitkilerde genelde sistein ve serin endoproteazları olur. Aspartik proteaz ve aminopeptidaz ise nadiren bulunmaktadır [33].

Carica papaya lateksleri proteolitik enzim bakımından zengindir. *Carica papaya* 'dan elde edilen enzimin ticari ismi papaindir. Papain batının subtropikal bölgelerinde, Orta Afrika ve Asya'da (Tanzanya, Uganda, Tayland ve Hindistan) yetişen olgunlaşmamış papaya meyvelerinden ekstrakte edilir.

Papain pH 5-9 arasında aktiftir ve 80 °C-90 °C'ye kadar kararlı kalabilir. Üç tane disülfid köprüsü ile stabilize olmuş 212 adet amino asitten oluşmuştur. Katalitik triadını sistein 25, histidin 159, asparajin 158 oluşturmaktadır. Molekül ağırlığı 23 kDa'dur. Papain endüstride etin yumuşatılmasında kullanılır. Ayrıca farmasötik, deterjan, yiyecek sektörlerinde de kullanımı mevcuttur.



Resim 2.4. Papain enziminin üç boyutlu yapısının gösterimi [34].

Bromelain ananasın özsuyundan ve kökünden elde edilen proteolitik enzimdir. Bromelain de papain gibi etin yumuşatılmasında kullanılır. Modern terapide anti-inflamatuar, anti-trombotik ve fibrinolitik aktivite gösterir [35]. Sistein proteaz olarak da karakterize edilir ve pH 5-9 arasında aktiftir. İnaktive olduğu sıcaklık 70 °C' dir [9].

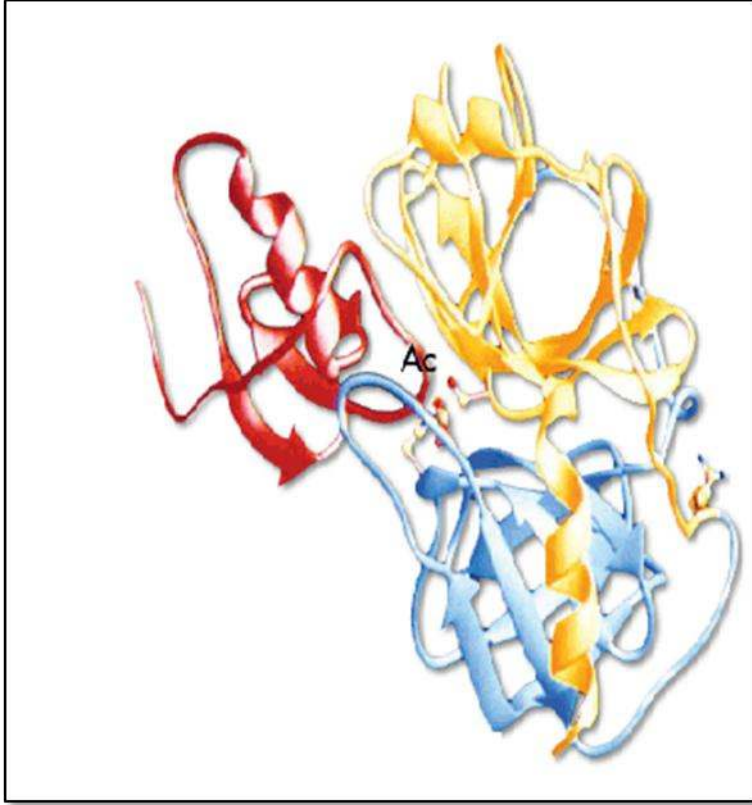
Kılların yıkılımını sağlayan keratinaz bitkilerin ürettiği proteolitik enzim gruplarından birisidir. Kıl ve tüyün paçalanması lizin gibi aminoasitlerin üretimi ve atık su sistemlerinin önlenmesi için önemlidir [9].

Hayvansal kaynaklı proteazlar

Hayvansal kaynaklı proteazların en yaygın olanları ve en bilinenleri pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve rennindir . Bu enzimler çok miktarda ve saf bir şekilde üretilir. Üretimleri kesilecek hayvanların kullanılabilirliğine bağlıdır [29].

Tripsin üç temel sindirim enzimlerinden biridir. Sindirim sürecinde, tripsin besin proteinleri moleküllerini peptid ve aminoasitlerine parçalamak için diğer enzimlerle işlev görür. Tripsin midede başlayan sindirim işlevine kısmen alkalın olan (pH 8) ince bağırsakta devam eder. Tripsin sadece arginin ve lizin tarafından karboksil gruplarıyla sarılan protein moleküllerindeki peptid bağlarına karşı aktiftir [32].

Tripsinin işlevi sırasında üretilen protein hidrolizatlarının tadı acı olduğundan gıda endüstrisinde uygulamaları kısıtlıdır. Tripsin bakteriyal ortamın hazırlanmasında ve bazı özel medikal uygulamalarda kullanılır [5].



Resim 2.5. Tripsin enziminin üç boyutlu yapısının gösterimi [37].

Kimotripsin memelilerin bağırsaklarında aktif olan proteolitik bir enzimdir. Karboksil gruplarındaki peptid bağlarının hidrolizinin katalizlenmesi 3 aromatik amino asidin biriyle (fenilalanin, tirozin ve triptofan) sağlanır. Saf kimotripsin pahalı bir enzimdir ve analitik uygulamalar için kullanılır [38].

Pepsin hemen hemen tüm omurgalıların midesinde bulunan asidik bir enzimdir. Pepsin bir aspartik proteazdır ve insan bağışıklık yetersizliği virüsü HIV-1 in olgunlaşmasından sorumludur. Optimum pH sı 1-2 civarındadır. Enzim iki hidrofobik aminoasit arasındaki peptid bağlarının hidrolizini katalizler [9,34].

Rennet inaktif şekilde üretilen pepsin benzeri proteazdır. Rennet pepsinin işleviyle veya otokataliziyle aktif rennine dönüşür. Genelde süt endüstrisinde kullanılır [9].

Mikrobiyal kaynaklı proteazlar

Şuan ki dünya enzim gereksinimlerini karşılamak için bitkisel ve hayvansal proteazların yetersizliği mikrobiyal proteazlarda ilginin artışına neden oldu. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteaz eldesinde karşılaşılan uygun iklim koşullarının sağlanması ve ülkelerin hayvancılık ile ilgili politikalarına bağımlılığı gibi dezavantajlar da ilginin mikrobiyal kaynaklı proteazlara kaymasına bir sebeptir. Mikroorganizma kaynaklı proteazlar biyoteknolojik uygulamalar için istenilen özelliklere sahip olduğundan dolayı bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteazlara tercih edilirler. Mikroorganizmalar dünyada ticari proteaz üretiminin yaklaşık üçte ikisini oluşturur [33,39].

Mikroorganizmalar proteazları hücre içi ve/veya hücre dışı olarak üretebilmektedir. Hücre içi proteazlar sporlanma ve farklılaşma, enzimler ve hormonların olgunlaşması gibi çeşitli hücresel ve metabolik süreçler için önemlidir. Hücre dışı proteazlar hidrolitik ürünlerden yararlanmak ve hücre çevresindeki proteinlerin hidrolizi için önemlidir. Aynı zamanda çeşitli endüstriyel işlemlerde protein yıkımına yardımcı olması açısından da önemlidir [39].

Mikrobiyal proteazlar; bakteriyel, fungal ve viral proteazlar olarak üç grupta incelenebilirler.

Bakteri kaynaklı proteazlar, büyük polipeptidlerin daha küçük peptidlere ve aminoasitlere hidrolizine yardımcı olurlar. Böylelikle onların hücre tarafından absorpsiyonunu kolaylaştırırlar. Hücre dışı enzimler, onların depolimerleşme aktivitesinden dolayı beslenmede büyük bir rol oynar. Hücre içi proteazlar hücrede uygun protein dönüşümü yapmaya katkısıyla bilinirler [40].

Nötral ve alkalın olan çoğu ticari proteazlar *Bacillus* cinsi mikroorganizmalardan üretilmektedir. Bakteriyel nötral proteazlar pH 5-8 aralığında aktiftir ve ısıya toleransları düşüktür. Nötral proteazlar diyet proteinlerinin hidrolizinde hayvansal proteazların yaptıklarından daha az acılık oluşturdıklarından gıda endüstrisinde

değerlidir. Isıya toleranslarının düşük olması yiyecek hidrolizatlarının üretimi süresince aktivitelerini kontrol etmeleri için bir avantajdır. Nötral proteazların birkaçı metaloproteaza aittir ve aktiviteleri için divalent metal iyonuna gereksinim duyar. Diğerleri de şelat ajanlarından etkilenmeyen serin proteazlardır.

Bakteriyal alkalın proteazlar geniş substrat spesifitesi ve alkalın pH'da yüksek aktivitesiyle karakterize edilirler. Optimum sıcaklıkları 60 °C civarındadır. Bakteriyal alkalın proteazların bu özellikleri onları deterjan endüstrisinde kullanımları için uygun kılar [32].

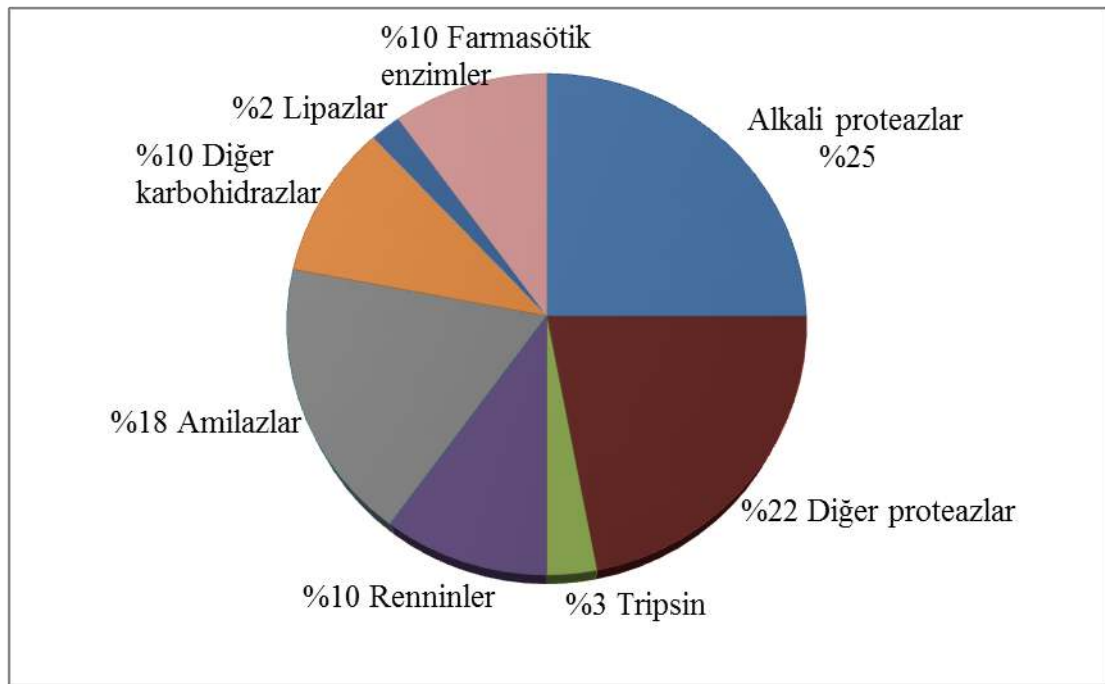
Mantarlar, bakterilere göre daha geniş çeşitte enzim üretirler. Örneğin *Aspergillus oryzae* asidik, nötral ve alkalın proteaz üretebilmektedir. Fungal proteazlar pH 4'ten 11'e kadar geniş bir aralıkta aktiftir. Fakat bakteriyal enzimlere nazaran ısıya karşı toleransları düşüktür ve reaksiyon hızları daha yavaştır.

Viral proteazlar AIDS ve kanser gibi ölümcül hastalıklara sebep olan virüslerin proteinlerinin işlenmesinde fonksiyonel tutulumlarından dolayı önem kazanmışlardır. Serin, aspartik ve sistein proteazlar çeşitli virüslerde bulunurlar. Virüslerin kodladığı peptidazların hepsi endopeptidazdır. Bunların hiçbirisi metallopeptidaz değildir. Viral proteazlar, viral replikasyon ile birleşimi koordine etmek ve düzenlemek için optimize edilmişlerdir. Yapılan araştırmalarda en önemli nokta viral proteazların üç boyutlu yapısı ve sentetik inhibitörler ile etkileşimidir [9].

2.1.3. Proteazların Endüstride Kullanım Alanları

Proteazlar hem endüstride hem akademide en önemli enzim gruplarından birisini oluşturur. Proteazların yıllık satışları toplam dünya enzim pazarının % 60'ını oluşturur [41]. Hayvan ve mantar proteazlarıyla karşılaştırıldığında bakteriyal proteazların yüksek üretim kapasitesi ve katalitik aktivitesinden dolayı gıda, deri, deterjan vb endüstrilerde daha çok ticari uygulamaları mevcuttur. Yüksek sıcaklıkta ve farklı pH değerlerinde yüksek aktiviteli proteazların ilaç, tedavi, kontakt-lens temizleme ajanı, deri, aminoasit üretimi, deterjan sektöründe yeni uygulamaları

mevcuttur [39]. Ek olarak proteazların fonksiyonları ve termal stabilitesi protein mühendisliğinde farklı sektörlerde kullanımını anlamak için araştırılması gereken en önemli konudur [42].



Şekil 2.8. Enzimlerin endüstride kullanım yüzdeleri [43].

Deterjan endüstrisi

Proteazlar günlük yaşamda birçok alanda kullanılan deterjanların bileşenlerinden birisidir. Deterjanlarda proteazın kullanımı dünya çapındaki toplam enzim satışlarının %25'ini oluşturur.

İdeal deterjan proteazları yiyecek, kan, çim gibi lekelerin büyük bir kısmının uzaklaşması için geniş substrat spesifitesine sahip olması gerekir. İyi bir deterjan enzimi oksitleme ajanı ve ağartıcılarla beraber stabilitesini koruyabilmelidir. Bir deterjandaki proteazın en iyi performansının anahtar parametresi onun pI'sıdır. Enzimin pI' sı deterjan çözeltisinin pH'sıyla örtüştüğü takdirde enzimin bu uygulama için uygun olduğu bilinir [33].

Çamaşır deterjanlarında kullanılan enzimlerin yüksek verime sahip olması için, 1 saat boyunca 95 °C'ye ulaşan sıcaklıklarda pH 9-11 arasında aktivitesini koruması, beyazlatıcı ve yüzey temizleyicilerin varlığında kararlı olması ve de deterjan içerisinde en az 1 sene aktivitesini kaybetmemesi gerekmektedir. Son yıllarda deterjanlarda kullanılan bütün proteazlar, *Bacillus* türleri tarafından üretilen serin ve alkalin proteazlardır [40].

Deri endüstrisi

Deri işleme sürecinde ortaya çıkan çevresel kirlilik Çin ve Hindistan gibi deri ihracatları yapan ülkelerde endüstriyel problem olmuştur. Kalsiyum oksit, sodyum sülfür gibi tehlikeli kimyasallar deri işleme esnasında ortaya çıkar. Bu yüzden bu tehlikeleri gidermek için çevre dostu teknolojilere ihtiyaç duyulmuştur. Enzimler ıslatma, sepileme, kireç giderme ve kıl giderme gibi deri işleme sürecinde uygun alternatifler sunar. Elastotik ve keratinolitik aktiviteye sahip olan bazı bakteriyel alkalin proteazlar postların kıl ve tüylerden arındırılmasını sağlar [44]. Proteazlar derideki nonkolojen bileşenleri selektif olarak hidrolizler, aynı zamanda albumin ve globin gibi globular proteinlerin de uzaklaştırılmasını sağlar. Bu adım alkali ortamda gerçekleştirilmektedir. Bu süreç sodyum sülfür muamelesinden daha güvenli ve daha uygundur [41].



Resim 2.6. Proteazın 24 saat 37 °C' de keçi kılıyla muamelesi (sol: kontrol, sağ: test sonucu) [46].

Gıda endüstrisi

Gıda endüstrisinde proteazların kullanımı eskiye dayanır. Proteazlar peynir yapımı, fırıncılık, soya hidrolizatlarının hazırlanması ve et yumuşatma gibi değişik amaçlar için kullanılır [33].

Alkalın proteazlar iyi tanımlanmış peptidlerin hidrolizatlarını üretmek için bitki, balık veya hayvanlardan hidrolize edilebilir. Ticari alkalın proteaz olan *Alcalase* terminal hidrofobik amino asitler için önemli derecede spesifikliğe sahiptir. Bu enzim kullanılarak daha az acı hidrolizatlar ve acısı giderilmiş enzimatik peynir altı suyu protein hidrolizatları elde edilmiştir. Genelde kazein, peynir altı suyu proteini ve soya proteinlerinden elde edilen protein hidrolizatları bebek mamaları yapımında kullanılır. Ayrıca proteince zengin terapötik besinlerde ve meyve sularının zenginleştirilmesinde kullanılabilir [39].

Proteazlar etin yumuşatmasında önemli bir rol oynar. Alkalın elastaz ve termofilik alkalın proteazların kas lifi proteinlerin yanı sıra konektif doku proteinlerini hidrolize edebildikleri için etleri yumuşattıkları kanıtlanmıştır. Yumuşatma işlemi, toz halindeki enzimin et üzerine serpilmesi, ya da etin proteaz enzim çözeltisine daldırılması veya konsantre proteazın ete enjeksiyonu ile yapılabilmektedir [39].

Atık arıtımı endüstrisi

Alkalın proteazlar endüstriyel ve evsel atıkların işletilmesinde önemli derecede kullanılmaktadır. Bu proteazlar çok basamaklı süreçlerle katılardaki proteinleri çözerek balık veya evcil hayvanlar için konsantre sıvı ürünler veya kuru katı maddeler hazırlayabilir [39].

