

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİBRİNOLİTİK ENZİM ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BETÜL DÜZLEME
(141132104)

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. M. Şaban TANYILDIZI

ELAZIĞ-2019

**T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

FİBRİNOLİTİK ENZİM ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BETÜL DÜZLEME

(141132104)

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Muhammet Şaban TANYILDIZI

Diğer Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Hasan TOĞRUL

Dr. Öğr. Üyesi Veyis SELEN

OCAK - 2019

ÖNSÖZ

Deneyisel çalışmalar FÜBAP MF.16.26 nolu proje ile yürütülmüştür.

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca, bana bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, laboratuvarlarda tüm imkanlardan yararlanmamı sağlayan ve her konuda desteklerini esirgemeyen danışman hocam saygıdeğer Prof. Dr. M. Şaban TANYILDIZI'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarım boyunca yanımda olan arkadaşlarım Ayşegül ÇELİK ve KÜBRA KOÇAK' a, bölümümüz öğretim üyeleri, araştırma görevlileri ve arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak bugünlere gelmemi sağlayan, her zaman maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Betül DÜZLEME
ELAZIĞ-2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	IV
SUMMARY.....	V
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	VII
KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler.....	1
1.2. Proteazlar.....	3
1.2.1. Proteazların Sınıflandırılması.....	4
1.2.1.1. Serin Proteazlar.....	5
1.2.1.2. Aspartik Proteazlar.....	6
1.2.1.3. Sistein Proteazlar.....	7
1.2.1.4. Metalloproteazlar.....	8
1.2.2. Proteazların Endüstriyel Kullanımı.....	9
1.2.3. Proteaz Enziminin Medikal Alanlarda Kullanımının Tarihçesi.....	11
1.2.4. Proteaz Enziminin Kullanıldığı Hastalıklar.....	12
1.2.5. Tedavide Kullanılan Proteazlar.....	12
1.2.6. Trombolitik ilaçlar.....	13
1.3. Yapılan Çalışmalar.....	17
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
2.1. Materyal.....	26
2.1.1. Proteaz Üretici Mikroorganizma.....	26
2.1.2. Ekipman.....	26
2.1.3. Kimyasallar.....	26
2.1.4. Besiyerleri ve Substratlar.....	27
2.1.5. Tampon ve Çözeltiler.....	27

2.2.	Yöntem.....	28
2.2.1.	Proteaz Enzimi Üreten Suşun İzolasyonu.....	28
2.2.2.	Aktif Kültürün Hazırlanması.....	28
2.2.3.	Kanlı Agar Petrilerine Proteaz Enzim Aktivitesi Belirlenmesi.....	28
2.2.4.	Fibrin Plate Ortamında Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	28
2.2.5.	Proteaz Enzim Aktivitesinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi.....	29
2.2.6.	Tirozin Standart Eğrisinin Hazırlanması.....	29
2.2.7.	Ortam Bileşenlerinin Proteaz Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi.....	30
2.2.8.	Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	30
2.2.9.	Farklı Azot Kaynaklarının Etkisi.....	30
2.2.10.	İz Elementlerin Etkisi.....	31
2.2.11.	Protez Aktivitesinin Maksimum Olduğu Besiyeri Bileşiminin Belirlenmesi.....	31
2.2.12.	Proteaz Enzim Özelliklerinin Belirlenmesi.....	32
2.2.12.1.	Optimum Sıcaklık ve pH'ın Belirlenmesi.....	32
2.2.12.2.	Enzimin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi.....	32
2.2.13.	16S rRNA Analizi.....	33
2.2.14.	Hücre Büyüme Eğrisi.....	33
3.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	34
3.1.	Fermentatif Protein Kaynaklarından Suş İzolasyon Sonuçları.....	34
3.2.	16S rRNA Analizi.....	36
3.3.	Besiyeri Bileşenlerinin Proteaz Enzim Üretimine Etkisi.....	37
3.4.	Merkezi Kompozit Dizayn (MKD) Yöntemi Deney Sonuçları.....	41
3.5.	Enzim Karakterizasyon Sonuçları.....	46
3.6.	Hücre Büyüme Eğrisi.....	49
3.7.	Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi.....	50
4.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	51
5.	KAYNAKLAR.....	53
	EKLER.....	60
	ÖZGEÇMİŞ.....	61