Tüy, saç, tırnak, boynuz gibi lifsel proteinler doğada bol miktarda bulunur. Proteazların proteolitik aktiviteleriyle bu atıklar parçalanabilir. Bu özellikleri ile proteazlar son zamanlarda atık yönetiminde kullanılmaktadır.

İlaç endüstrisi

Proteazların geniş çeşitliliği ve spesifitesi etkili terapötik ajanlarda büyük avantaj sağlar. Clostridial kollajenaz veya subtilizin yara ve yanıkların tedavisinde geniş spektrumlu antibiyotik ile kombinasyonu halinde kullanılır. *E. coli*'den izole edilen asparjinaz lenfositik lösemnin farklı formlarındaki kan dolaşımından asparjin elimine etmek için kullanılır. *Conidiobolus coronatus*'dan elde edilen alkalın proteaz hayvan hücrelerindeki tripsinle yer değiştirebilir. *Jatropha curcus*' un latekslerinden saflaştırılan bitki proteazı yara iyileştirme ajanı olarak aktiftir [32].

Gümüş eldesinde proteazlar

Alkalın proteazlar kullanılmış X- ray veya fotoğraf filmlerindeki gümüşün geri dönüşümünde önemli bir rol oynar. Bu atık filmlerin jelatin tabakalarında ağırlıkça %1,5-2 oranında gümüş içerir. Bu gümüş filmlerin yakılmasıyla elde edilir fakat buda istenmeyen çevresel kirliliğe sebep olur. Gümüş jelatine bağlı olduğundan proteolitik uygulamalarla protein tabakadan gümüşün çıkarılması mümkündür. Enzimatik hidrolizle olan bu işlem ayrıca polyester filminde geri kazanılmasını sağlar [33].

Bunların dışında proteazlar kozmetik endüstrisinde, bira yapımında, fırıncılıkta, hayvan yemi üretiminde, klinik uygulamalarda, tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır. Ayrıca endüstriyel ve tıbbi uygulamaların dışında temel araştırmalarda da önemli rolleri vardır [32].

Çizelge 2.3. Endüstride proteazlar [33].

Endüstri	Enzim	Uygulamalar
Deri	Tripsin Diğer proteazlar	Derinin yıkanması Yüzeyin kıl ve tüylerden arındırılması
Gıda	Farklı proteazlar	Proteince zengin gıdaların modifikasyonu
Fırıncılık	Nötral proteaz	Hamurun karışma süresini kısaltma
Süt	Rennet ve tripsin, kimotripsin	Süt proteinin koagülasyonu, peynir altı suyu prosesi
Deterjan	Alkalın proteaz	Lekelerin uzaklaştırılması
Et	Papain	Et yumuşatma
İçecek	Papain	Bulanıklığın giderilmesi
Şekercilik	Termolizin	Aspartam sentezi
Farmasötik	Tripsin	Ölü dokuların kaldırılması ve kan pıhtısının çözünmesi
	Kimopapain	Lösemnin belirli tiplerinin tedavisi

2.1.4. *Clostridium botulinum* hakkında genel bilgi

Clostridium gram pozitif, hareketli ve çubuk şeklindeki bakterilerdir. Endospor üretebilen zorunlu anaeroblardır. Karbonhidratları parçalayarak butirik asit, asetik

asit, aseton, butanol, izopropanol, etil alkol ve karbondioksit oluştururlar. Psikrotrof, mezofil, termofil türlere sahiptirler ve tabiatta yaygın olarak bulunmaktadırlar [47].

Clostridium botulinum suşlarının doğal habitatları toprak ve deniz tabanları ile kıyı sularıdır. G llerin sedimentlerinde, balıkların sindirim kanallarında, bahçede yetiştirilen sebzelerde bulunurlar [48].

Clostridium botulinum evrimsel olarak çok türlüdür. 7 ayrı tipin antijenik olarak birbirinden farklı sekiz ayrı n rotoksini mevcuttur (A, B, C1, C2, D, E, F, G). Bu antijenik türler serolojik toksin nötrleştirme testleri ve epidemiyolojik markerler sayesinde ayrılabilirler. Tip A, B ve F clostridial kromozomal bölgedeki genler tarafından kodlanır. Tip C,D ve E de bakteriyofajların taşıdığı genler tarafından, Tip G ise plazmid üzerinde kodlanır [49].

Clostridium botulinum bakterisi insanlar için en etkili biyolojik toksin olan botulinum n rotoksini (BoNT)  retirler. N rotoksin 100 kDa molek l kütlesinde ağır, 50 kDa molek l kütlesinde hafif aminoasit zincirlerinden oluşur. Bu zincirler basit disülfit köprüleri ile bağlanır. Bu disülfit köprülerin bütünlüğü BoNT'nin biyolojik aktivitesinin esasıdır [50].

Clostridium botulinum tarafından üretilen botulinum toksini insanlarda ve hayvanlarda botulizm denen hastalığa yol açar. İnsanlarda botulizme A, B, E, F tipleri neden olurken, C ve D tipleri hayvanlarda botulizm etmeni olarak belirlenmiştir. G tipinin botulizme neden olduğuna ilişkin veriler bulunmamaktadır [48].

Clostridium botulinum proteolitik aktivitelerine göre sınıflandırılmıştır.   lerinde A tipi toksin yapanlar ile B ve F tipi toksin yapanların bir kısmı proteolitik bulunmuştur. Proteolitik aktivite göstermeyen grupta; E tipinin tüm suşları ile B ve F tipi toksin yapanların bazı türleri yer almaktadır. C ve D tipi *C. botulinum* suşları da proteolitik değildir, her iki tip de ortak metabolik sisteme sahip olduğundan ayrı bir

grupta toplanmıştır. Proteolitik suşlardaki endojen proteazlar *C. botulinum* toksininin aktivitesini artırmada rol oynar [48].

2.2. Kaynak Araştırması

Dekleva ve Dasgupta 1990 yılında *Clostridium botulinum* Tip A'dan proteaz enzimini saflaştırmışlardır. Saflaştırmada amonyum sülfat çöktürmesinden sonra QAE-Sephadex Q-50, Sephadex G-100 ve CM- Sephadex C-50 kolonlarıyla enzimi saf olarak elde etmişlerdir. Substrat olarak *N*-benzoil-DL-arginin-*p*-nitroanilidi kullanmışlardır. Enzimin molekül kütleini sodyum dodesil sülfat kullanmadan poliakrilamid jel ile 62 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin izoelektrik noktasını 5,73 optimum pH'sını ise 6,2 olarak bulmuşlardır. Metal testinde enzimin aktivitesinin Mn^{2+} ve Fe^{2+} ile %30, Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} ve Cr^{3+} ile %10 arttığını tayin etmişlerdir. Enzimin PMSF ve SBTI inhibitörleriyle aktivitesinin arttığını ancak EDTA ile aktivitesinin hiç kalmadığını tespit etmişlerdir. Sonuçta saflaştırma süresi boyunca botulinum nörotoksininin farklı fragmentlere ayrıldığını tayin etmişlerdir. Nörotoksinin bozulmasını minimuma indirmek için de saflaştırma süresi boyunca nörotoksinin aktif proteaza muamelesinden kaçınılması gerektiği sonucuna varmışlardır [51].

Dasgupta ve arkadaşları 1971 yılında *Clostridium botulinum* Tip B'den proteaz enzimini saflaştırmışlardır. Amonyum sülfat çöktürmesinin ardından DEAE selüloz anyon değiştirme kromatografisi ile Sephadex G-100 kolon kromatografisi kullanmışlardır. Enzimi %33'lük verimle saf halde elde etmişlerdir. Substrat olarak BAPNA (*N*-benzoil-DL-arginin-*p*-nitroanilit) kullanmışlardır. Optimum sıcaklığı 37 °C ve optimum pH'yı ise 6 bulmuşlardır [52].

Nakane ve arkadaşları 1977 yılında yaptığı bir çalışmada *C. botulinum*'u %5 triptikaz, %0,5 Bacto-pepton, %0,2 glukoz ve %0,1 L-sistein HCl' den oluşan besiyerinde 30 °C'de 96 saat boyunca fermente etmiştir. Saflaştırmayı %60'luk amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE selüloz anyon değiştirici kolonla gerçekleştirmişlerdir. Saflaştırılan enzim DEAE selüloz anyon değiştirici kolonla

dört fraksiyona ayrılmıştır. Birinin EDTA ile inhibe olduğundan dolayı sülfidril bağlı proteaz, ikisinin PMSF ile inhibe olduğundan serin proteaz ve sonuncusunun ise metaloproteaz olduğunu tespit etmişlerdir [53].

Dasgupta ve arkadaşları tarafından 1972 yılında *C. botulinum*'dan proteaz enzimi saflaştırılmış ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Saflaştırma işlemleri amonyum sülfatla çöktürme ve QAE-Sephadex kromatografisi ile yapılmıştır. Enzimin molekül kütlesi Sephadex G-100 jel filtrasyonu ile 34,4 kDa olarak tespit edilmiştir. Amidaz aktivitesi için optimum pH 6,2, esteraz aktivitesi için ise 6,2-7 civarında bulunmuştur. İzoelektrik noktası ise 4,62 olarak kayda geçmiştir. Enzimin aktivitesinin ise Ca^{2+} varlığında arttığı bulunmuştur [54].

Croux ve arkadaşları 1990 yılında *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824'den hücre dışı asidik proteazı anyon değişim kromatografisiyle 66 kat saflaştırmışlardır. Enzimin molekül kütlesini SDS-PAGE ile 44 kDa olarak tayin edilmiştir. Enzimin düşük pH'larda ve 50 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda aktif olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin optimum pH'sı ve izoelektrik noktası sırasıyla 5 ve 3,3 olarak kayıtlara geçmiştir. Metal testinde enzimin aktivitesi üzerinde 10^{-3} M Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , ve Ag^{2+} iyonlarının etkisi olmadığını, Co^{2+} 'nin ise aktiviteyi artırdığını gözlemlemişlerdir. Ağır metallerden olan Hg^{2+} , Pb^{2+} ve Cu^{2+} 'nin ise oldukça yüksek inhibitör etkisi olduğunu tayin etmişlerdir. Enzimin EDTA ve o- fenantrolin inhibitörleriyle kuvvetlice inhibe olduğu ancak glikol-bis (β -aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraasetik asit (EGTA) inhibitöründen etkilenmediği bildirmişlerdir. Saflaştırılan enzimin düşük pH' larda aktif olduğundan dolayı aspartik asit proteazı olduğu düşünülmüşler fakat EDTA'nın enzim üzerindeki yüksek inhibe edici özelliğinden ve Co^{2+} 'nin aktiviteyi artırdığından dolayı da nötral metaloproteaz sınıfına ait olduğuna karar vermişlerdir [55].

Monod ve arkadaşları 1991 yılında enfekte olmuş akciğer dokularından izole ettikleri *Aspergillus fumigatus*'tan proteaz enzimini saflaştırmışlar ve karakterizasyon çalışmalarını yapmışlardır. Amonyum sülfat ve jel filtrasyonla yaptıkları saflaştırma işleminde enzimi % 43,1 saflıkla elde etmişlerdir. Enzimin molekül kütlesini jel

filtrasyon ve SDS-PAGE ile 33 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin optimum pH'sı 9 izoelektrik noktası ise 8,3 olarak bulmuşlardır. Triton 100, tween 80 gibi non-iyonik deterjanların, DMSO, etanol gibi organik çözücülerin, 2-merkaptetanol ve DTT gibi ajanların proteolitik aktivite üzerine etkisi olmadığını tayin etmişlerdir. PMSF' nin ise enzimi tamamen inaktif hale dönüştürdüğünü bildirmişlerdir. Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} ve Pb^{2+} iyonlarının enzimi tamamen inhibe ettiğini, Na^{+} ve K^{+} iyonlarının ise aktivite üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir [56].

Jin ve arkadaşları 1996 yılında *Clostridium perfringens* tip B NCIB10691'den amonyum sülfat çöktürmesini takiben iyon değişim ve hidrofobik etkileşim kromatografisini kullanarak proteaz enzimini saflaştırmışlardır. Enzimin molekül kütlesi SDS-PAGE ile 36 kDa olarak belirlenmiştir. Metal şelatlarından olan EDTA ve EGTA ile çinko spesifik şelatı olan 1,10- fenantrolin varlığında enzimin aktivitesi kaybolmuştur. PMSF, APMSF ve DTT gibi ajanlardan da etkilenmemiştir. Saf enzimden çıkarılan aminoasit dizisinde HEXXH motifi olduğu görülmüş ve enzimin çinko bağlı metaloproteaz olduğu saptanmıştır [57].

Salamone ve arkadaşları 1997 yılında topraktan izole ettikleri *Serratia marcescens* NRRL B-23112'den metalloproteaz enzimini saflaştırmışlardır. Enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, aseton çöktürmesi ve izoelektrik odaklama işlemleriyle %51 verimle 5,7 kat saflaştırmışlardır. Molekül kütlesini SDS-PAGE ile 50,9 kDa olarak tespit etmişlerdir. Sıcaklık profilinde 42 °C'de 1 saat aktivitesini koruduğunu, 55 °C'de ise 15 dakika sonra hiç aktivitesinin kalmadığını, pH profilinde ise en yüksek aktiviteyi 10'da gösterirken pH 11'de aktivitenin aniden azalmış olduğunu gözlemlemişlerdir. Enzimin EDTA ile inhibe olduğu gözlenirken aprotitin, bestatin, kimostatin ve PMSF varlığında aktivitesini kaybetmediğini tayin etmişlerdir. %1 SDS, %1 Tween-20, %1Triton X-100, %5 etanol ve % 0,5 2-merkaptetanol varlığında da aktivitesini koruduğunu tespit etmişlerdir. İzoelektrik odaklama ile saflaştırılan proteazın tek izoform olduğu kayıtlara geçmiştir [58].

Venter ve arkadaşları tarafından 1999 yılında süt ürünlerinden *Chryseobacterium indologenes* Ix9a' ı izole edilmiştir. Proteaz üretimi için farklı konsantrasyonlarda nutrient broth ve kazein içeren besiyerini geliştirilmiştir. Metalloproteaz, immobilize edilmiş metal affinite kromatografisiyle 64,5 kat saflaştırılmıştır. Enzimin spesifik aktivitesi 7,75 U/mg olarak kayıtlara geçmiştir. SDS-PAGE ile enzimin molekül kütlesi 24 kDa, optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 6,5 ve 50 °C olarak belirtilmiştir. Metal şelatı EDTA ve Zn spesifik şelatı 1,10-fenantrolin ile enzimin inhibe olduğu ve atomik absorpsiyon spektroskopisi ile de enzimin Ca^{2+} ve Zn^{2+} içerdiği tespit edilmiştir. Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} ve Mg^{2+} iyonları varlığında aktivitede artış olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda saflaştırılan enzimin bir metalloproteaz olduğu kanıtlanmıştır. Enzimin aminoasit analizleriyle enzimde glisin, alanin, metiyonin ve serin olduğu fakat sistein olmadığı gözlenmiştir. Substrat olarak kazein kullanılan enzimin K_m 'si 0,813 µg/ml olarak bulunmuştur. Kazein için K_m değerinin çok düşük olması bu proteazın süt ve süt ürünlerinde bozulmaya neden olmadığını göstermiştir [59].

Rozs ve arkadaşları 2001 yılında yaptıkları çalışmada tavuk tüyünden *Bacillus licheniformis*'i izole etmişlerdir. Proteaz üretimi için %0,2 glukoz, %0,2 maya ekstraktı ve %0,2 yağsız süt tozundan oluşan fermente ortamında bakteriyi çoğaltmışlardır. Proteazın molekül kütlesini Sephadex G 100 jel filtrasyon kromatografisiyle 42 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin substratı olarak N-benzoil-Phe-Val-Arg-p-nitroanilid kullanıldığında pH 8,5'ta ve 52 °C'de enzim en yüksek aktivitesini göstermiştir. Enzim tosil-L- fenilalanin klorometil keton, tosil-L- lizin klorometil keton, PMSF ve EDTA ile inhibe olmazken HgCl_2 ve parakloromerkuribenzoat ile aktivitesi düşmüştür. Bu sonuçtan da enzimin tiyol proteaz olduğu düşünülmüştür [60].

Kaur ve arkadaşları 2001 yılında su numunelerinden izole ettikleri zorunlu alkalofilik *Bacillus sp.* P-2'yi farklı konsantrasyonlarda glukoz, sukroz, maltoz, laktoz, gliserol, pepton, maya ekstraktı, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve üreden oluşan besiyerinde 30 °C'de 24 saat boyunca fermente etmişlerdir. İnorganik azot kaynakları ortama eklendiğinde proteaz üretiminin %90'lara kadar önlendiğini gözlemlemişlerdir. Proteazın optimum

pH'sını 9,6 ve pH 7-10 civarlarında aktivitesinin % 80'ini koruduğu tespit etmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığını ise 90 °C olarak bulmuşlardır. Enzimin bu sıcaklıkta 1 saatten fazla aktivitesini koruyabildiğini ve 121 °C'de ise aktivitesinin %37'sini kaybetmediğini tayin etmişlerdir. Enzimin pH ve sıcaklık stabiliteleri göz önüne alındığında deterjan formülasyonlarında kullanılabileceği yorumuna varmışlardır [61].

Kumar 2001 yılında Hindistan'dan toplanan toprak numunelerinden alkalofilik *Bacillus pumilus* MK6-5'i izole etmişler ve bakteriden proteaz enzimini saflaştırmıştır. Proteaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi ile üç basamakta saflaştırmıştır. Saflaştırılan enzimin SDS-PAGE ile molekül kütlesi 28 kDa olarak kayıtlara geçmiştir. Enzimin en aktif olduğu pH 11,5'tir. Optimum sıcaklığı ise 55-60 °C'dir. Enzim 30 °C'den 60 °C'ye kadar 30 dakikalık sürede aktivitesinin tamamını 70 °C'de ise % 65 ini korumuştur. 37 °C de ve pH 8 de sentetik substratla gözlenen K_m ve k_{cat} değerleri; Glu-Gly-Ala-Phe-pNA için 1,1 mmol/l ve 624 s⁻¹, Glu-Ala-Ala-Ala-pNA için 3,7 mmol/l ve 826 s⁻¹ dir. Enzim PMSF inhibitörüyle tamamen inhibe olmuş ve Ca²⁺, Mg²⁺ ile Mn²⁺ ile de aktivitesi artmıştır. Enzimin yüksek pH, termostabilite ve şelatlayıcı ajanlara karşı olan direncinden dolayı ultrafiltrasyon membran temizleme ve farklı biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabileceği yorumuna varılmıştır [62].

Huang ve arkadaşları 2002 yılında *Bacillus pumilus*'u proteaz üreticisi olarak kullanmışlardır. Üretim için %3 kepek, %2 soya fasulyesi unu, %0,3 maya ekstraktı, %0,3 K₂HPO₄, %0,04 NaH₂PO₄ ve %0,4 CaCO₃ içeren besiyerinde 35 °C ve 36 saat boyunca fermente etmişlerdir. Proteazı hidrofobik etkileşim kromatografisi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyonla 39 kat saflaştırmışlardır. Enzimin pI sınırı 9, molekül kütlesini de 32 kDa olarak bulmuşlardır. Enzim pH 10 da ve 55 °C'de maksimum aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Saf proteazın ilk 20 amino asit kalıntısının dizilimini AQTVPYGIPIQIKAPAVHAQG olarak tespit etmişlerdir. Enzimin amino asit dizilimi *B. pumilus* suşundan elde edilen diğer proteazlarla büyük oranda homojenlik gösterdiğini farketmişlerdir. Enzimin 1mM PMSF ve 1

mM DFP ile tamamen inhibe olduğunu ancak EDTA, EGTA ve pepstatin A inhibitörlerinden etkilenmediğini tayin etmişlerdir. Metal testinde ise Ca^{2+} , Mg^{2+} ne Na^+ iyonlarının aktiviteyi artırdığını fakat Cu^{2+} ve Zn^{2+} 'nin ise aktiviteyi azalttığını tespit etmişlerdir. Tüm bu sonuçlardan dolayı saflaştırılan proteazın serin proteaz olduğunu kararlaştırmışlardır. Serin proteazı ham deri üzerine 37°C 'de 4 saat boyunca muamele ettiklerinde proteazın kılları uzaklaştırmada etkili olduğunu gözlemlemişlerdir ve deri endüstrisinde bu enzimden faydanılabileceği kanısına varmışlardır [63].

Khan ve arkadaşları tarafında 2003 yılında bir filamentöz mantarı olan *Paecilomyces lilacinus*' dan proteaz enzimini saflaştırılmıştır. Serin proteaz kültür ortamından Sephrose-bacitracin affinite kromatografisiyle alınmıştır. Saflaştırılmış proteazın molekül kütlesi SDS-PAGE ile 37 kDa olarak bulunmuştur. Proteazın en yüksek aktiviteyi pH 10,2 de gösterirken pH 5-12 arasında da aktivitesinin %76 oranında koruduğu görülmüştür. Enzim 20°C 'den 60°C 'ye kadar olan geniş bir sıcaklık aralığında aktivite göstermiştir. Ancak en yüksek aktiviteyi 45°C ile 60°C arasında göstermiştir [64].

Alam ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmada Antartika' nın Schirmacher bölgesinden topladıkları göl sedimentlerinden izole ettikleri *Clostridium* sp'den ekstrasellüler proteaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ve Sephadex G-100 jel filtrasyonla 12,7 kat % 26,2 verimle saflaştırmışlardır. Enzimin optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 7 ve 37°C olarak kayıtlara geçmiştir. Enzimin pH 5 ile 10 arasında da aktivitesinin % 70'ini koruyabildiğini belirtmişlerdir. Metal testinde Hg^{2+} , Co^{2+} ve Zn^{2+} iyonları varlığında enzimin aktivitesinin kaybolduğunu, Ca^{2+} varlığında ise arttığını gözlemlemişlerdir. Serin proteaz inhibitörü olan PMSF'nin 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarında enzimin aktivitesinde düşüş olduğunu, ancak metaloproteaz inhibitörü olan EDTA'nın 1 mM'lık konsantrasyonunda enzimi daha fazla inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Enzimin termostabilitesi, geniş pH aralığında aktivitesi, SDS'e karşı olan direncinden dolayı enzimin deri ve gıda endüstrisinde kullanımının yanı sıra deterjan formülasyonlarında da kullanılabileceğini düşünmüşlerdir [65]. Ghorbel ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmada balıkçılık endüstrisinin atık

suyunun çamurundan izole ettikleri *Bacillus cereus* BG1 suşundan proteaz saflaştırmışlardır. Kültür ortamına yapılan CaCl_2 ilavesi ile proteaz üretimini artırmışlardır. Saflaştırma işlemini sırasıyla ultrafiltrasyon, Sephacryl S-200 jel filtrasyon, DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ve son olarak ikinci defa jel filtrasyon kromatografisi kullanarak yapmışlar ve enzimi $1,682 \times 10^3$ U/mg spesifik aktivite ile 39 kat %23 verimle saflaştırmışlardır. Enzimin molekül kütlelerini SDS-PAGE ile 34 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin optimum pH'ını 8 olarak tespit etmişlerdir. Enzimin farklı CaCl_2 konsantrasyonlarında 60°C 'de 1 saat inkübesi sonucunda Ca^{2+} miktarları arttıkça enzimin aktivitesinin de arttığını gözlemlemişlerdir. Zn^{2+} , Cu^{2+} ve Mn^{2+} iyonları enzimi tamamen inhibe ettiğini, Ba^{2+} % 58 oranında, Mg^{2+} ise % 28 oranında aktiviteyi koruduğunu bildirmişlerdir [66].

Genckal ve Tari tarafından 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada aşırı alkalik koşullar altında izole ettikleri *Bacillus* suşlarının yüksek proteolitik aktivitelerinin olduğu tespit edilmiştir. 85 izolat arasından yüksek alkalik proteaz aktivitesi gösteren üç suş seçilmiştir (I18, L18 ve L21). Optimum sıcaklıklar I18 için 30°C , L18 ve L21 içinse 37°C dir. Benzer şekilde optimum çalkalama hızları I18 için 100 rpm, L18 ve L21 için 180 rpm dir. Üç suş için optimum inokülasyon oranı ve inkübasyon süresi sırasıyla %5 ve 96 saattir. *Bacillus* sp. L21 en yüksek spesifik proteaz aktivitesi gösterdiği (60 U/mg protein) ve daha geniş pH aralığında aktif olduğu için ileriki çalışmalar için seçilmiştir. Bu suştan saflaştırılan proteazın optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 11 ve 60°C 'dir. Enzim PMSF inhibitörüyle tamamen inhibe olmuş ancak EDTA ile aktivitesinin %93 ünü korumuştur. İnhibisyon profili *Bacillus* sp. L21'den saflaştırılan proteazın serin proteaz ailesine ait olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca EDTA'nın varlığında enzimin aktivitesinin korunması onun deterjan katkı maddesi olarak kullanılmasına bir avantaj olduğunu göstermiştir [67].

Huang ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada Çin'in Tulufan kraterlerinden topladıkları toprak numunelerinden izole ettikleri termofilik *Bacillus* sp. HS08'i proteaz üretimi için farklı konsantrasyonlarda maya ekstraktı, pepton, glukoz, Na_2HPO_4 , Na_2CO_3 , ZnSO_4 , MgSO_4 ve CaCl_2 ile hazırlanan besiyerinde pH 7,2 de çoğaltmışlardır. Saflaştırmayı sırasıyla %80 amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-

Sepharose anyon değiştirme kromatografisi ve Sephacryl S-100HR AKTA 100 protein likit kromatografisiyle yapmışlardır. Saflaştırma işlemini 4,25 kat %5,1 verimle gerçekleştirmişlerdir. Proteazın moleköl kütlesini SDS-PAGE ile 30,9 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzim 40 °C'den 65 °C'ye kadar artan aktiviteye sahiptir. 65 °C'de 1 saat inkübasyon sonucunda enzim aktivitesinin % 75'ini koruyabilmiştir. Bu yüzden proteaz termofilik olarak sınıflandırılmıştır. Enzimin optimum pH'sı 7,5 olarak tayin edilmiştir. Substrat spesifitesi testinde ise enzim azokazein, kazein ve BSA arasından en iyi aktiviteyi azokazeine göstermiştir. Enzimin 2 mM'lık PMSF inhibitörüyle tamamen inhibe olmasının yanında Ca^{2+} , Cu^{2+} , NBS, WRK, TNBS ve 2-merkapt etanol ile de aktivitesi artmıştır. Bu yüzden enzimin Zn^{2+} ile aktive olmuş serin proteaz olduğuna karar verilmiştir [68].

Riffel ve arkadaşları tarafından 2007 yılında *Chryseobacterium* sp suşunun oldukça keratinolitik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. *Chryseobacterium* sp'den proteaz enzimi Fenil Sepharose ve Superose 12HR kromatografisiyle saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ile de moleköl kütlesi 64 kDa olarak kayıtlara geçmiştir. 30-60 °C'de ve pH 7,5-9,5 arasında aktivite gösteren enzimin optimum sıcaklık ve pH ları sırasıyla 50 °C ve 8,5'tur. Enzimin EDTA ve EGTA inhibitörleriyle aktivitesi dūřerken 1,10 fenantrolin ile aktivitesi hiç kalmamıştır. Enzimin Ca^{2+} iyonu varlığında ise aktivitesi üç kat artmıştır. Zn^{2+} , Al^{3+} ve Cu^{2+} iyonları varlığında ise aktivitelerinin azaldığı gözlenmiştir. Organik çözücülerden olan DMSO'nun varlığında enzimin aktivitesinde artış gözlenirken DTT ve SDS ile aktiviteleri kaybolmuştur. Triptik parçalanmadan üretilen peptidlerin ESI-MS/MS analizleri enzimin M14 metaloproteaz familyasının üyesi olduğunu göstermiştir. Çalışmada saflaştırılan keratinolitik metaloproteazın kısıtlı enzim-substrat etkileşimlerinden dolayı özölemeyen keratin parçacıklarının yüzeiy üzerinde olan proteolizin üstesinden gelebileceği vurgulanmıştır [69].

Kım ve arkadaşları 2008 yılında *Perenniporia fraxine*'dan proteaz enzimini saflaştırmışlar ve karakterizasyon çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Saflaştırma işlemlerini DEAE-Sepharose CL6B, Sephadex G75 ve HiLoad 16/60 Superdex 75 kromatografilerini kullanarak yapmışlardır. SDS-PAGE ile enzimin moleköl

kütlesini 42 kDa dur. Enzimin N-terminal aminoasit dizisi ASYRVLPITKELLPPEFFVA olarak kayıtlara geçmiştir. Enzimin optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 6,0 ve 35-40 °C'dir. Fibrinoliz model enzimin a ve b zincirinin hidrolizini hızlı fakat g-g zincirlerinin hidrolizini yavaş yaptığını göstermiştir. Metal testiyle enzim Cu^{2+} , Fe^{3+} ve Zn^{2+} iyonlarıyla inhibe olmuş, fakat Mn^{2+} , Mg^{2+} ve Ca^{2+} iyonlarıyla aktivite artmıştır. Enzim EDTA inhibitörü tarafından inhibe edilmiş ve kimotripsin için kromojenik substrat olan S-2586'ya karşı daha yüksek aktivite göstermiştir. Bu sonuçlar da enzimin kimotripsin benzeri metaloproteaz olduğunu göstermiştir. Saflaştırılan proteazın fibrinlere karşı yüksek derecede spesifite gösterdiği ve trombolitik tedavide direkt harekete geçen trombolitik ajan olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır [70].

Hmidet ve arkadaşları tarafından 2009 yılında *Bacillus licheniformis* NH1 suşundan proteaz enzimi saflaştırılmıştır. Proteaz üretimini 7,5 g/l tavuk tüyü, 1 g/l maya ekstraktı, 1,4 g/l K_2HPO_4 , 0,7 g/l KH_2PO_4 , 0,1 g/l MgSO_4 ve 0,5 g/l NaCl içeren besiyerinde pH 7 de gerçekleştirilmiştir. Proteolitik aktivite için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 10 ve 70 °C'dir. Enzimin PMSF inhibitörüyle inhibe olması onun serin proteaz olduğunu göstermiştir. Enzim test edilen bütün iyonlar varlığında aktivitesini korumuş fakat Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Cu^{2+} iyonları varlığında aktivitesi artmıştır. Enzim SDS, Tween 20 ve Triton X-100 gibi sürfaktanların varlığında 40 °C'de 1 saat inkübasyonu sonunda aktivitesini korumuştur. Enzimin %0,5 lik H_2O_2 ve %0,2 sodyum perborat gibi okside edici ajanların muamelesi sonucunda ise aktivitesi az etkilenebilir. Saflaştırılan enzim farklı katı ve sıvı deterjanlarla çok iyi stabilite ve uyum göstermiştir. Ayrıca yapılan testler sonucunda enzimin kan, çikolata ve sos gibi farklı lekeleri de çıkarabildiği görülmüştür. Bu sonuçlardan dolayı da *Bacillus licheniformis* NH1 suşundan saflaştırılan enzimin ileride deterjan endüstrisinde kullanılabileceği düşünülmüştür [71].

Doddapaneni ve arkadaşları tarafından 2009 yılında mezbahaların atıklarından izole ettikleri bakterinin biyokimyasal özelliklerine ve 16SrRNA gen dizilerine göre bakteri *Bacillus cereus* olarak tanımlanmıştır. Proteaz amonyum sülfatla çöktürme ve iyon değişim kromatografisiyle 1,8 kat %49 verimle saflaştırılmıştır. Enzimin SDS-

PAGE ile moleköl kütlesi 28 kDa'dur. Enzimin optimum pH' ı 10 optimum sıcaklığı ise 60 °C'dir. Enzim pH 8 ve 11 arasında aktivitesinin %80'ini korumuştur. İnhibitör etkisi incelendiğinde PMSF enzim aktivitesinin %60 ını inhibe etmiştir. Fakat EDTA aktivitenin %90'ının inhibisyonuna neden olmuştur. Bu yüzden enzimin metaloproteaz olduğuna karar verilmiştir. Cu²⁺ iyonları varlığında enzimin aktivitesinde dört kat artış olmuştur. Enzim deterjanlar ve anyonik yüzey aktif maddeleri varlığında çok iyi bir aktivite ve kararlılık göstermiştir. Aynı zamanda organik solventlerin varlığında da stabilitesini korumuştur. Bu yüzden de çamaşır deterjanlarında iyi bir yıkama ajanı olarak kullanılabileceği düşünülmüştür [72].

Haddar ve arkadaşları 2010 yılında *Bacillus mojavensis* A21'den saflaştırdıkları proteazın karakterizasyon çalışmalarını yapmışlardır. Enzimin optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 8-11 ve 60 °C'dir. Saf proteaz non-iyonik (5% Tween 80 and 5% Triton X-10) ve anyonik (1% SDS) yüzey aktif maddelerine karşı aşırı stabilite göstermiştir. Ayrıca 30 °C'den 50 °C'ye kadar farklı deterjanlara karşı uyum ve stabilite göstermiştir. Katı deterjanlardan olan Axion ve Ariel, sıvı deterjanlardan olan Dixan ve Nadhif varlığında enzim 40 °C'de 1 saat inkübasyonu sonunda aktivitesinin %100'ünü korumuştur. Yıkama performans analizi proteazın kan lekelerini etkili bir şekilde çıkardığını göstermiştir. Saflaştırılan enzimin bu özellikleri düşünüldüğünde biyoteknolojik süreçlerde özellikle deterjan endüstrisinde kullanılabileceği bildirilmiştir [73].

Sundararajan ve arkadaşları tarafından 2011 yılında proteince zengin toprak numunesinden izole edilen bakteri 16S rRNA gen dizisiyle *Bacillus cereus* VITSN04 olarak tanımlanmıştır. Bakteriyi uygun ortamda çoğalttıktan sonra Sephadex G-50 ve Saphadex G-200 kolonlarını kullanarak jel filtrasyon kromatografisiyle saflaştırmışlardır. Enzimin moleköl kütlesi native-PAGE ile 32 kDa olarak tespit edilmiştir. Saf enzim 30 °C'de ve pH 8'de maksimum aktiviteye sahip olduğu tayin edilmiştir. Enzim PMSF inhibitörü tarafından inhibe olduğundan serin proteaz olarak sınıflandırılmıştır. Deri işleme sürecinde enzim muamelesi ile yıkama atık kolundaki kirlilik yükünün % 25'inin azaldığı tespit edilmiştir. Bu yüzden de çevresel kirliliğe yararıyla deri işleme sürecinde kullanılabileceği bildirilmiştir [74].

Uyar ve arkadaşları tarafından 2011 yılında topraktan izole edilen *Bacillus* sp. CA15 suşundan proteaz enzimi saflaştırılmıştır. Mikroorganizmanın 16S ribozomal DNA dizisi incelendiğinde *Bacillus cereus* ile yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Maksimum proteaz üretimi %1 yağsız süt, %1 nişasta ve %0,6 MgSO₄.7H₂O içeren besiyerinde pH 8 de 35 °C’de gerçekleştirilmiştir. En iyi proteaz üretimi sabit faz sırasında hücre yoğunluğunun 1,8×10⁸ hücre/ml’ye ulaştığı zaman da gözlenmiştir. Proteaz seviyesi inorganik azot kaynakları varlığında düşük bulunmuştur. Proteaz üretimi sükroz ve laktoz varlığında azalmıştır. Proteazın Triton X-100, Tween 20 ve SDS’e karşı aşırı stabilitesi gözlenmiştir. Enzim PMSF inhibitörü tarafından inhibe edildiğinden enzimin aktif bölgesinde serin kalıntılarının olduğu bildirilmiştir [75].