ÖZET

Bu çalışmada fermentatif protein kaynakları kullanılarak fibrinolitik proteaz enzimi üreten suşların izolasyonu, identifikasyonu ve optimizasyonu yapılmıştır. İzolasyonu yapılan suşların katı ve sıvı enzim üretim ortamlarında yapılan analizler ile proteaz aktivitesi belirlenmiş ve en yüksek aktivite gösteren suş seçilmiştir. Elde edilen suş fibrin plate ve kanlı agar üzerinde incelenmiş ve yüksek aktivite gösterenler belirlenmiştir. Seçilen suş 16S rRNA analizi ile tanımlanmıştır. Seçilen suşun maksimum fibrinolitik proteaz enzim üretimi 60 °C ve pH 7,0'de görülmüştür. Enzim üretimi için kullanılan farklı kültür koşullarında, en iyi karbon kaynağının fruktoz, en iyi azot kaynağının ise maya özütü ve pepton olduğu görülmüştür. MgSO₄, CaCl₂, KH₂PO₄ bileşenlerinin enzim üretimine olumsuz etki gösterdiği görülmüş ve MnCl₂, ZnC₄H₆O₄ elementlerinin ise pozitif etki oluşturduğu gözlenmiştir. Enzim üretiminde kullanılacak optimum besiyeri bileşimi 0,5 g/l ZnC₄H₆O₄, 0,5 g/l MnCl₂, 14,22 g/l pepton, 11,190 g/l maya özütü, 14,22 g/l fruktoz olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Suş izolasyonu, Proteaz, Fibrinolitik enzim

SUMMARY

Fibrinolytic Enzyme Production

In this study isolation, identification and optimisation of protease enzyme producing strains from fermentative protein resources was investigated. The protease enzyme activity of the isolated strains was determined by analyses performed on solid and liquid enzyme production media and the strain with the highest activity was selected. The obtained strain examined on the fibrin plate and blood agar and was selected having the highest activity. The selected strain was identified by 16S rRNA analysis. The maximum fibrinolytic enzyme production of the selected strains was observed at 60 °C and pH 7,0. In the different culture conditions used for enzyme production, it has been found that the best carbon source is fructose and the best nitrogen sources are yeast extract and pepton. MgSO_4 , CaCl_2 and KH_2PO_4 components were found to have a negative effect on the enzyme production and MnCl_2 , $\text{ZnC}_4\text{H}_6\text{O}_4$ elements had a positive effect. The optimum nutrient composition to be used in enzyme production was determined as 0,5 g/L $\text{ZnC}_4\text{H}_6\text{O}_4$, 0,5 g/L MnCl_2 , 14,22 g/L peptone, 11,190 g/L yeast extract, 14,22 g/L fructose.

Key words: Strain isolation, Protease, Fibrinolytic enzyme

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1	Enzim kısımlarının gösterimi.	2
Şekil 1.2.	Serin proteaz katalitik reaksiyonu.....	6
Şekil 1.3.	Aspartik proteaz enzimi etki mekanizması	7
Şekil 1.4.	Sistein proteazlar katalitik etki mekanizması.	8
Şekil 1.5.	Metalloproteazların katalitik etki mekanizması.....	9
Şekil 1.6.	Streptokinaz ve alteplazın karşılaştırılması.....	14
Şekil 1.7.	Fibrinolitik ilaçlar ile plasminojenin aktivasyonu.	144
Şekil 1.8.	Alteplaz ve plasebonun hastalar üzerindeki etkileri.....	16
Şekil 1.9.	Streptokinazın etki mekanizması.	166
Şekil 3.1.	Skim milk katı besiyerinde suşların oluşturduğu açıklıklar	344
Şekil 3.2.	Kanlı agar besiyerinde ton balığından elde edilen suşun oluşturduğu açıklığın görünümü	35
Şekil 3.3.	Fibrin plate katı besiyerinde suşların oluşturduğu açıklıkların görünümü.....	36
Şekil 3.4	Filogenetik Ağaç.....	37
Şekil 3.5.	Farklı karbon kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine oluşturduğu etkiler	38
Şekil 3.6.	Farklı azot kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine oluşturduğu etkiler.....	38
Şekil 3.7.	Farklı kombine azot kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine oluşturduğu etkiler	400
Şekil 3.8.	İz elementlerin enzim aktivitesi üzerine oluşturduğu etkiler	41
Şekil 3.9.	Fruktoz ve maya özütü konsantrasyonuna göre proteaz aktivitesinin zamanla değişimi ...	45
Şekil 3.10.	Pepton ve maya özütü konsantrasyonuna göre proteaz aktivitesinin zamanla değişimi.	455
Şekil 3.11.	Fruktoz ve pepton konsantrasyonuna göre proteaz aktivitesinin zamanla değişimi	46
Şekil 3.12.	Farklı sıcaklıklarda ölçülen enzim aktivite değerleri	47
Şekil 3.13.	Farklı pH değerlerinde ölçülen enzim aktivite değerleri	48
Şekil 3.14.	Mikroorganizmaya ait büyüme eğrisi.....	4949
Şekil 3.15.	Proteaz enziminin kazein substratıyla elde edilen Lineweaver-Burk Grafiği	500
Şekil E.1.	Tirozin Standart Grafiği	602

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1.1. Proteazların sınıflandırılması	4
Tablo 1.2. Katalitik mekanizmalarına göre proteazların gruplandırılması.....	5
Tablo 2.1. Tirozin standart eğrisi hazırlanırken kullanılan çözeltilerin bileşimleri	29
Tablo 2.2. Merkezi Kompozit Dizaynına göre deneysel matris.....	31
Tablo 2.3. Farklı pH değerleri incelenirken kullanılan tamponlar	312
Tablo 2.4 Enzim kinetik parametreleri belirlenirken kullanılan çözeltiler.....	32
Tablo 3.1. Besiyeri bileşiminin etkisinin incelendiği MKD tasarımı ve sonuçları	42
Tablo 3.2. Deneysel sonuçların model eşitliklerine uyumunun istatistiksel özeti	42
Tablo 3.3. Bağımlı ve bağımsız değişkenlerin uygunluğunun istatistiksel verileri	433
Tablo 3.4. Besiyeri bileşenleri için önerilmiş modelin ANOVA test sonuçları.....	433

KISALTMALAR DİZİNİ

CVD	: Kardiyovasküler hastalıklar
LB	: Luria Bertani besiyeri
NCBI	: (National Central for Biotech Information) Ulusal biyoteknoloji bilgi merkezi
PEG	: Polietilen glikol
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florür
TCA	: Trikloroasetik asit
Rpm	: Revolutions per minute (dakikadaki dönüş sayısı)
sp.	:Tür
MKD	: Merkezi Kompozit Dizayn Yöntemi
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
PMSF	: Fenil metil sülfonil florür
DMAEMA	: Dimetil etil metakrilat
PEG	: Polietilen glikol
MALDI TOF MS	: Kütle Spektrometresi