Zambare ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada solucan gübresinden izole ettikleri *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327’den proteaz enzimini saflaştırmışlar ve karakterizasyon çalışmalarını yapmışlardır. Saf enzimin native-PAGE’deki zimogramında 56 ve 67 kDa’luk iki bant gözlemlenmişler ve her iki bandın da kıllardan arındırma aktivitesine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin optimum pH ve sıcaklığını sırasıyla 8 ve 35 °C olarak bulmuşlardır. İnhibitörlerin proteaz aktivitesinde önemli bir düşüşe neden olmadığını belirtmişlerdir. Enzimin kinetik çalışmaları sonucunda *P. aeruginosa* MCMB-327’den saflaştırılan proteazın kıllarının arındırılmasında etkili olduğunu tayin etmişler ve çevreye duyarlı çalışmalara sahip olabileceğini vurgulamışlardır [76].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Deneysel çalışmalar sırasında kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma Chemical Ltd. (ABD), MERCK (Darmstadt, Almanya), Bacto (Avustralya), Difco (ABD)'dan temin edilmiştir.

3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

- Etüv (Electromag)
- Soğutmalı santrifüj (Sigma 8K10)
- Otoklav (Alp)
- pH metre (Hanna pH300)
- Çalkalamalı su banyosu (Nüve)
- Buzdolabı (Vestel)
- Hassas terazi (Denver Instrument)
- Manyetik karıştırıcı (Chiltern HS31)
- Spektrofotometre (Optizen)
- Vorteks (Fisons)
- Kromatografi kolonu (Pharmacia Biopilot FPLC)
- Otomatik pipetler (Ependorf)

3.3. Kullanılan Mikroorganizma

Çalışmada kullanılan *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948 Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Biyolojik Ürünler Araştırma-Geliştirme Laboratuvarları'ndan temin edildi.

3.4. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'in Çoğaltılması

Bakterinin çoğaltılması ağırlık/hacim olarak %0,075 L-sistein, %0,25 NaCl, %1,5 Bacto casiton, %0,3 sığır eti ekstraktı, %0,05 sodyum tiyoglikolat, %0,5 maya ekstraktı, %0,5 glukoz ve çok az miktarda resazurin eklenerek hazırlanan besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Besiyerinin pH sı NaOH ile 8'e ayarlanmıştır. Besiyeri 121 °C' de 15 dakika steril edildikten sonra glukoz çözeltisi 0,2 mikron çapındaki steril filtreden geçirildikten sonra eklendi. Bakterinin besiyerine ekimi yapılarak 37 °C'de 24 saat çoğaltılması sağlandı.

3.5. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den Proteaz Enziminin Üretimi

Proteaz enzimi üretimi ağırlık/hacim olarak %1 tripton, %1 pepton, %0,5 maya ekstraktı, %0,1 çözünebilir nişasta, %0,3 CH₃COONa, % 0,05 L-sistein, %0,03 sodyum tiyoglikolat, %0,5 NaCl ve %1 glukoz içeren besiyerinde gerçekleştirilmiştir. pH NaOH ile 8,3 ayarlanmıştır. Ortamdaki bileşenler 121 °C'de 1,5 atmosfer basınçta 15 dakika steril edildikten sonra glukoz çözeltisi 0,2 mikron çapındaki steril filtreden geçirilerek besiyerine eklenmiştir. Proteaz üretimi için 500 ml'lik besiyerlerine 10 ml aşı kültürü ilave edilmiş ve anaeorobik koşullarda 37 °C'de 20 saat inkübe edilmiştir.

3.6. Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

Fermentasyon sonrasında *C. botulinum* Tip A ATCC 7948 hücre izolatları 7000 rpm' de +4 °C'de 15 dakika süre ile santrifüj edilerek uzaklaştırılmıştır. Üst fazda kalan sıvıya +4 °C'de manyetik karıştırıcı üzerinde %85 amonyum sülfat ilavesi yapılarak çözünmesi sağlandı. Çözündükten sonra +4 °C'de gece boyu bekletildi. Bekletilen sıvı 4000 rpm'de 20 dakika süre ile santrifüj edildi ve çökelek 0,05 M pH 8 Tris-HCl tamponuyla alındı. Tampon çözeltisinin 10 ml'yi aşmamasına dikkat edildi. Alınan çözelti diyaliz torbasına konup +4 °C'de gece boyu aynı tampona karşı diyalizlendi. Diyalizden elde edilen örneğin protein ve enzim aktivitelerine bakıldı.

3.6.1. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteazın DEAE- selüloz anyon değıştirici kolona yüklenmesi

DEAE selüloz anyon değıştirici kolonu hacminin yaklaşık 5 katı kadar pH 8 Tris HCl tamponuyla dengelendi. Dengelenen kolona diyaliz sonrası elde edilen örnek yüklendi. Örnek 4ml/min akış hızıyla kolondan ayrılarak 90 saniye aralıklarla 3 ml'lik fraksiyonlar halinde toplandı. Daha sonra 1 M NaCl ile lineer gradient uygulandı. 3'er ml halinde toplanan fraksiyonların her birinin 260 nm ve 280 nm'de değeri ölçülerek protein miktarı hesaplandı. Ayrıca bölüm 3.6.2'de anlatıldığı gibi enzim aktivitelerine bakıldı. Aktivitesi yüksek fraksiyonlar toplanarak karakterizasyon çalışmaları için kullanıldı.

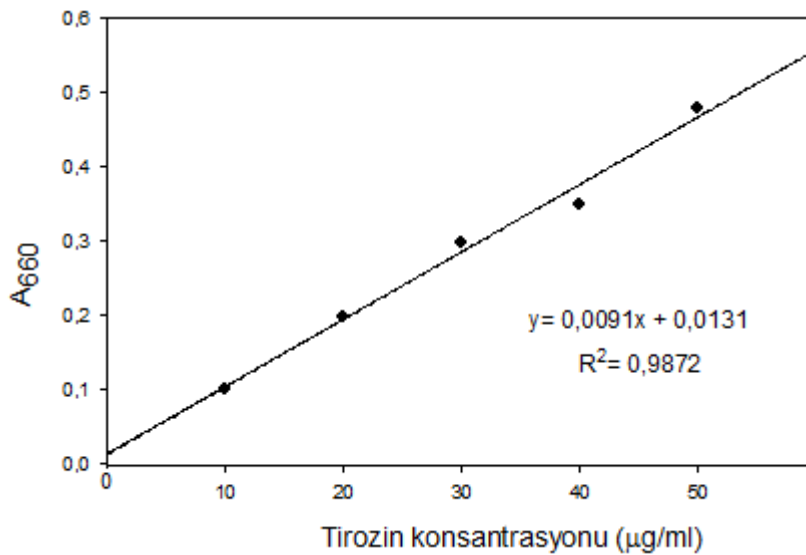
3.6.2. Proteaz aktivite tayini

Proteaz aktivitesinin belirlenmesinde, Takami ve ark (1989) belirttiğı yöntem kullanılmış olup, farklı olarak hammersten kazein yerine kazein substrat olarak kullanılmıştır. 0,5 ml enzim çözeltisinin üzerine 2,5 ml %0,6'lık pH 8 Tris-HCl tamponunda hazırlanmış kazein çözeltisi eklendi. Su banyosunda 38 °C'de yarım saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kazeini çöktürmek için ortama 2,5 ml TCA çözeltisi (%10 TCA, %18 sodyum asetat, %18 asetik asit) eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda 4000 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi ve üst kısımdan 0,5 ml alındı. 0,5 ml'lik üst fazın üzerine 2,5 ml 0,5 M Na₂CO₃ çözeltisi ve 0,5 ml %50'lik Folin-Ciocalteu reaktifi eklendi. Oda sıcaklığında yarım saat bekletildikten sonra 660 nm'de absorbansı köre karşı okundu [77]. Folin-Ciocalteu reaktifi ile tirozin arasında meydana gelen redoks tepkimesinin sonucunda oluşan mavi rengin şiddetine bağlı olarak okunan absorbanslardan ve tirozin standart standart grafiğinin eğiminden yararlanılarak enzim aktivitesi aşağıda verilen formülle hesaplanmıştır.

$$\text{Enzim aktivitesi: } \frac{(A_{660}/\text{Eğim}) \times \text{Toplam hacim(ml)}}{\text{Enzim hacmi(ml)} \times \text{İnkübasyon süresi (dak)}} \times \text{Seyreltme faktörü (U/ml)}$$

3.6.3. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması

Proteaz enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılacak olan tirozin standart grafiğinin oluşturulması için 50 mM pH 8 Tris-HCl tamponu ile 1 µg/ml tirozin çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti altı tüpe 0, 10, 20, 30, 40 ve 50 µl hacimlerinde konulmuştur ve tampon ile 1 ml'ye tamamlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda tirozin içeren her bir tüpten 0,5 ml alınıp üzerine 2,5 ml Na₂CO₃ ve %50'lik Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında yarım saat bekletildikten sonra köre karşı 660 nm'de absorbansı okunmuştur. Okunan absorbans değerlerinden yararlanılarak tirozin standart grafiği hazırlanmıştır [77].



Şekil 3.1. Tirozin standart grafiği

3.6.4. Protein miktarının belirlenmesi

Çalışmada ki protein miktarı tespiti Bradford metoduna göre yapılmıştır [78]. Protein miktarı bilinmeyen enzim örneğinden 150 µl alınıp saf suyla 2400 µl ye tamamlandı. Çözeltinin üzerine 600 µl Coomassie-blue reaktifi eklenip 3 dakika oda sıcaklığında

bekletildi. Süre sonunda 595 nm’de absorbansı okundu. Elde edilen absorbans değerinden önceden çizilmiş protein standart grafiğinin eğimi kullanılarak formülden örnekteki protein miktarı tespit edildi [79].

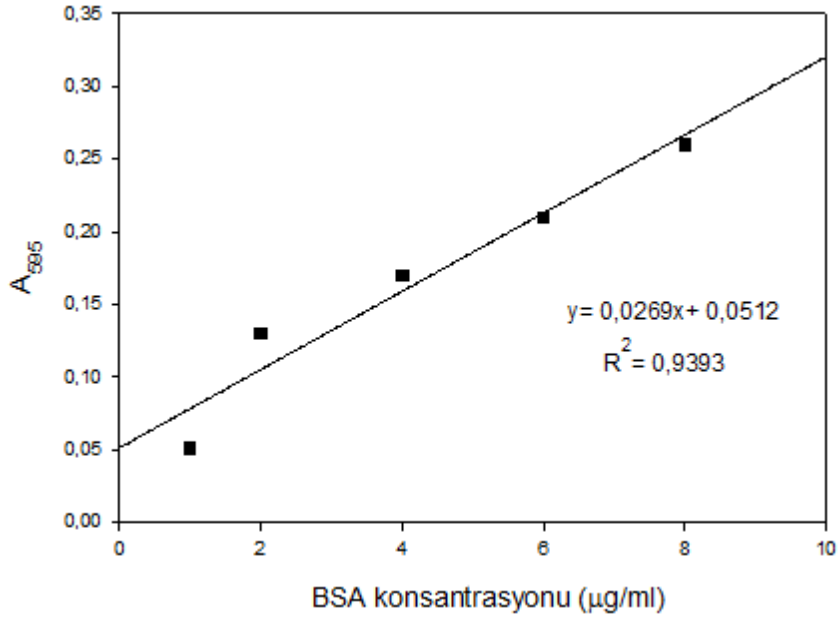
$$\text{Protein miktarı: } \frac{(A_{595}/\text{Eğim}) \times \text{seyreltme faktörü}}{1000} \text{ (mg/ml)}$$

Kromatografik işlemler sonunda kolondan alınan fraksiyonların protein miktarı Warburg-Christian yöntemine göre hesaplandı. Yöntemin esası tirozindeki fenolik gruplar ve triptofandaki indolik gruplar nedeniyle birçok proteinin 280 nm’de maksimum absorpsiyon gösterme özelliğinden yararlanılarak örnekteki protein miktarının yaklaşık olarak bulunmasıdır. Örneğin 260 ve 280 nm’de absorbansları ölçülür. Hata düzeltme faktörü formülde yerine koyularak protein miktarı hesaplanır [80].

$$\text{Protein miktarı: } 1,5 \times A_{280} - 0,75 \times A_{260} \text{ (mg/ml)}$$

3.6.5. Protein standart grafiğinin hazırlanması

Protein standart grafiğinin hazırlanması için 0,2 mg/ml sığır serum albümin (BSA) çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiden 0, 15, 30, 60, 120 µl alınarak saf suyla 2400 µl’ye tamamlanmıştır. Karışımın üzerine 600 µl Coomassie-blue reaktifi ilave edilerek 3 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda 595 nm’de absorbansları okundu. Okunan absorbans değerlerinden yararlanılarak protein standart grafiği çizildi [79].



Şekil 3.2. Protein standart grafiği

3.7. *C. botulinum* Tip A ATCC 7948'den Kısmi Olarak Saflaştırılan Proteaz Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları

3.7.1. Proteaz enziminin optimum sıcaklığının ve kararlılığının belirlenmesi

C. botulinum Tip A ATCC 7948'den saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 500 µl seyreltik enzim çözeltisinin üzerine 2500 µl pH 8 Tris-HCl tamponunda hazırlanmış %0,6'lık kazein çözeltisi eklendi. 20 °C'den 70 °C'ye kadar olan sıcaklık aralığında su banyosunda yarım saat bekletildi. Her bir sıcaklık değeri için bölüm 3.6.2'de anlatıldığı gibi aktivite testi yapıldı [78]. Enzim sıcaklık profili grafiğinin çiziminde en yüksek aktivitenin gözlemlendiği sıcaklık değeri 100 olarak kabul edildi.

Proteazın sıcaklık kararlılığının belirlenmesi için 50 µl enzim çözeltisi, 950 µl pH 8 Tris HCl tamponuyla seyreltilti. 40 °C'de 3 saat inkübasyona bırakıldı ve yarım saatte bir aktivitesine bakıldı. 50 °C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı ve 20 dakikada bir aktivite testi yapıldı. 60 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı ve 10 dakikada bir aktivitesine bakıldı. Son olarak da 70 °C'de yarım saat inkübasyona bırakıldı ve 5

dakikada bir aktivite tayini yapıldı [78]. Sonuçların grafik çiziminde inkübasyondan önceki aktivite miktarı 100 kabul edilip inkübasyon sonrası elde edilen değerler ise kalan aktivite yüzdesi olarak ifade edilmiştir [81].

3.7.2. Proteaz enziminin optimum pH ve kararlılığının belirlenmesi

Proteaz enziminin pH profilinin belirlenmesi için 500 µl seyreltik enzim çözeltisi ve Çizelge 3.1’de gösterilen tamponların 2500 µl’si ile hazırlanan % 0,6’lık kazein çözeltisi karıştırıldı. Yarım saat 38 °C’de inkübe edildi. Inkübasyon sonrası bölüm 3.6.2’de verilen yöntemle göre aktivitelerine bakıldı [78]. Enzimin pH profili çiziminde en yüksek aktivitenin gözlemlendiği pH değeri 100 olarak kabul edildi.

Çizelge 3.1. Enzimin optimum pH ve kararlılığının belirlenmesinde kullanılan tamponlar

pH	Tampon
4-5	Glisin-HCl
6	KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄
7-8	Tris- HCl
9-10-11-12	Glisin-NaOH

Proteaz enziminin pH kararlılığının belirlenmesi için 100 µl enzim ile Çizelge 3.1’de verilen tamponların 400 µl’ si karıştırıldı. 38 °C’de 1 saat inkübe edildi. Inkübasyon öncesi ve sonrası bölüm 3.6.2’de verilen yöntemle göre aktivitelerine bakıldı [78]. Enzimin pH stabilitesi grafiğinin çiziminde farklı pH değerlerinde inkübasyondan önceki aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi ve inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi olarak ifade edildi.

3.7.3. Proteaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi

K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Sn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , ve Al^{3+} iyonlarının *C. botulinum* Tip A ATCC 7948'den saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesine etkisini incelemek için 0,05 M pH 8 Tris-HCl tamponuyla son konsantrasyonları 2 ve 5 mM olacak şekilde çözeltileri hazırlandı. 50 µl enzim çözeltilisinin üzerine 450 µl hazırlanan çözeltilerden eklendi. Oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. İçinde metal iyonu bulunmayan bir örnek ise aynı şartlarda inkübe edildi. Süre sonunda bölüm 3.6.2'de verilen yöntemle aktivitelerine bakıldı [78]. İnkübasyondan sonra kontrol numunesinin aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve metal iyonu içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplandı [81].

3.7.4. Proteaz enziminin doğal substratlara olan özgünlüğünün belirlenmesi

Saflaştırılan proteazın doğal substratlara olan özgünlüğünü belirlemek için kazein, soya fasulyesi unu, sığır serum albümin (BSA) ve jelatin kullanıldı. Bu substratların 0,05 M pH 8 Tris-HCl tamponunda %0,6'lık çözeltileri hazırlandı. 500 µl enzim çözeltilisinin üzerine 2500 µl hazırlanan çözeltiler eklendi ve bölüm 3.6.2'de anlatıldığı gibi aktivitelerine bakıldı [78]. Kazeinin aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğer substratlarla ölçülen aktiviteler kalan aktivite olarak ifade edildi [82].

3.7.5. Proteaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisinin belirlenmesi

Proteaz enziminin organik çözücüler varlığında aktivitesindeki değişimleri incelemek için aseton, butanol, hekzan, etanol, metanol, propanol ve DMSO çözücülerinin 1 ml'si ile 0,05 M pH 8 Tris-HCl tamponunun 3 ml'si karıştırıldı. 50 µl enzim çözeltilisinin üzerine 450 µl organik çözücülerin olduğu tampon çözelti eklendi. 38 °C'de yarım saat inkübasyona bırakıldı. Kör olarak da 50 µl enzim çözeltilisi üzerine 450 µl 0,05 M Tris- HCl eklendi. Süre sonunda bölüm 3.6.2'de anlatılan yöntemle göre aktivitelerine bakıldı [78]. Kör olarak hazırlanan örneğin aktivitesi 100 olarak kabul edildi. İnkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite olarak ifade edildi [81].