1.GİRİŞ

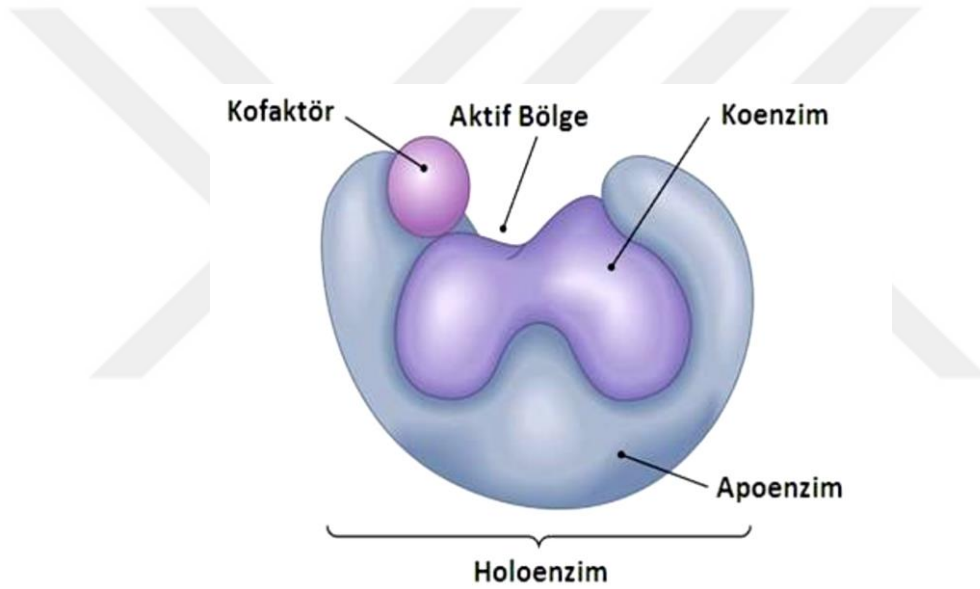
Mikroorganizmaların sıra dışı özellikleri ve enzimlerin sahip olduğu büyük çeşitlilik, etkinlik ve spesifiklik ticari uygulamalarda uygunluğu ve üstün ürün özellikleri sebebiyle mikrobiyal enzimler bir altın madeni niteliğindedir. Terapötik enzimler bu ürünlerin en iyi örneğidir. Özellikle *Bacillus* türü fibrinolitik enzim içermesi sebebiyle önemli endüstriyel türlerden biridir. Bazı enzimlerin biyokimyasal karakterizasyonu trombolitik ilaçların gelişimi için bir kilit rolündedir (Narasaki ve ark. 2005). Fibrinolitik enzimlerin üretimi için besin kaynaklarından izole edilerek kullanılan mikroorganizmaların bazı biyolojik avantajları, ilaç endüstrisinde tercih sebebidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda mikrobiyal kaynaklardan bazı direkt etkili fibrinolitik enzimler saflaştırılmış ve biyokimyasal özellikleri karakterize edilmiştir (Xiao-Lan ve ark. 2005). Buna rağmen bu enzimlerin bazıları *in vivo* uygulamalarda toksisite göstermiştir. Farmasotik özellikleri ve terapötik özellikleri de (antikoagülant ve trombolitik) ticari ilaçlarla kıyaslanmıştır. Bunun ötesinde bu enzimlerin çoğunun antikoagülan mekanizması yeteri kadar detaylı olarak çalışılmamıştır.

1.1.Enzimler

Enzimler, vücut içinde gerçekleşen biyokimyasal olayları düzenleyen, hızlandıran ve genel olarak protein yapısında olan makromoleküler yapılar olarak tanımlanmaktadır. Enzimler biyolojik sistemlerdeki olayları katalizleyerek reaksiyonların çok hızlı gerçekleşmesini sağlar. Enzimler reaksiyonları düzenler, molekülleri birleştirir, hücreler arası transferi sağlar, solunum, boşaltım gibi birçok biyolojik olayı düzenler bu sebeple enzimler insan sağlığı için oldukça önemlidir (Patel ve ark. 2005).

Enzimler gıda, tekstil, temizlik gibi birçok endüstriyel ürünün üretiminde ve yapısında bulunmaktadır. Bu alanların yanısıra özellikle ilaç sanayisinde kullanımı oldukça yaygındır. Endüstriyel enzimlerin toplam pazarı 2016 yılında 4,75 milyar dolar seviyesine ulaşmıştır ve 2018-2023 periyodunda bu değerin yıllık % 6,03 büyüme oranıyla artacağı tahmin edilmektedir (Url-1, 2017). Pazardaki enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbohidrolazlar, %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Proteazlar deterjan, süt, et, ilaç, bira vb. endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır (Patel ve ark. 2005).

Enzimlerin üç boyutlu protein yapısı etki edeceği maddeyi belirler. Enzimdeki protein yapıdaki bölüme apoenzim denir. Enzimler katalitik etki gösterebilmek için apoenzim dışında bir koenzim kısma ihtiyaç duyar. Bu koenzim kısım genellikle metal iyonu veya protein olmayan organik bir yapıdır. Bu yapıya kofaktör veya prostetik grup denir. Enzimlerin aktif olmayan protein yapıdaki ilk haline "Preenzim", "Proenzim" veya "Zimojen" de denilmektedir. Apoenzim, protein yapısında olan enzimin spesifikliğini yani özel bir reaksiyonu katalizlemesini ve farklı reaksiyonlarda görev yapmasını belirler. Koenzim ve kofaktör ise enzimdeki yardımcı bölümdür. Apoenzim ve koenzim kompleks yapısına tam enzim anlamına gelen “haloenzim” denir (Patel ve ark. 2005). Enzimlerin bu kısımları Şekil 1.1’de gösterilmiştir.