3.7.6. Bazı deterjan yüzey aktif maddelerin ve yükseltgenlerin proteaz enziminin aktivitesine etkisinin belirlenmesi

Saflaştırılan proteaz enzimine yüzey aktif maddelerin etkisini incelemek için %1'lik SDS (w/v), %1'lik Tween 80 (v/v), %1'lik Tripton X-100 (v/v) kullanıldı. Yükseltgenlerin etkisini incelemek için ise %2'lik ve %5'lik H₂O₂ (v/v) kullanıldı. Verilen yüzdelere 0,05 M pH 8 Tris HCl çözeltisiyle hazırlandı. 50 µl enzim çözeltisi üzerine 450 µl hazırlanan çözeltilerden konuldu ve oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Kör olarak 50 µl enzim çözeltisi üzerine 450 µl 0,05 M pH 8 Tris-HCl tamponu konuldu ve aynı koşullarda inkübasyona bırakıldı. Inkübasyondan sonra bölüm 3.6.2'de verilen yöntemle göre aktivite tayini yapıldı [78]. Kör olarak hazırlanan örneğin aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite olarak kabul edildi.

3.7.7. Amino asit inhibitörlerinin enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Aminoasit inhibitörlerinin proteaz enziminin aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla PMSF (2 mM ve 5 mM), EDTA (2 mM ve 5 mM), DTT (2mM ve 5 mM) ve %0,1'lik 2-merkaptoetanol (v/v) inhibitörleri kullanıldı. EDTA, DTT ve 2-merkaptoetanolün çözeltileri 0,05 M pH 8 Tris-HCl tamponunda hazırlanırken, PMSF'nin çözeltisi %96'lık etanolde hazırlandı. 50 µl enzim çözeltisinin üzerine hazırlanan çözeltilerden 450 µl eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Kör olarak da 50 µl enzim çözeltisine 450 µl 0,05 M pH 8 Tris-HCl tamponu eklendi ve aynı koşullarda inkübe edildi. Inkübasyondan sonra bölüm 3.6.2'de anlatıldığı gibi aktivitelere bakıldı [78]. Kör olarak hazırlanan örneğin aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğer örneklerin aktiviteleri kalan aktivite olarak değerlendirildi.

3.7.8. Proteaz enziminin Michaelis Menten kinetik parametrelerinin belirlenmesi

C. botulinum Tip A ATCC 7948'den saflaştırılan proteaz enziminin kazein varlığında kinetik sabitlerinin (K_m ve V_m) belirlenmesi için enzim çözeltisi, 0,2-2 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlanmış kazein içeren 2,5 ml substrat çözeltisi ile karıştırıldı ve 38 °C' de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda bölüm 3.6.2'de anlatıldığı gibi aktivitelere bakıldı [78]. Sonuçlara bağlı olarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve kinetik sabitleri (K_m ve V_m) hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. Proteaz Enziminin Üretimi

Clostridium botulinum Tip A ATCC 7948'den maksimum proteaz eldesi Çizelge 4.1'de verilen besiyerinde gerçekleştiği gözlenmiştir.

Çizelge 4.1. Proteaz enzimi üretimi için kullanılan besiyeri

Bileşen	Miktar (%)
Tripton	1
Pepton	1
Maya ekstraktı	0,5
Çözünebilir nişasta	0,1
CH ₃ COONa	0,3
L-sistein	0,05
Sodyum tiyoglikolat	0,03
NaCl	0,5
Glukoz	1

C. botulinum Çizelge 4.1'de verilen besiyerinde 37 °C sıcaklıkta 16, 20, 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. En iyi sonuç 20 saatlik çoğalmada görülmüştür.

Çizelge 4.2. İnkübasyon sürelerine bağlı olarak ham ekstraktın aktiviteleri

Saat	Ham ekstraktın aktivitesi (U/ml)
16	204,74
20	238,96
24	224,21

4.2. Proteaz Enziminin Saflaştırılması

Büyütülen *C. botulinum* Tip A ATCC 7948'in ürettiği proteaz enziminin saflaştırılmasında ilk basamak olarak amonyum sülfatla çöktürme işlemi yapıldı. Örnek %85'lik amonyum sülfatla tuzlandıktan sonra bir gece +4 °C'de bekletilip santrifüjlendi. Çökelekler sırasıyla pH'sı 7, 8, 9 ve 10 olan tamponlarda çözülde ve aynı tamponlara karşı diyalizlendi. Diyaliz sonucunda alınan örneklerin bölüm 3.6.2'de verilen yöntemle göre aktivitelerine bakıldı ve en iyi sonucun pH 8'de çözölen ve diyalizlenen örnekte olduğu göröldü.

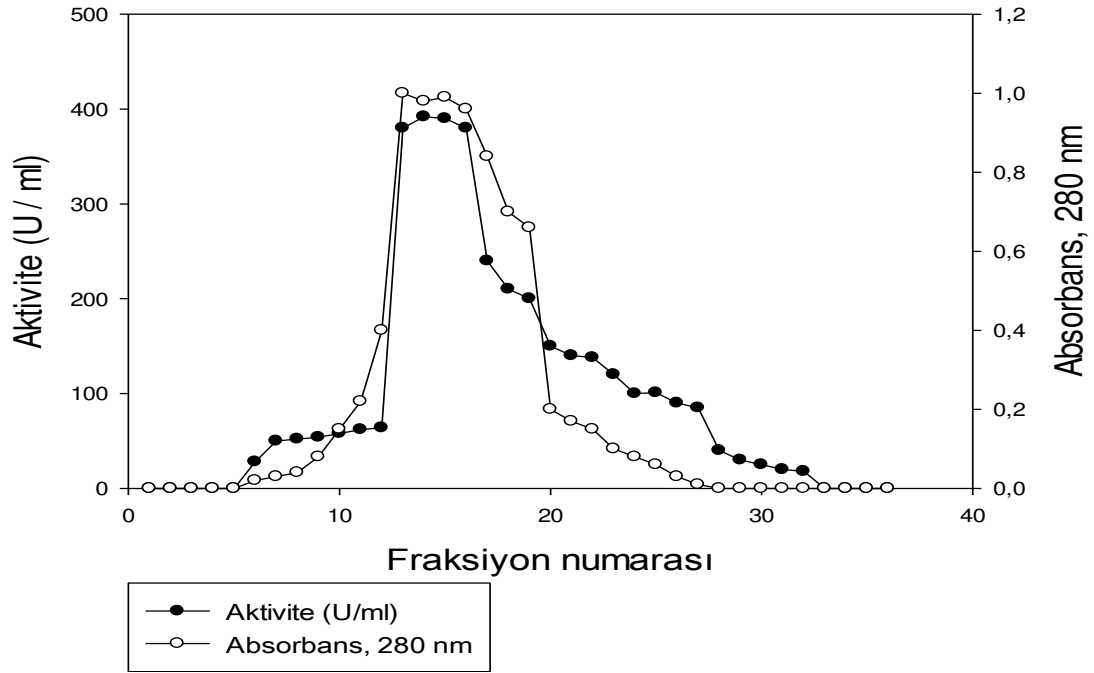
Çizelge 4.3. Kullanılan tamponun pH'sına göre enzim aktiviteleri

pH	Aktivite (U/ml)
7	299
8	354
9	255
10	198

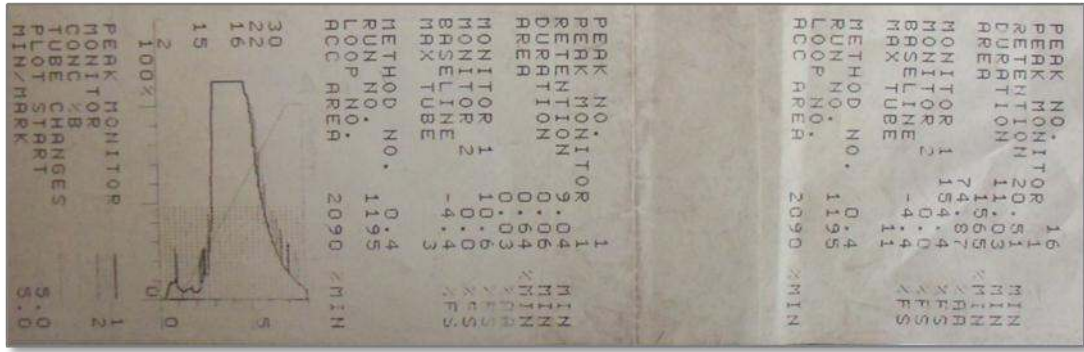
pH 8 Tris-HCl tamponunda diyalizlenen örnek DEAE selöloz anyon değıştirici kolona verildi. Örnek kolondan 4 ml/min akış hızıyla ayrılarak 90 saniye aralıklarla 3 ml'lik fraksiyonlar halinde toplandı. Her bir fraksiyonun bölüm 3.6.2'de ve 3.6.4'te anlatılan yöntemlere göre aktivite ve protein miktarı tayini yapıldı [78]. Saflaştırma adımlarına ait sonuçlar Şekil, DEAE iyon değışimi kromatografisine ait aktivite grafiği ile kromatogram Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Proteazın saflaştırılma basamakları sonuçları

Saflaştırma adımı	Toplam hacim (ml)	Toplam aktivite (U)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Ham ekstrakt	262	62608,9	352,44	177,86	100	1
%85 (NH₄)₂SO₄ çöktürmesi ve diyaliz	17	6018	24,17	248,19	9,6	1,4
DEAE selüloz anyon değiştirici kolon	10	3835	5,9	650	6,12	3,67



Şekil 4.1. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den DEAE selüloz iyon değişim kromatografisiyle kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin aktivite-absorbans grafiği



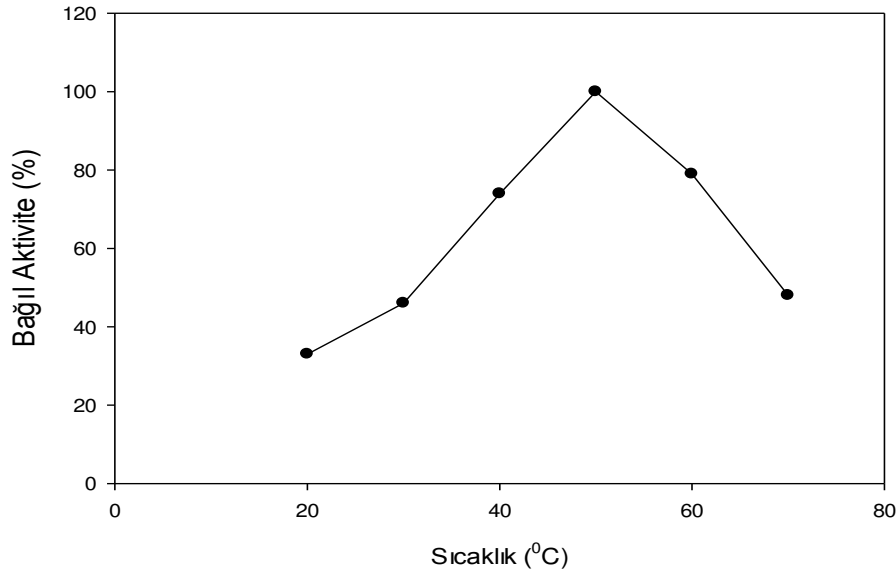
Şekil 4.2. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin DEAE selüloz anyon değiştirme kromatogramı

DEAE selüloz iyon değiştirme kromatografisi sonucunda toplanan fraksiyonlardan 13., 14. ve 15. de aktivite gözlemlendi. Saflaştırma sonucunda enzim 3,67 kat %6,12 verimle elde edildi. Saflaştırılan enzimin toplam aktivitesi 3835 U, spesifik aktivitesi ise 650 U/mg olarak tespit edildi.

4.3. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den Kısmi Olarak Saflaştırılan Proteaz Enziminin Karakterizasyonu

4.3.1. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları

Proteazın sıcaklık profilini belirlemek amacıyla enzim 20-70 °C arasındaki sıcaklıklarda yarım saat inkübe edildi ve her bir sıcaklık değeri için bölüm 3.6.2'de anlatılan yöntemle göre aktivite testi yapıldı [78]. En yüksek aktivitenin 50 °C'de olduğu görüldü.

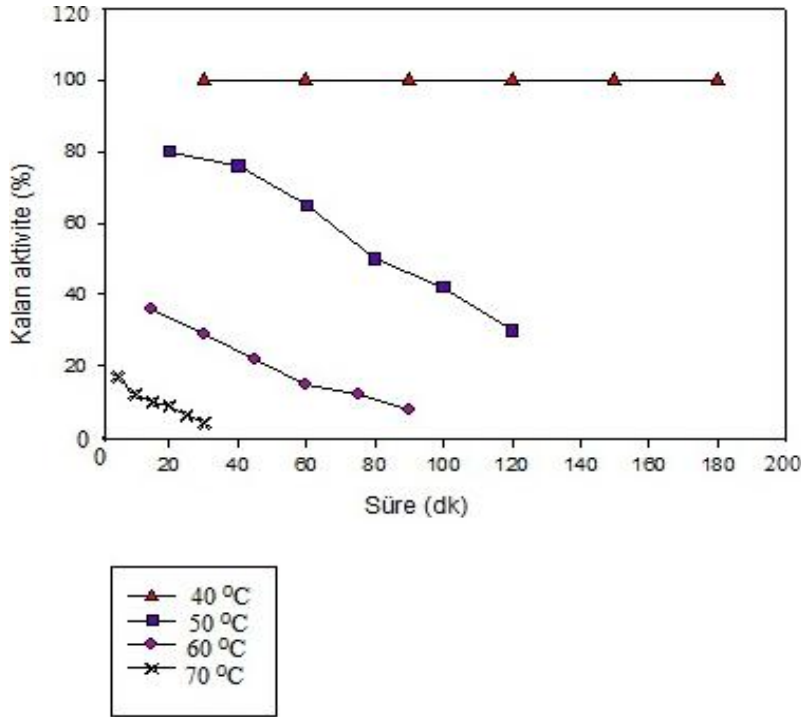


Şekil 4.3. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık profili

4.3.2. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık stabilitesi

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla örnek 40 °C ile 70 °C sıcaklıklar arasında inkübasyona bırakıldı. Inkübasyondan önce ve sonra bölüm 3.6.2'de anlatıldığı gibi aktivitelerine bakıldı [78]. Inkübasyondan önceki aktivite miktarı 100 kabul edilip inkübasyondan sonra elde edilen değerler kalan aktivite olarak değerlendirildi. Enzimin 40 °C'de aktivitesini 3 saat kuyabildiği gözlemlendi. 50

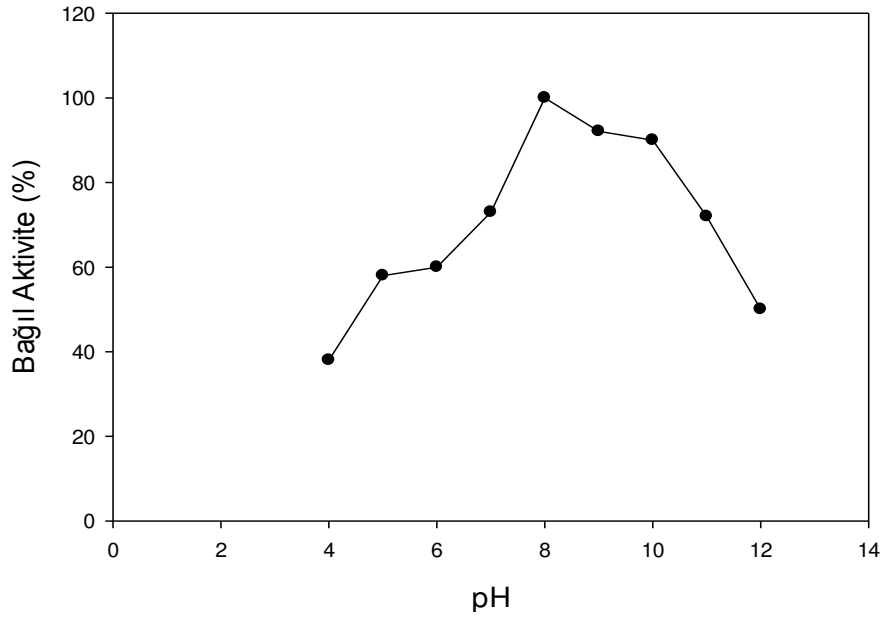
^0C 'de aktivitesinin yarısını 80. dakikadan sonra kaybettiği görüldü. $60\ ^0\text{C}$ 'de 45. dakikada enzim aktivitesinin yaklaşık %25'ini koruduğu ve ilerleyen dakikalarda aktivitesinin hızla azaldığı belirlendi. $70\ ^0\text{C}$ 'de ise 30. dakikada aktivitenin yalnızca %4'ünün kaldığı gözlemlendi.