Şekil 1.1 Enzim kısımlarının gösterimi (Holde 2006)

Enzimin özel olarak etki ettiği maddeye “substrat” denir. Enzimler, substratlar üzerindeki kimyasal olayları katalizleyerek reaksiyonu hızlandırır. Enzim-substrat reaksiyonu sonucu oluşan maddeye ürün adı verilir.

Uluslararası Biyokimya Derneğinin Enzim Komisyonunca kabul edilen esaslara göre enzimler altı büyük sınıfa ayrılmaktadır. Enzimler katalizledikleri tepkimelere göre (Rao ve ark. 1998);

- Oksidoredüktazlar (Oksidasyon redüksiyon reaksiyonlarını katalize eden enzimler),
- Transferazlar (Fonksiyonel grup transferi reaksiyonlarını katalize eden enzimler),

- Hidrolazlar (Hidrolitik reaksiyonları katalize eden enzimler),
- Liyazlar (Hidroliz ve yükseltgenme harici yollarla çeşitli kimyasal bağları kırabilen, çoğu zaman bunu yeni bir çift bağ veya halka yapısı oluşturarak gerçekleştiren enzimler),
- İzomerazlar (İzomerizasyon reaksiyonlarını katalize eden enzimler),
- Ligazlar (Sentetazlar) (ATP veya diğer fosfatlardan yararlanarak, bunlardaki pirofosfat bağının parçalanması sonucu iki molekül arasındaki yeni bağların meydana gelmesine olanak sağlayan enzimler) olarak sınıflandırılmaktadır (Patel ve ark. 2005).

1.2. Proteazlar

Proteazlar, proteoliz olarak adlandırılan bir süreçte, peptid ve proteinlerin aminoasitlerinin arasındaki amid bağlarının hidrolizini katalizleyerek canlılarda çok sayıda reaksiyonda rol oynarlar (Wolfe 2009). Proteazlar; proteinlerin büyüklüklerinin kontrolü, kompozisyonları, biçimleri, döngüleri ve en son yok edilmeleri için gerekli olan bir süreçte rol oynarlar. Proteinlerin dönüşümünü, sentezini ve aktivasyonunu kontrol ederek fizyolojik süreçleri düzenlerler. Gebeliğin başlaması, doğum, sindirim, gelişme, olgunlaşma, yaşlanma ve hatta organizmaların ölümünde de düzenleyici rol oynarlar (Shen ve Chou 2009).

Proteazlar sahip oldukları pH değerlerine göre asidik, nötral ve alkaline olmak üzere üç sınıfa ayrılırlar. Bunlar arasında alkaline proteazlar biyoteknolojide ve endüstriyel uygulamalarda en çok tercih edilenlerdir. Alkaline proteazlar çamaşır deterjanlarında, tekstil, gıda işlemlerinde, ilaç kimyasında, deri, kâğıt, kâğıt hamuru endüstrisinde, süt endüstrisinde, organik sentez işlemlerinde ve atık su işlemlerinde geniş bir uygulama alanına sahiptirler. Alkaline proteazlar yaygın bir şekilde deterjan katkı maddesi olarak kullanılmalarının yanında toplam proteaz satışının %89'unu oluşturmaktadırlar. Endüstriyel olarak uygun proteazları üreten mikroorganizmalar büyük bir öneme sahip olmalarının getirdiği yüksek ticari ilgiden dolayı, bu mikroorganizmaların çok çeşitli habitatlardan elde edilmesi birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Proteazların endüstriyel alanda kullanımından itibaren özellikle alkaline proteazların gelecek yıllarda büyük gelişme göstermeleri beklenmektedir (Rai ve Mukherjee 2010).

1.2.1. Proteazların Sınıflandırılması

Proteaz enzimi; kaynaklarına, katalitik aktivitelerine ve reaksiyonlardaki aktif bölgelerine göre üç temel gruba ayrılır. Proteazların sınıflandırılması Tablo 1.1’de verilmiştir.

Proteaz enzimi katalizlediği reaksiyonlara göre endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar olarak iki grupta incelenir. Ekzopeptidazlar substrata etki ettiği uca göre amino ve karboksi olarak sınıflandırılır. Endopeptidazlar ise substrattaki peptit zincirini iç taraftan ayırmaktadır. Ekzopeptidazların aktivitesini, polipeptit yapıdaki spesifik aminoasitler, ayrılan peptit bağının yakınında bulunan polipeptit yapının konformasyonu ve peptitin uzunluğu belirlemektedir (URL-1 2017).

Tablo 1.1. Proteazların sınıflandırılması (Raksakulthai ve Haard 2003).

Proteaz	E.C.
Ekzopeptidaz	
Aminopeptidaz	3.4.11
Dipeptidilpeptidaz	3.4.14
Tripeptidilpeptidaz	3.4.14
Karboksipeptidaz	3.4.16-3.4.18
Serin Proteaz	3.4.16
Metallo proteaz	3.4.17
Sistein proteaz	3.4.18
Peptidil dipeptidaz	3.4.15
Dipeptidaz	3.4.13
Omega peptidaz	3.4.19
Endopeptidaz	3.4.21-3.4.24
Serin proteaz	3.4.21
Sistein proteaz	3.4.22
Aspartik proteaz	3.4.23
Metallo proteaz	3.4.24

Amino peptidazlar; polipeptit yapının amino ucunu hidroliz eder ve bir aminoasit, dipeptit veya tripeptit yapıyı ayırır. Aminopeptidaz enzimi fungus ve bakteri türleri tarafından üretilir. Genellikle hücre içi salgılanan bir enzimdir. Bakteri ve fungus aminopeptidazların aktiviteleri farklılık gösterebilir. Aminopeptidazların bakteri kaynağına

göre farklı moleküler kütlelerde, optimum pH aralıkları ve duyarlılık gösterdikleri iyonlar farklı olabilir (Raksakulthai ve Haard 2003).

Karboksiptidazlar, polipeptit yapıdaki serbest karboksi ucundan hidroliz reaksiyonu gerçekleştirir. Karboksiptidazlar; serin, metallo, sistein, dipeptidilpeptidaz ve dipeptidaz olarak alt sınıflara ayrılmıştır. Serin karboksiptidazlar aktif bölgelerinde Serin, aspartat, histidin aminoasitleri bulundurulur. Metalloproteazlar ise kofaktör olarak bağlı çinko atomu bulundurulur (Raksakulthai ve Haard 2003).

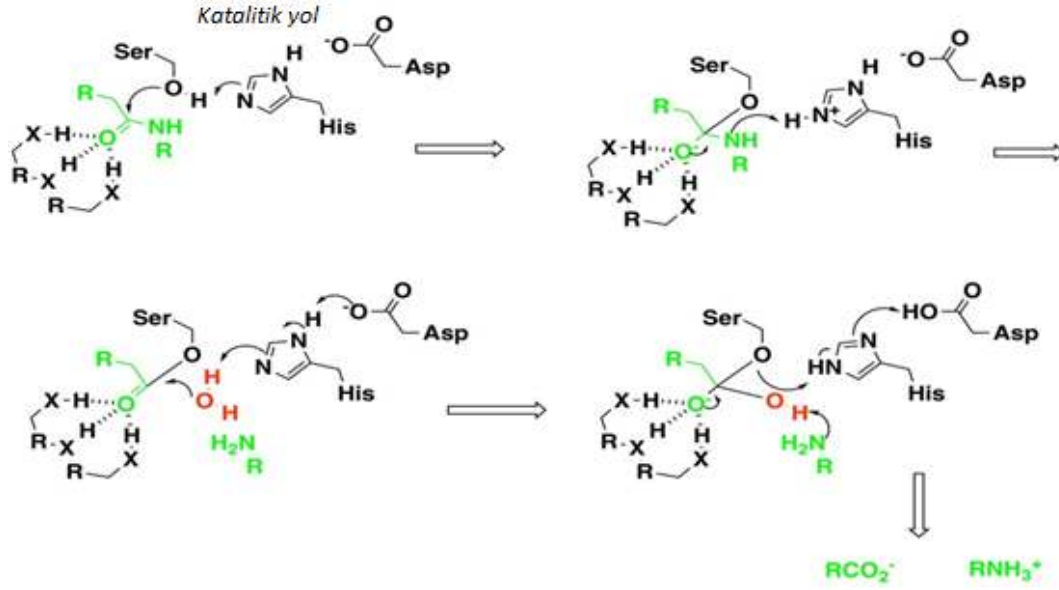
Endopeptidazlar polipeptit yapısındaki belirli peptit bağlarını hidrolize ederler. Katalitik mekanizmalarına göre; metalloproteazlar, aspartat proteazlar, sistein proteazlar ve serin proteazlar olarak sınıflandırılmaktadır (Raksakulthai ve Haard 2003). Katalitik etki mekanizmalarına göre proteazların gruplandırılması Tablo 1.2’de gösterilmiştir.