Şekil 4.4. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık stabilitesi

4.3.3. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH sonuçları

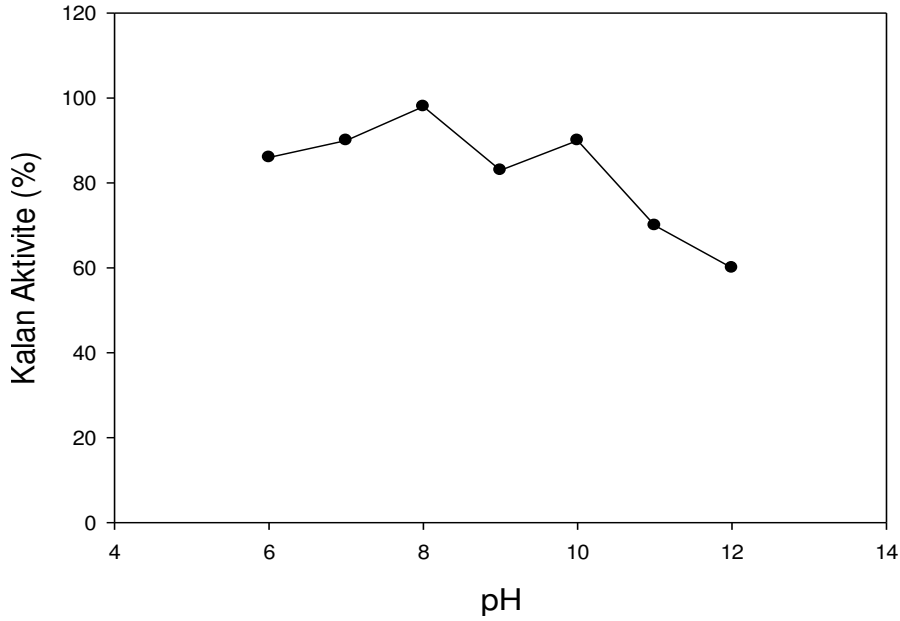
Clostridium botulinum Tip A ATCC 7948'den saflaştırılan proteaz enziminin üzerine pH'nın etkisini belirlemek için pH 4'den 12'ye kadar geniş bir aralıkta bölüm 3.6.2'de verilen yöntemle göre aktivite tayini yapılmıştır [78]. Enzim aktivitesinin pH 4-8 arasında bir artış gösterdiği, pH 8'de ise en yüksek aktiviteye ulaştığı gözlemlenmiştir. pH 8'den sonra ise gittikçe azalan bir aktivite eğiliminde olduğu gözlemlenmiştir. Optimum pH 8 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin pH profili

4.3.4. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin pH stabilitesi sonuçları

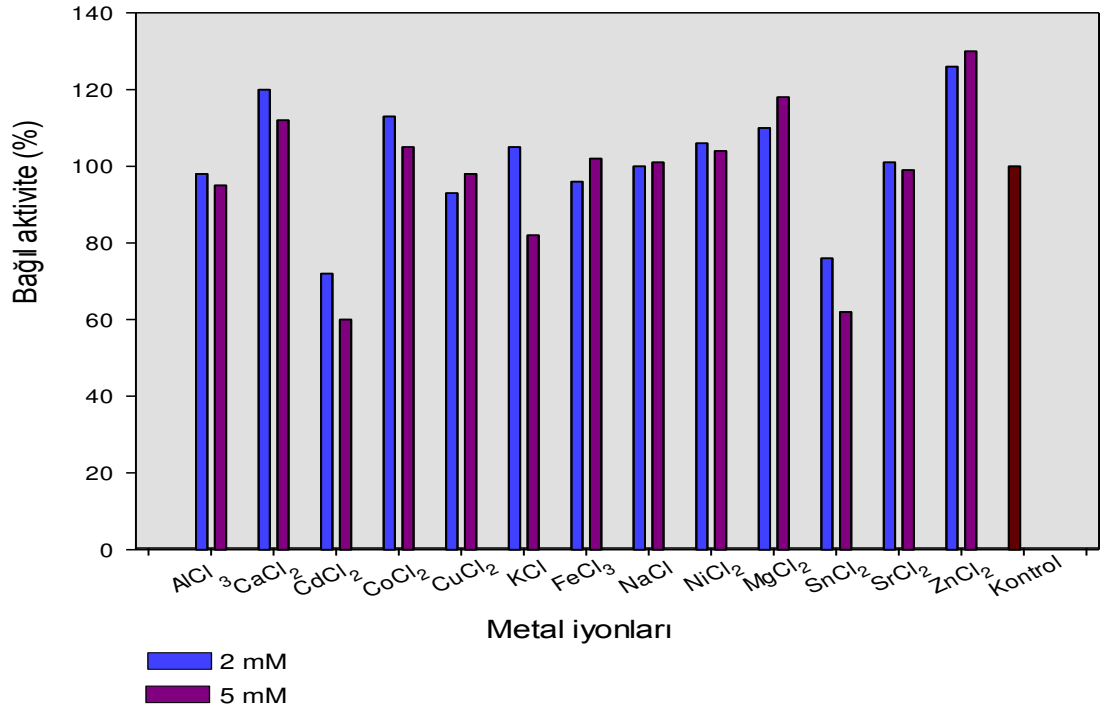
pH' nın *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den saflaştırılan proteaz enziminin stabilitesine etkisini incelemek amacıyla proteaz enzimi pH'sı 6 ila 12 olan tamponlarda 38 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon öncesinde ve sonrasında bölüm 3.6.2.'de anlatılan yöntemle göre aktivite tayini yapılmıştır [78]. 38 °C'de 1 saat inkübasyon sonucunda enzim, aktivitesinin pH 6,7 ve 8'de büyük bir kısmını koruduğu gözlenmiştir. pH arttıkça enzimin kararlılığında bir azalış gözlenmiştir. Enzim pH 12' de aktivitesinin %40' ını kaybetmiştir.



Şekil 4.6. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin pH stabilitesi

4.3.5. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzime bazı metal iyonlarının etkisi

Metal iyonlarının proteaz aktivitesine etkisini incelemek amacıyla K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Sn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , ve Al^{3+} iyonları kullanılmıştır. İyonların 2 ve 5 mM'lık çözeltileri hazırlanıp enzim çözeltisiyle 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonucunda örneklerin bölüm 3.6.2'de belirtilen yöntemle göre aktivitelerine bakılmıştır [78]. 2 ve 5 mM'lık $CdCl_2$ ve $SnCl_2$ çözeltileri enzimi inhibe ettiği gözlenmiştir. $CaCl_2$, $CoCl_2$, $MgCl_2$ ve $NiCl_2$ çözeltilerinin her iki konsantrasyonunda enzim aktivitesinde bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Enzimin en yüksek aktivitesi yaklaşık %30'luk artışla $ZnCl_2$ ün her iki konsantrasyonunda da gözlenmiştir. KCl 'ün 2 mM'lık çözeltisi enzim bağıl aktivitesini %6 artırırken, 5 mM'lık çözeltisi enzim bağıl aktivitesini %28 azalttığı görülmüştür. $AlCl_3$, $FeCl_3$, $NaCl$ ve $SrCl_2$ çözeltilerinin ise enzim aktivitesine bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimine bazı metal iyonlarının etkisi

4.3.6. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimine doğal substratların etkisi

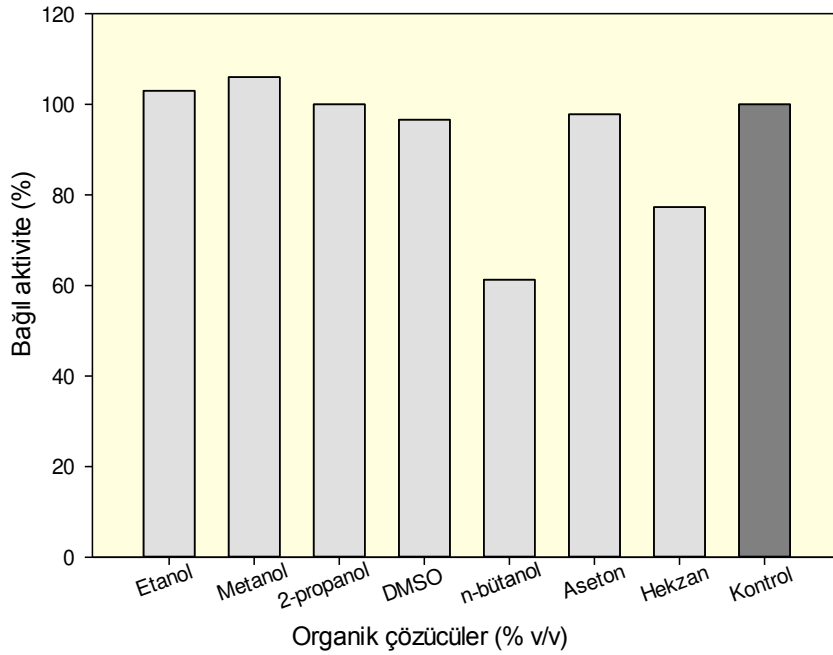
Clostridium botulinum Tip A ATCC 7948'den saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara karşı spesifitesini belirlemek için %0,6'lık (w/v) kazein, BSA, jelatin ve soya fasulyesi unu çözeltileri hazırlandı. Enzimin maksimum aktiviteyi kazeine karşı gösterdiği gözlemlendi. Kazeinin aktivitesi 100 kabul edilip diğer substratların aktivitesi en yüksek aktiviteyi veren substrata göre bağıl olarak hesaplandı.

Çizelge 4.5. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara karşı spesifitesi

Substratlar (%0,6 w/v)	Bağıl aktivite
Kazein	100
Jelatin	59
Soya fasulyesi unu	42
BSA	83

4.3.7. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimine organik çözücülerin etkisi

Clostridium botulinum Tip A ATCC 7948'den saflaştırılan proteaz enziminin organik çözücüler varlığında kararlılığını incelemek amacıyla etanol, metanol, 2-propanol, DMSO, n-butanol, aseton ve hekzan kullanıldı. Enzim çözeltisi organik çözücüler varlığında 38 °C'de yarım saat inkübe edildi. Kör olarak da sadece enzim çözeltisi aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. Kör olarak hazırlanan numunenin aktivitesi 100 kabul edilip, diğer örneklerin köre göre bağıl aktiviteleri hesaplandı. Etanol, metanol, DMSO, 2-propanol, ve asetonun enzim aktivitesini koruduğu gözlemlendi. n-butanolün enzimi %39, hekzanın ise %23 oranında inhibe ettiği görüldü. Genel olarak enzimin organik çözücülere karşı stabil olduğu belirlendi.



Şekil 4.8. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimine organik çözücülerin etkisi

4.3.8. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimine bazı deterjan yüzey aktif maddelerin ve yükseltgenlerin etkisi

Clostridium botulinum Tip A ATCC 7948'den saflaştırılan proteaz enzimine yüzey aktif maddelerin etkisini incelemek için %1'lik SDS (w/v), %1'lik Tween 80 (v/v), %1'lik Triton X-100 (v/v), ve yükseltgenlerin etkisini incelemek için ise %2'lik ve %5'lik H_2O_2 (v/v) kullanılmıştır. Triton X-100 varlığında enzimin aktivitesi yaklaşık %32 artarken Tween 80 ve SDS enzimin aktivitesini kısmen korumuştur. Yükseltgen reaktiflerden olan %2'lik ve %5'lik H_2O_2 varlığında enzim aktivitesinde artış olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.6. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimine bazı deterjan yüzey aktif maddelerin ve yükseltgenlerin etkisi

Deterjan katkı maddeleri	Bağlı aktivite (%)
%1 Triton X-100	132
%1 Tween 80	106
%1 SDS	98
Yükseltgen reaktifler	
%2 H ₂ O ₂ (v/v)	115
%5 H ₂ O ₂ (v/v)	123
Kontrol	100

4.3.9. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimine amino asit inhibitörlerinin etkisi

Clostridium botulinum Tip A ATCC 7948'den saflaştırılan proteaz enzimi aktiviteden sorumlu amino asitlerin belirlenmesi amacı ile fenilmetilsülfonilflorür (PMSF), etilendiamin tetra asetik asit (EDTA), ditiyotreitöl (DTT) ve 2-merkaptoetanol varlığında oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Kör olarak içerisinde amino asit inhibitörü bulundurmayan örnek de aynı şartlarda inkübe edildi. Aktivite testi sonrasında kör örneğin aktivitesi 100 kabul edilip, diğer örnekler köre göre bağlı aktivite olarak belirlendi. Enzimin 2 mM EDTA varlığında aktivitesinin %88'ini, 5 mM varlığında ise aktivitesinin %91'ini kaybettiği görüldü. 2 mM ve 5 mM PMSF varlığında ise sırası ile %18 ve %30 oranında aktivitenin kaybolduğu gözlemlendi. 2 ve 5 mM DTT varlığında enzim aktivitesi artarken, 2-merkaptoetanol varlığında ise aktivitenin korunduğu tespit edildi.

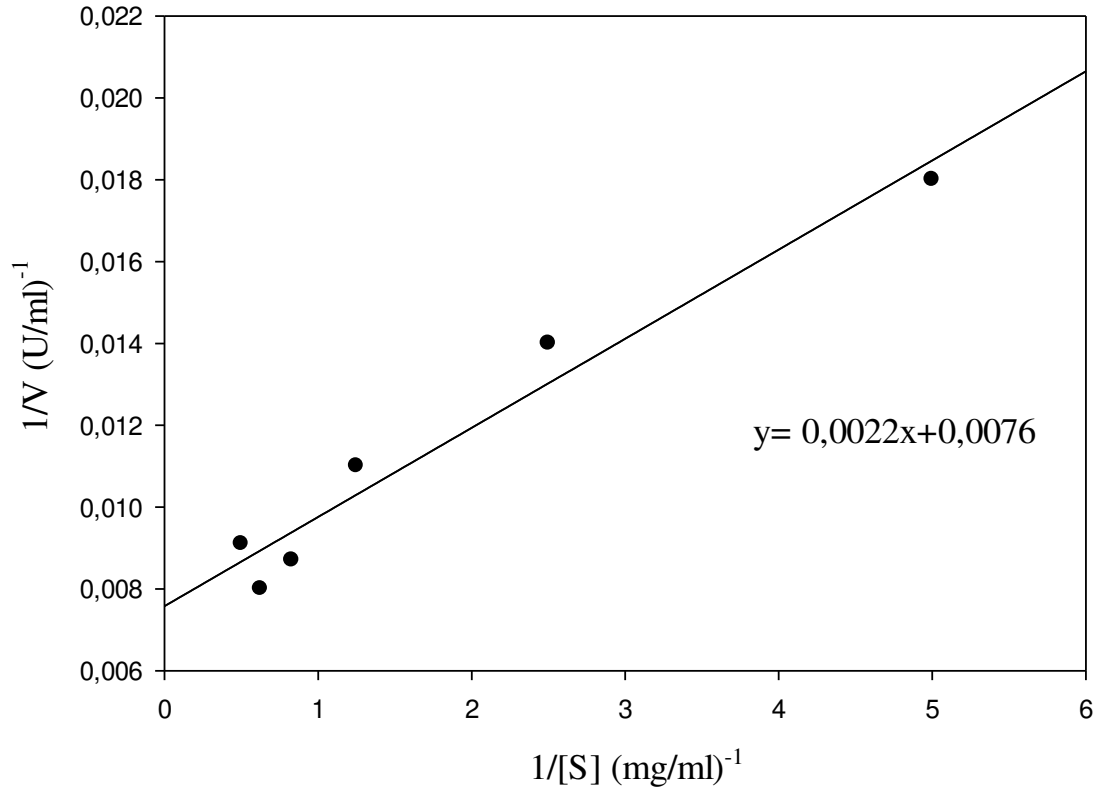
2 ve 5 mM EDTA varlığında enzim aktivitesinin büyük bir kısmının kaybolması enzimin metaloproteaz olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.7. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimine bazı amino asit inhibitörlerinin etkisi

Amino asit inhibitörleri	Kalan aktivite (%)
EDTA (2 mM)	12
EDTA (5 mM)	9
PMSF (2 mM)	82
PMSF (5 mM)	70
DTT (2 mM)	105
DTT (5 mM)	107
2-merkaptotanol	98
Kontrol	100

4.3.10. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin Michaelis Menten kinetik parametreleri

Clostridium botulinum Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin Michaelis Menten kinetik parametreleri Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak hesaplanmıştır. K_m ve V_{mak} sırası ile 0,29 mg/ml, 0,73 $\mu\text{mol.ml}^{-1} \cdot \text{dak}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.9. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratıyla elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

5. TARTIŞMA VE DEĞERLENDİRME

Yapılan çalışmada *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den proteaz enzimi kısmi olarak saflaştırılmış ve karakterizasyon işlemleri yapılmıştır. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948 uygun besiyerinde çoğaltılmış ve hücre dışı enzim salınımı gerçekleştirilmiştir. Ham ekstrakta %85 amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır. Amonyum sülfatlanan örneğe diyaliz işlemi uygulanarak enzim %9,6 verimle 1,4 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemine pH 8 Tris HCl tamponuyla dengelenmiş DEAE selüloz anyon değiştirici kolon kromatografisiyle devam edilmiştir. Kromatografi sonucunda enzim %6,12 verimle 3,67 kat saflaştırılmıştır (Çizelge 4.4). Verimin bu kadar düşük olması amonyum sülfatın enzimin ve proteinlerin yapısını bozmasından dolayı olduğu düşünülmüştür. Amonyum sülfatla çöktürme yerine diğer çöktürme tekniklerinden biri olan aseton ile çöktürme denenmiş fakat sonucun değişmediği gözlenmiştir. Ayrıca çalışma ortamının pH ve sıcaklığı, enzime ortamdaki diğer maddelerin bozucu etkide bulunması gibi faktörler de enzimin saflığını etkilediği düşünülmüştür.

Literatürdeki diğer çalışmalar incelenmiş ve Alam ile arkadaşları *Clostridium* sp.'den ekstraselüler proteaz enzimini saflaştırmışlardır. Saflaştırma işlemlerinde amonyum sülfatla çöktürme, diyaliz ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisini kullanarak enzimi %26 verimle 12,7 kat saflaştırmışlardır [61]. Dasgupta ve arkadaşları *Clostridium botulinum*'dan proteaz enzimini saflaştırma işlemini amonyum sülfat çöktürmesi, QAE- Sephadex ve Sephadex G-100 kromatografileriyle yapmışlardır ve enzimi % 18 verimle saflaştırmışlardır [54]. Manni ve arkadaşları *Bacillus cereus* SV1'den proteaz enzimini ultrafiltrasyon, Sephacryl S-200 jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE selüloz iyon değişim kromatografisiyle %28 verimle 6 kat saflaştırmışlardır [83]. Yapılan çalışma bu çalışmalarla kıyaslandığında verimin ve saflaştırma katsayısının daha düşük olduğu görülmektedir. Dekleva ve arkadaşları *C. botulinum* Tip A 'dan proteaz enzimini QAE-Sephadex Q-50, Sephadex G-100 ve CM-Sephadex C-50 kolonlarıyla %5

verimle 1,083 kat saflaştırmışlardır [51]. Yapılan çalışma da bu çalışmaya göre daha iyi bir verimle saflaştırılmıştır.