Tablo 1.2.Katalitik mekanizmalarına göre proteazların gruplandırılması (Raksakulthai ve Haard 2003).

Sınıf	Katalitik Bölüm	Örnek
Serin	Ser, His, Asp	Kimotripsin, Proteinaz, Tripsin, Trombin
Sistein	Sis, His	Katepsin, B,L,S
Aspartik	Asp	Pepsin HIV proteaz, renin
Metallo	Zn	Anjiyotensin, MMP-2, MMP-9

1.2.1.1. Serin Proteazlar

Serin proteazlar, genel olarak 7-11 pH aralığında değişen nötr ve alkali pH’larda aktivite göstermektedir. Genellikle geniş substrat özgüllüğüne sahip olan serin proteazlar, moleküler ağırlıkları 18-35 kDa arasında olan düşük molekül ağırlıklı enzimlerdir. Serin proteazların katalitik reaksiyon mekanizması Şekil 1.2’de gösterilmiştir.

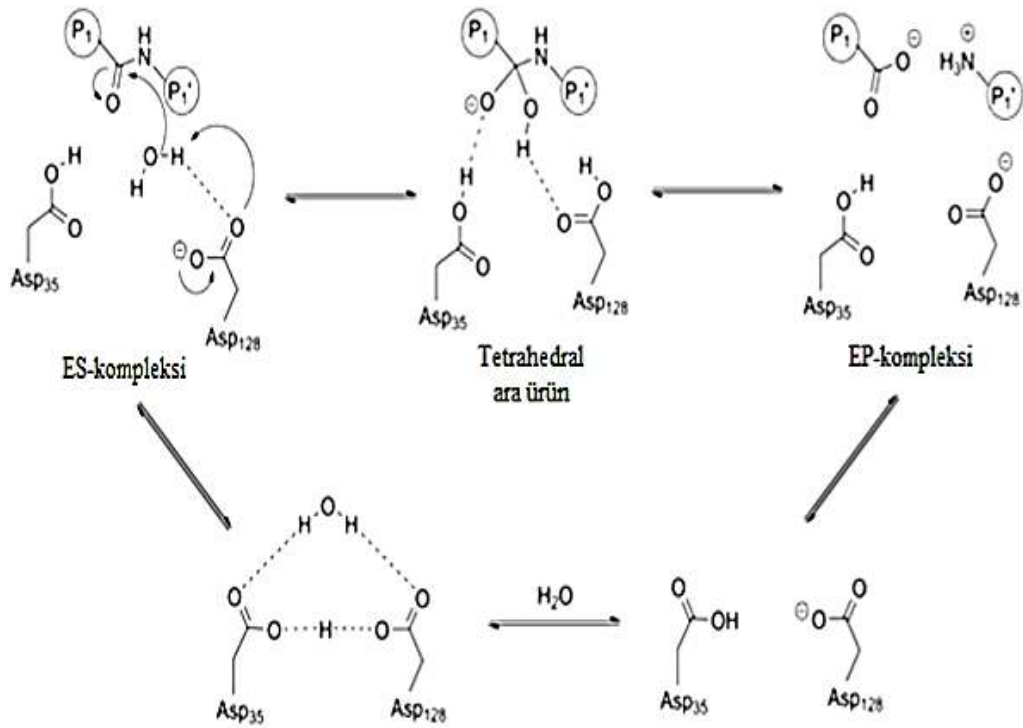


Şekil 1.2. Serin proteaz katalitik reaksiyonu (Bugg 2009)

Serin proteazlar; kanın pıhtılaşmasında, sindirim olaylarında, peptit yapıların yıkılmasında en sık kullanılan proteolitik enzimlerdir. Kan pıhtıları damar içinde inaktif formda fibrinojen şeklinde bulunurlar. Fibrinojen yapı ise fibrini oluşturan bir proteindir. Serin proteaz yapısında olan trombin enzimi fibrinojen içindeki peptit bağlarını yıkarak aktif fibrin yapıyı oluşturur. Aynı zamanda bu enzimler kanın damar içindeki hemostatik dengesinin sağlanmasından da sorumludur (Kato ve ark. 1992).