Saflaştırılan enzimin özelliklerini belirlemek amacıyla karakterizasyon çalışması yapılmıştır. Bu amaçla enzimin optimum pH ve sıcaklığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda enzime metal iyonlarının, doğal substratların, organik çözücülerin, deterjan yüzey aktif maddelerin, yükseltgenlerin ve amino asit inhibitörlerinin etkisi incelenmiştir.

Enzimin en önemli karakteristik özelliklerinden biri optimum pH ve optimum sıcaklıktır. Çalışmamızda kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği pH 8 olarak bulunmuştur. pH 9 ve 10'da ise aktivitelerinin birbirine yakın olduğu, pH arttıkça aktivitenin azaldığı gözlenmiştir. Enzim pH 8'de ve 38 °C'de 1 saat boyunca aktivitesinin %98'ini korumuştur. pH 10'da ise aktivitesinin yaklaşık % 40'ını kaybetmiştir. Manni ve arkadaşları *Bacillus cereus* SV1'den saflaştırdıkları metaloproteazın optimum pH' ını 8 olarak tespit etmişlerdir. Enzim pH 8,5, 9 ve 9,5'te ve 30 °C'de 15 dakika boyunca aktivitesinin hemen hemen tamamını korumuştur [83]. Kim ve arkadaşları *Bacillus cereus* KCTC 3674'ten saflaştırdıkları metaloproteazın optimum pH' ını 8 bulmuşlardır [84]. Wang ve arkadaşları *Bacillus* sp. TKU004'ten organik çözücü stabil metaloproteaz saflaştırmışlar ve enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'ı 6-8 bulmuşlardır [85]. Markaryan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *Aspergillus fumigatus*'tan metaloproteaz enzimini saflaştırmışlar ve optimum pH'sını 8 olarak bulmuşlardır. Enzim pH 8'de 60 °C'de 1 saat boyunca aktivitesinin yarısını korumuştur [86]. Windle ve arkadaşları *Helicobacter pylori*'den saflaştırdıkları metaloproteazın maksimum aktivite gösterdiği pH'ı 8 olarak tespit etmişlerdir . Sundararajan ve arkadaşları *Bacillus cereus* VITSN04' ten saflaştırdıkları proteazın optimum pH' ını 8 olarak tespit etmişlerdir. Enzimin pH 8 ve 9 arasında 37 °C'deki inkübasyonundan sonra stabil kaldığını belirtmişlerdir [74]. Literatürdeki bu çalışmaların optimum pH' ı tez kapsamında saflaştırılan proteazın optimum pH'ıyla uyumlu olduğu görülmüştür.

Clostridium botulinum Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteazın optimum sıcaklığının 50 °C olduğu tespit edilmiştir. Croux ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824' ten metaloproteaz saflaştırmışlar ve enzimin en yüksek aktiviteyi 45-50 °C' de gösterdiğini belirtmişlerdir [51]. Rufo Jr ve arkadaşları *Bacillus subtilis*'ten saflaştırdıkları metaloproteazın optimum sıcaklığını 50 °C olarak bildirmişlerdir [88]. Thys ve Brandelli tarafından *Microbacterium* sp.' den saflaştırılan metaloproteazın optimum aktivitesinin 50 °C olduğu bildirilmiştir [89]. Ghorbel ve arkadaşları *Bacillus cereus* BG1'den saflaştırdıkları proteazın optimum sıcaklığını Ca^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda sırasıyla 60 °C ve 50 °C olarak belirtmişlerdir [90]. Xu ve arkadaşları *Bacillus cereus* WQ9-2'den saflaştırdıkları organik çözücü stabil proteazın optimum pH' sını 50 °C olarak yayınlamışlardır [91].

Çalışmamızda kısmi olarak saflaştırılan proteazın sıcaklık kararlılığı incelendiğinde 3 saat boyunca 40 °C'de enzimin kararlılığını koruduğu gözlenmiştir. 50 °C'de ise 2 saatin sonunda enzim, aktivitesinin yaklaşık %60'ını kaybetmiştir. Enzim 60 °C'de 20 dakikada aktivitesinin %38'ini koruyabilmiştir. Enzim 70 °C'de ise 30 dakika sonunda aktivitesini yitirmiştir. Enzimin sıcaklık kararlılığı incelendiğinde düşük sıcaklıklarda aktivitesini koruyabildiği görülmüş fakat sıcaklık yükseldikçe aktivitesinin düştüğü sonucuna varılmıştır. Singh ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *Bacillus* sp SSR1'den saflaştırdıkları proteazın 40 °C'de 6 saat boyunca aktivitesinin tamamını koruduğunu, 50 ve 60 °C'de ise sıcaklığın arttıkça aktivitede düşüş olduğunu belirtmişlerdir [92]. Bayoudh ve arkadaşları *Pseudomonas aeruginosa* MN'den saflaştırdıkları proteaz enziminin 70 °C'de 15 dakika inkübasyonu sonunda aktivitesinin yaklaşık %85'ini kaybettiğini yayınlamışlardır [93]. Literatürde olan bu çalışmalar ile tez kapsamında yapılan *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık kararlılığı sonuçları birbiriyle uyumludur.

Kısmi olarak saflaştırılan proteazın katalitik bölgesini belirlemek amacıyla enzim amino asit inhibitörleriyle muamele edilmiştir. Metaloproteaz spesifik inhibitörü olan EDTA ile aktivitesinin kaybolması saflaştırılan enzimin metaloproteaz ailesinden

olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda enzimin 2 ve 5 mM'lık PMSF ile inkübasyonu sonucunda sırayla %18 ve %30 oranında aktivitesini kaybetmesi aktif merkezin yakınında serin kalıntılarının olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır. Enzimin DTT ve 2-merkaptetanolden etkilenmemesi sistein proteaz olmadığını kanıtlamıştır. Alam ve arkadaşları *Clostridium* sp.'den elde ettikleri proteazın 1 mM'lık EDTA ile aktivitesinin %84'ünü, 5 mM'lık PMSF ile %90'ını kaybettiğini belirtmişlerdir. Bu sonuçtan yola çıkarak saflaştırdıkları enzimin metaloproteaz olduğunu ve aktif merkezinde ise serin kalıntılarının varlığını tespit etmişlerdir [65]. Manni ve arkadaşları *Bacillus cereus* SV1'den saflaştırdıkları proteazın EDTA ile %100, PMSF ile %30 oranında aktivitesini kaybettiğini bildirmişlerdir. Bu sonuçların saflaştırdıkları enzimin metaloproteaz olduğunu ve aktif merkezde serin kalıntılarının varlığını gösterdiğini yayınlamışlardır [83]. Bu verilerin *Clostridium botulinum* Tip A'dan saflaştırılan proteaz ile uyumlu olduğu görülmüştür. Markaryan ve arkadaşlarının *Aspergillus fumigatus*'tan saflaştırdıkları proteaz EDTA ile %100 inhibisyona uğrarken, PMSF, antipain, kimostatin ve pepsatinin enzim üzerinde bir etkisinin olmadığını yayınlamışlardır. Böylece saflaştırdıkları enzimin metaloproteaz ailesinden olduğunu sonucuna varmışlardır [86]. Wang ve arkadaşları *Bacillus* sp. TKU004'ten elde ettikleri proteazın 5 mM EDTA ile aktivitesinin tamamını yitirdiğini ve saflaştırdıkları enzimin metaloproteaz olduğunu bildirmişlerdir [85]. Wang ve arkadaşları *Chryseobacterium indologenes* TKU014'ten 3 ayrı ekstrasellüler proteaz saflaştırmışlar ve üçünde EDTA ve 1,10 fenantrolin ile kuvvetlice inhibe olduğunu bulmuşlardır. PMSF'nin ise enzimlerin üzerinde fazla etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Enzimlerin metal şelatörü EDTA ve Zn-spesifik şelatörü 1,10 fenantrolin ile inhibe olması Zn-metaloproteaz olarak karakterize edilmesine neden olmuştur [94].

Clostridium botulinum Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan metaloproteazın metal iyonları varlığında aktivitesi incelendiğinde 2 ve 5 mM'lık Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} ve Ni^{2+} iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde aktivatör etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Al^{3+} , Fe^{3+} , Na^{+} ve Sr^{2+} iyonlarının enzim aktivitesi üzerine bir etkisi olmazken Cd^{2+} ve Sn^{2+} iyonları her iki konsantrasyonda da enzimi inhibe etmiştir. Saflaştırılan proteazın Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} ve Ni^{2+} ile aktivitesinin

artması bu metallerin substratın enzimin bağlanma bölgesine olan ilgisini artırdığını göstermiştir. Croux ve arkadaşlarının *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824'ten saflaştırdıkları metaloproteazın 1 mM Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} ve Ag^{+} iyonları varlığında enzim aktivitesi üzerinde etkisinin olmadığını 1 mM Co^{2+} iyonu varlığında aktivitede %33'lük bir artış gözlemlendiğini bildirmişlerdir [55]. Dekleva ve Dasgupta tarafından *Clostridium botulinum* Tip A'dan saflaştırılan metaloproteazın Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} ve Cr^{2+} iyonları varlığında aktivitesinin arttığı, Cu^{2+} iyonunun aktivite üzerinde bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir [51]. Jin ve arkadaşlarının 1996 yılında *Clostridium perfringens* tip B NCIBI 10691'den saflaştırdıkları metaloproteazın 2,5 mM Zn^{2+} , Co^{2+} ve Mn^{2+} ile aktivitesinin arttığı, Mg^{2+} ve Co^{2+} iyonlarından etkilenmediği tespit edilmiştir [57]. Literatürde olan bu çalışmalar ile *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteaz üzerine metal iyonlarının etkisi benzerlik göstermiştir.

Çalışmada kısmi olarak saflaştırılan proteazın doğal substratlara karşı gösterdiği ilgi incelendiğinde en iyi sonucu kazeine, daha sonra sırasıyla BSA, jelatin ve soya fasulyesi ununa karşı vermiştir. Lee ve arkadaşları *Bacillus* sp. SCB-3'ten izole ettikleri keratinolitik metaloproteazın kazein, kollajen, elastin ve keratine karşı olan ilgisini incelemişler ve enzimin kazeine karşı yüksek bir spesifiteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir [95]. Wang ve arkadaşları *Chryseobacterium indologenes* TKU014'ten saflaştırdıkları 3 ayrı metaloproteazın (P1, P2, P3) ayrı ayrı doğal substrat spesifitesini araştırmışlardır. Üçünde kazeine karşı gösterdiği aktivite en yüksek olduğunu, fakat albümin ve fibrine karşı hiç ilgilerinin olmadığını tespit etmişlerdir. P1, P2, ve P3'ün elastini sırasıyla %75, %40 ve %86 oranında hidroliz ettiğini rapor etmişlerdir [94]. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan metaloproteazın incelenen çalışmalarda ki gibi en iyi spesifiteyi kazeine karşı gösterdiği belirlenmiştir.

Çalışmada kısmi olarak saflaştırılan proteazın organik çözücüler varlığında stabilitesi incelendiğinde etanol, metanol, 2-propanol, DMSO ve asetona karşı kararlılığını sırasıyla %103, %106, %100, %96 ve %97 oranında koruduğu gözlemlenmiştir. n-butanol ve hekzanın ise enzimi sırasıyla %39 ve %23 oranında inhibe ettiği

görülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak enzimin organik çözücü stabil olduğu kararlaştırılmıştır. Enzimin organik çözücü stabil olması bir avantajdır. Çünkü bazı organik ürünler suda kararsız olmaktadır. Çözücü olarak su yerine organik ürünlerden yararlanıldığı durumlarda enzimlerin katalizör olarak kullanıldığı zaman daha sağlıklı sonuçlar alınabilmektedir. Sousa ve arkadaşlarının *Bacillus cereus*'tan saflaştırdıkları metaloproteaz DMSO, izopropanol ve asetonitril varlığında kararlılığını korumuştur [96]. Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Bacillus sp.* TKU004'ten saflaştırdığı metaloproteaz metanol, aseton, etanol, butanol, toluen, N,N-dimetilformamid ve izoamil alkol varlığında aktivitesinin %65'ten fazlasını koruduğunu rapor etmişlerdir [85]. Reddy ve arkadaşları *Bacillus sp.* RKY3'ten saflaştırdıkları proteazın etanol, DMSO, benzen, butanol, toluen ve aseton varlığında aktivitesinin sırasıyla %75, %93, %109, %37, %107, ve %34 oranında koruduğunu bildirmişlerdir [97]. *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'dan kısmi olarak saflaştırılan proteazın organik çözücüler varlığında stabilitesi *Bacillus sp.* RKY3'ten saflaştırılan proteaza göre daha iyi olduğu tespit edilmiştir.

Clostridium botulinum Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteazın yüzey aktif maddeler ve yükseltgenler varlığında etkilerini belirlemek için Triton X-100, Tween 80, SDS, %2'lik ve %5'lik H₂O₂ kullanılmıştır. Enzim yüzey aktif maddelerden olan Triton X-100, Tween 80 ve SDS'e karşı aktivitelerini sırasıyla %132, %106 ve %98 oranında korumuştur. Yükseltgen reaktiflerden olan %2'lik ve %5'lik H₂O₂ varlığında ise enzimin aktivitesinde %15 ve %23 oranında artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar enzimin deterjanların bileşimlerinde bulunan yüzey aktif maddeler ve yükseltgenlere karşı dayanıklı olabileceğini göstermiştir. Doddapaneni ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Bacillus cereus*'dan yeni bir proteaz saflaştırmışlar ve enzimin Triton X-100, Tween 80 ve SDS varlığında aktivitedeki değişimi incelemişlerdir. Enzimin %0,5'lik Triton X-100 ve Tween 80 varlığında aktivitesi sırasıyla %120 ve %60 oranında arttığını, %0,5'lik SDS varlığında ise aktivitesini koruduğunu belirtmişlerdir [72]. Bu sonuçlar Doddapaneni ve arkadaşları tarafından *Bacillus cereus*'dan saflaştırılan proteazın *C. botulinum*'dan saflaştırılan proteazdan Triton X-100 ve Tween 80 varlığında daha kararlı olduğunu göstermiştir. Salamone ve arkadaşları *Serratia marcescens*'ten saflaştırdıkları metaloproteazın

%1'lik SDS varlığında aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir. %1'lik Triton X-100 ve %1'lik Tween 20 varlığında ise %56 ve %31 oranında aktivatör etkisi gösterdiğini rapor etmişlerdir [58]. Manni ve arkadaşları *Bacillus cereus* SV1'den saflaştırdıkları proteazın %1'lik Triton X 100 ve Tween 80 varlığında aktivitesini koruduğunu, %5'lik H_2O_2 varlığında ise aktivitenin yaklaşık %56 oranında arttığını belirtmişlerdir [98]. Manni ve arkadaşlarının saflaştırdığı proteaz %5'lik H_2O_2 varlığında bu çalışmada saflaştırılan proteaza göre daha iyi bir kararlılık sergilemesine rağmen aynı kararlılığı Triton X 100 ve Tween 80'e karşı gösterememiştir.

Çalışmada kısmi olarak saflaştırılan enzimin kazein varlığında Michaelis Menten kinetik parametreleri (K_m ve V_{max}) Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak sırası ile 0,29 mg/ml ve 0,73 $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{dak}^{-1}$ olarak bulunmuştur. K_m enzim ile verilen substratın karşılıklı etkileşimlerini karakterize eden bir sayıdır [1]. K_m değeri ne kadar küçükse enzimin substrata olan ilgisi o kadar büyüktür. Literatürde ki bazı çalışmalarda saflaştırılan proteazın K_m ve V_{max} değerleri *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteazın K_m ve V_{max} değerleri ile karşılaştırılmıştır. Alam ve arkadaşları *Clostridium* sp.'den saflaştırdıkları ekstrasellüler proteazın 37 $^{\circ}\text{C}$ 'deki K_m değerini 6,6 mg/ml olarak tespit etmişlerdir [65]. Venter ve arkadaşları yaptıkları çalışmada süt ürünlerinden izole ettikleri *Chryseobacterium indologenes* Ix9a'dan proteaz saflaştırmışlar ve saflaştırdıkları proteazın kazein varlığında K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 0,813 mg/ml, 0,0154 U/mg olarak bulmuşlardır [59]. Wang ve arkadaşları *Bacillus* sp. TKU004'ten saflaştırdıkları çözücü stabil metaloproteazın K_m ve V_{max} değerlerini sırası ile 2,98 mg/ml ve 0,14 U/ml olarak tespit etmişlerdir [85]. Literatürdeki bu çalışmalar incelendiğinde *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den kısmi olarak saflaştırılan proteazın substrata olan ilgisinin daha çok olduğu ve daha etkili katalitik role sahip olduğu görülmüştür.

Özetle çalışmada *Clostridium botulinum* Tip A ATCC 7948'den amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE selüloz anyon değişim kromatografisiyle proteaz %6,12 verimle 3,67 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin özelliklerini belirlemek

amacıyla karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Enzimin optimum pH'ı 8 optimum sıcaklığı ise 50 °C'dir. Enzim pH 8'de aktivitesinin %98'ini 1 saat koruyabilmiştir. 40 °C'de ise 3 saat boyunca aktivitenin yaklaşık olarak tamamını korumuştur. Enzimin EDTA ile aktivitesinin büyük bir kısmını kaybetmiş olması metaloproteaz ailesinden olduğunu göstermiştir. Ayrıca PMSF tarafından da inhibe edilmesi enzimin aktif merkezinin yakınında serin kalıntılarının olduğunu kanıtlamıştır. Enzimin pH'ından dolayı alkalen metaloproteaz sınıfına dahildir. Enzim Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} ve Ni^{2+} iyonlarıyla aktive olmuş, Al^{3+} , Fe^{3+} , Na^{+} ve Sr^{2+} iyonlarından ise etkilenmemiştir. Cd^{2+} ve Sn^{2+} iyonları da enzimi inhibe etmiştir. Enzim doğal substratlardan en iyi aktiviteyi kazeine karşı göstermiştir. Proteaz organik çözücüler, yüzey aktif maddeler ve yükseltgen reaktifler varlığında stabilitesini büyük oranda korumuştur. Enzimin K_m değeri incelendiğinde substrata olan ilgisinin literatürde olan diğer çalışmalara göre daha olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak; enzimin organik çözücüler ve yüzey aktif maddeler varlığında stabil olması deterjan formülasyonlarında kullanılabileceğini göstermektedir. Fakat yüksek pH'da aktivitesini yitirmesi enzimin bu özelliği için bir dezavantaj oluşturmıştır.

KAYNAKLAR

1. İnternet: “Enzimler” <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-09.pdf> (2012)
2. Kutay, F., “İnsan Biyokimyası”, Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E., *Palme Yayıncılık*, Ankara 197-221 (2002)
3. İnternet: “Enzimler” <http://ue.anadolu.edu.tr/eKitap/KIM103U.pdf> (2012)
4. Wiseman, A., “The application of Enzymes in Industry” Handbook of Enzyme Biotechnology, *Ellis Horwood Ltd* , Almany, 274-373 (1987).
5. İnternet: “ Intracellular Proteolytic Systems in Alcohol-Induced Tissue Injury ” <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh27-4/317-324.htm>
6. Kalizs M.H., “Microbial Proteinases”, *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 36: 3-29 (1988).
7. Seife, C., “Blunting nature’s Swiss army knife”, *Science*, 277(5332): 1602-1603 (1997)
8. Poorman, R.A., Tomasselli, A.G., Heinrichson, R.L., Kezdy, A., “A cumulative specificity model for proteases from human immunodeficiency virus types 1 and 2, inferred from statistical analysis of an extended substrate database”, *J Biol. Chem.*, 266: 14554–14561(1991).
9. Rao, M. B., Tanksale, M., Ghatge, M. S., Deshpande, V., “Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteinases”, *Microbiology and Molecular Biology reviews*, 62(3): 597-635 (1998).
10. Koçak, M., “Mast hücre proteazları ve biyolojik önemi”, *Journal of Health Sciences*, 14(1): 61-67 (2005).
11. Otin, C.L., Bond, J.S., “Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease”, *The Journal of Biological Chemistry*, 283(45): 30433-30437 (2008).
12. Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P., “Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications”, *Appl Microbiol Biotechnol*, 59: 15-32 (2002).
13. Raksakulthai,R., Hard, N.F., “Exopeptidases and Their Application to Reduce Bitterness in Food: A Review”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(4): 401-445 (2003).

14. Duran, K., E, Bozacı., Karahan A.H., “Protein Esaslı Mamüllerin Enzimatik Ön Terbiyesi”, Ege Üniversitesi Tekstil Mühendisliği Bölümü, **Tekstil ve Konfeksiyon**, 2007
15. Nduwimana, J., Guenet, L., Dorval, I., Blayau, M., “Proteases”, **Ann. Biol. Clin.**, 53: 251-264 (1995).
16. Rawlings, N.D., Baret, A.J., “Evolutionary Families of Peptidases”, **Biochemical Journal**, 290: 205-218 (1993).
17. Brenner, S.,” The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines”, **Nature**, 334: 528–530 (1988).
18. Polgar, L., “The catalytic triad of serine peptidases”, **Cell. Mol. Life Sci.**, 62: 2161–2172 (2005).
19. İnternet: “Specifity of ser-protease family”
<http://juang.bst.ntu.edu.tw/files/Enz09%20specificity.PPT>
20. Hedstrom, L., “Serin Protease Mechanisim and Specificity”, **Chem. Rev.**, 102: 4501-4523 (2002).
21. İnternet: “Mechanisms of catalysis”,
http://www.kokbiolab.com/lib/exe/fetch.php?media=fnkok:lec9mechanisms_of_catalysis.ppt (2012)
22. Powers,J.C., Asgian, J.L., Ekici, O., James, K.E., “Irreversible İnhibitors of Serine, Cysteine and Threonine Proteases” , **Chem. Rev.**, 102: 4639-4750 (2002).
23. Barrett, A.J., “Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases”, **Methods in Enzymology**, 244: 1-15 (1994).
24. İnternet: “Papain”
<http://www.proteopedia.org/wiki/images/7/76/Papainmech6.jpg> (2012)
25. İnternet: “Proteases: Hydrolysis of Peptide Bonds: Specificity and Mechanism”
http://www.jiaowu.buct.edu.cn/Courseware/Harvard/BCMP201/pdf/ctw_proteases1.pdf (2012)
26. Brik, A., Wong, C., “HIV-1 protease: mechanism and drug discovery”, **Org. Biomol. Chem.**, 1,5-14 (2003).
27. Salleh, A., Basri, M., “New Lipases and Proteases, 2nd ed.” **Nova Science Publishers**, New york 29 (2006).

28. Hase, C.C., Finkelstein, R.A., "Bacterial Extracellular Zinc-Containing Metalloproteases", *Microbiological Reviews*, 57: 823-837 (1993).
29. Kooi, C., Sokol, P.A., "Differentiation of thermolysins and serralsins by monoclonal antibodies", *J. Med. Microbiol.*, 45: 219-225 (1996).
30. Hausrath, A.C., Matthews, B.W., "Thermolysin in the absence of substrate has an open conformation", *Acta Crystallographica*, 58: 1002-1007 (2002)
31. Internet: "Thermolysin"
http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Thermolysin_reaction_cycle.png&filetimestamp=20080622103557 (2012)
32. Rani, K., Rana R., Datt, S., "Review on Latest Overview of Proteases", *International Journal of Current Life Sciences*, 2:12-18 (2012).
33. Mahajan, R.T., Badgujar, S.M., "Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review", *Journal of Pharmacy Research*, 3(9): 2048-2068 (2010).
34. Internet: "Cysteine protease"
<http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Peptidase9.html> (2012)
35. Taussin, S., Batkin, S., "Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application: an update", *Journal of Ethnopharmacology*, 22: 191-203 (1998).
36. Evnin, L., Vasquez, J., Craik, C., "Substrate specificity of trypsin investigated by using a gentic selection", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87: 6659-6663 (1990).
37. Internet: Structure of Trypsin
http://www.pancreatitiscenter.com/chronic_pancreatitis.aspx (2012)
38. Binnie, C., , Aphale, JS., Bourgault, R., Krygsman, P., Liano, L., Walezyk, E., Malek, LT., "Isolation and characterization of 2 genes encoding protease associated with the mycelium of *Streptomyces lividans* 66", *Journal of Bacteriology*, 177: 6033-6040 (1995).
39. Kumar, C.G., Takagi, H., "Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint", *Biotechnol Adv*, 17: 561–594 (1999).

40. Sevinç, N., “Türkiye topraklarından elde edilen *Bacillus sp* suşlarından proteaz üretimi, kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu”, Yüksek lisans tezi, **Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Bursa, 18-20 (2010).
41. Turk, B., “Targeting proteases: successes, failures and future prospect.”, **Nature Reviews Drug Discovery**, 5: 785-798 (2006).
42. Rao, S., Sathish, T., Ravichandra, P., Prakasham, R.S., “Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications”, **Process Biochemistry**, 44: 262-268 (2009).
43. Gupta, R., Beg, Q.K., Khan, S., Chauhan, B., “An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases”, **Applied Microbial Biotechnology**, 60: 381-395 (2002).
44. Tang, X.M., Lakay, F.M., “Purification and characterisation of an alkaline protease used in tannery industry from *Bacillus licheniformis*”, **Biotechnology Letters**, 26: 1421-1424 (2004).
45. Duman, Y., “ *Bacillus clausii* alkalen proteazı’nın su ile karışabilen organik çözücüler varlığında kinetik ve termodinamik özelliklerinin incelenmesi”, Doktora Tezi, **Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Kocaeli, 29-33 (2008).
46. İnternet: “ The Bioengineering and Industrial Applications of Bacterial Alkaline Proteases: the Case of SAPB and KERAB”
<http://www.intechopen.com/books/progress-in-molecular-and-environmental-bioengineering-from-analysis-and-modeling-to-technology-applications/the-bioengineering-and-industrial-applications-of-bacterial-alkaline-proteases-the-case-of-sapb-and->
47. İnternet: “*Clostridium botulinum*”
<http://tr.wikipedia.org/wiki/Clostridium>
48. Tunail, N., “*Clostridium botulinum*”, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, 2. baskı, **Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını**, Ankara 522-526 (2000).
49. Caya, G.J., Agni, R., Miller, J.E., “*Clostridium botulinum* and the clinical laboratorian a detailed review of botulism, Including biological warfare ramifications of botulinum toxin”, **Arch Pathol Lab Med**, 128 (2004).
50. Land, K.M., Chen, L.W., “Botulinum neurotoxin: a deadly protease with applications to human Medicine”, **Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, 965-971 (2010).

51. Dekleva, M.L., Dasgupta, B.R., "Purification and characterization of a protease from *Clostridium botulinum* type A that nicks single-chain type A botulinum neurotoxin into the di-chain form", *Journal of Bacteriology*, 172(5): 2498-2503 (1990).
52. Bibhuti, R., Dasgupta, B.R., Activation of *Clostridium botulinum* Type B Toxin by an Endogenous Enzyme", *Journal of Bacteriology*, 108(3): 1051-1057 (1971).
53. Nakane, E.A., "Proteases Produced by a Proteolytic Mutant of *Clostridium botulinum* Type", *Journal of General Microbiology*, 107: 85-91 (1978).
54. Dasgupta, B.R., Sugiyama, H., "Isolation and characterization of a protease from *Clostridium botulinum* type B", *Biochimica et Biophysica Acta*, 268: 719-729 (1972).
55. Croux, C., Paquet, V., Goma, G., Soucaille, P., "Purification and characterization of acidolysin an acidic metalloprotease produced by *Clostridium acetobutylicum* atcc 824", *Appl. Environ. Microbiol*, 56(12): 3634-3642 (1990).
56. Monod, M., Togni G., Rahalison, L., Frenk, E., "Isolation and characterisation of an extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigatus*", *Journal Medicinal Microbiology*, 135: 23-28 (1991).
57. Jin, F., Matsushita, O., Jin, S., "Purification, characterization, and primary structure of *Clostridium perfringens* lambda-toxin, a thermolysin-like metalloprotease", *Infection and Immunity*, 64(1): 230-237 (1996).
58. Salamone, P.R., Wodzinski, R.J., "Production, purification and characterization of a 50-kDa extracellular metalloprotease from *Serratia marcescens*", *Appl Microbiol Biotechnol*, 48: 317-324 (1997).
59. Venter, H., Osthoff, G., Litthauer, D., "Purification and Characterization of a Metalloprotease from *Chryseobacterium indologenes* Ix9a and Determination of the Amino Acid Specificity with Electrospray Mass Spectrometry", *Protein Expression and Purification*, 15: 282-295 (1999).
60. Rozs, M., Manczinger, L., "Secretion of a trypsin-like thiol protease by a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*", *FEMS Microbiology Letters*, 205: 221-224 (2001).
61. Kaur, S., Vohra, R.M., Kapoor, M., "Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus sp.* P-2", *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 125-129 (2001).

62. Kumar, C.G., "Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*", ***Letters in Applied Microbiology***, 34: 13-17 (2002).
63. Huang, Q., Peng, Y., Li X., Wang, H., Zhang, Y., " Purification and Characterization of an Extracellular Alkaline Serine Protease with Dehairing Function from *Bacillus pumilus*", ***Current Microbiology***, 46: 169-173 (2003).
64. Khan, A., Williams, K., Molloy, M., Nevalainen, H., "Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels", ***Protein Expression and Purification***, 32: 210-220 (2003).
65. Alam, S.I., Dube, S., Reddy, G.S.N., Bhattacharya, B.K., "Purification and characterisation of extracellular protease produced by *Clostridium* sp. from Schirmacher oasis", ***Enzyme and Microbial Technology***, 36: 824-831 (2005).
66. Ghorbel, F., Haddar, A., Manni, L., "Production and purification of a calcium-dependent protease from *Bacillus cereus* BG1", ***Microbiol Biotechnol***, 32: 186-194 (2005).
67. Genckal, H., Tari, C., "Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats", ***Enzyme and Microbial Technology***, 39: 703-710 (2006).
68. Huang, G., Ying, T., Huo, P., "Purification and characterization of a protease from *Thermophilic bacillus* strain HS08", ***African Journal of Biotechnology***, 5(24) 2433-2438 (2006).
69. Riffel, A., Brandelli, A., "Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6", ***Journal of Biotechnology***, 128: 693-703 (2007).
70. Kim, J., Choi, B., Kim, E., "Purification and characterization of fibrinolytic metalloprotease from *Perenniporia fraxinea* mycelia", ***Mycological Research***, 112: 990-998 (2008).
71. Hmidet, H., Haddar, A., "Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive", ***Biochemical Engineering Journal***, 47: 71-79 (2009).
72. Doddapaneni, K.K., Tatineni, R., Vellanki, R.N., Rachcha, S., "Purification and characterization of a solvent and detergent-stable novel protease from *Bacillus cereus*", ***Microbiological Research***, 164: 383-390 (2009).

73. Haddar, A., Kamoun, A.S., Hmidet, N., Nasri, M., "Characterization of detergent stable and feather degrading serine proteases from *Bacillus mojavenensis* A21", **Biochemical Engineering Journal**, 51: 53-63 (2010).
74. Sundararajan, S., Kannan, N., Chittibabu, S., "Alkaline protease from *Bacillus cereus* VITSN04: Potential application as a dehairing agent", **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 111(2): 128-133 (2011).
75. Uyar, F., Porsuk, İ., Kizil, G., Yilmaz "Optimal conditions for production of extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* strain CA15", **EurAsian Journal of BioSciences**, 5: 1-9 (2011).
76. Zambare, V., Kanekar, P., "A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization", **New Biotechnology**, 28(2): 173-181 (2011).
77. Takami, H., Akiba, T., Horikoshi, K., "Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. AH-101", **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 30: 120-124 (1989).
78. Bradford M.M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254 (1976).
79. Yapaşan, E., "Partial purification and characterization of lipase enzyme from a *Pseudomonas* strain" Yüksek Lisans Tezi, **İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü**, İzmir 25-26 (2008).
80. İnternet: "Protein Analysis-Determination of Protein Concentration"
<http://public.callutheran.edu/~revie/biochemistry/Protein-analysis-lab.pdf>
81. Sari, E., "*Bacillus circulans* M34'ten proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, **Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara 61-62 (2011).
82. Öztürk, S., "Ülkemizden izole edilen *Bacillus licheniformis* BA 17'den elde edilen alkalen proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu" Yüksek Lisans Tezi, **Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, İstanbul 22-23 (2007).
83. Manni, L., Jellouli, K., Agrebi, R., Bayoudh, A., Nasri, M., "Biochemical and molecular characterization of a novel calcium-dependent metalloprotease from *Bacillus cereus* SV1", **Process Biochemistry**, 43: 522-530 (2008).
84. Kim, S.S., Kim, Y.J., Rhee, I., "Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Bacillus cereus* KCTC 3674", **Arch Microbiol.**, 175: 458-461 (2001).

85. Wang, S.L., Kaoc, T.Y., "A solvent stable metalloprotease produced by *Bacillus* sp. TKU004 and its application in the deproteinization of squid pen for β -chitin preparation", *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 724-731 (2006).
86. Markaryan, A., Morozova, I., Kolattukudy, P.E., "Purification and characterization of an elastinolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and immunoelectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung", *Infection and Immunity*, 62(6): 2149-2157 (1994).
87. Windle, H.J., Kelleher, D., "Identification and characterization of a metalloprotease activity from *Helicobacter pylori*", *Infection and Immunity*, 65(8): 3132-3137 (1997).
88. Rufo, G.A., Sullivan, B.J., Slom A., Pero, J., "Isolation and characterization of a novel extracellular metalloprotease from *Bacillus subtilis*", *Journal of Bacteriology*, 172(2): 1019 (1990).
89. Thys, R.C.S., Brandelli, A., "Purification and properties of a keratinolytic metalloprotease from *Microbacterium* sp.", *Journal of Applied Microbiology*, 101: 1259-1268 (2006).
90. Ghorbel, B., Kamoun, S., Nasri, M., "Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1", *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 513-518 (2003).
91. Xu, J., Jiang, M., Sun, H., He, B., "An organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant *Bacillus cereus* WQ9-2: Purification, biochemical properties, and potential application", *Bioresource Technology*, 101: 7991-7994 (2010).
92. Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C., "Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1", *Process Biochemistry*, 36: 781-785 (2001).
93. Bayoudh, A., Gharsallah, N., Chamkha, M., Dhouib, A., Ammar, S., Nasri, M., "Purification and Characterization of an Alkaline Protease from *Pseudomonas aeruginosa* MN1", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24: 291-295 (2000).
94. Wang, S.L., Hsu, W.T., Liang, T.W., Yen, Y.H., "Purification and characterization of three novel keratinolytic metalloproteases produced by *Chryseobacterium indologenes* TKU014 in a shrimp shell powder medium", *Bioresource Technology*, 99: 5679-5686 (2008).
95. Lee, H., Suh, D.B., Hwang, J.H., "Characterization of a Keratinolytic Metalloprotease from *Bacillus* sp. SCB-3", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 97: 123-133 (2002).

96. Sousa, F., Jus, S., Erbel, A., Kokol, V., “A novel metalloprotease from *Bacillus cereus* for protein fibre processing”, *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1772–1781 (2007).
97. Reddy, L., Wee, Y., Ryu, H., “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 (2008).
98. Manni, L., Jellouli, K., Ghorbel, O., “An Oxidant- and Solvent-Stable Protease Produced by *Bacillus cereus* SV1: Application in the Deproteinization of Shrimp Wastes and as a Laundry Detergent Additive”, *Appl Biochem Biotechnol*, 160:2308–2321 (2010).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : DADI, Şeyma
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 23.12.1988 Elazığ
Medeni hali : Bekar
e-mail : seymadadi@hotmail.com.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi /Kimya Bölümü	2012
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Kimya Bölümü	2010
Lise	Behice Yazgan Kız Lisesi	2006