1.2.1.2. Aspartik Proteazlar

Endopeptit ailesinden olan aspartik proteazlar, substrattaki spesifik peptit bağına etki ederek proteolitik özellik gösterir. Aspartik proteaz enzimi reaksiyon bölgesinde yer alan ve reaksiyonu gerçekleştiren iki tane aspartil kalıntısı ile karakterize edilmektedir. Aspartik proteazlar genellikle 3-4 pH aralığında optimum aktivite göstermektedir ve moleküler ağırlıkları 30-45 kDa arasında değişmektedir. Aspartik proteaz enzimi etki mekanizması Şekil 1.3’de verilmiştir.

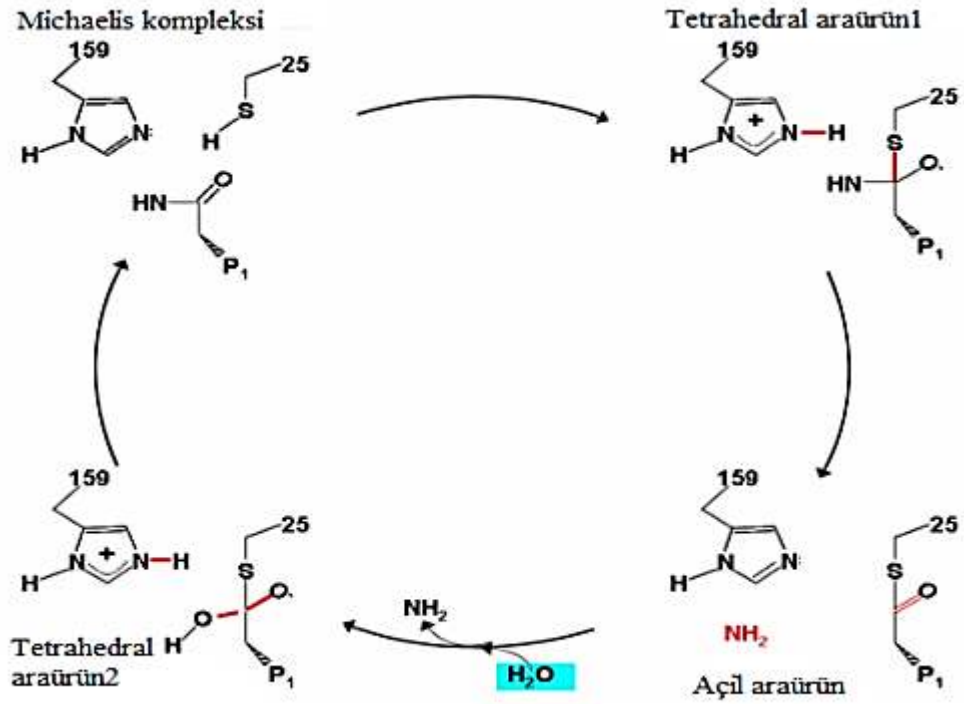


Şekil 1.3. Aspartik proteaz enzimi etki mekanizması (Bugg 2009).

1.2.1.3. Sistein Proteazlar

Sistein proteazlar ökaryotik ve prokaryotik hücreler tarafından üretilmektedir. Papaine benzeyen sistein proteazlar, tripsin benzeri tiyol proteazlar, glutamik aside özel ve diğer tipteki tiyol proteazlar olmak üzere dörde ayrılırlar. En iyi bilinen sistein proteazlar papain benzeri endoproteazlardır (Genckal ve Tari 2006).

Sistein proteazlar, aktif merkezlerindeki aspartik asit, histidin ve sisteinden oluşan katalitik bir yapıya sahiptir. Sistein proteazlar, aktif merkezindeki tiyol grubu, ağır metal iyonları ve okside edici ajanlarla inhibe edildiğinden önemli bir enzim grubunu oluşturmaktadır. Sistein proteaz enziminin katalitik etki reaksiyonu Şekil 1.4’de gösterildiği gibidir.



Şekil 1.4. Sistein proteazlar katalitik etki mekanizması (Bugg 2009)

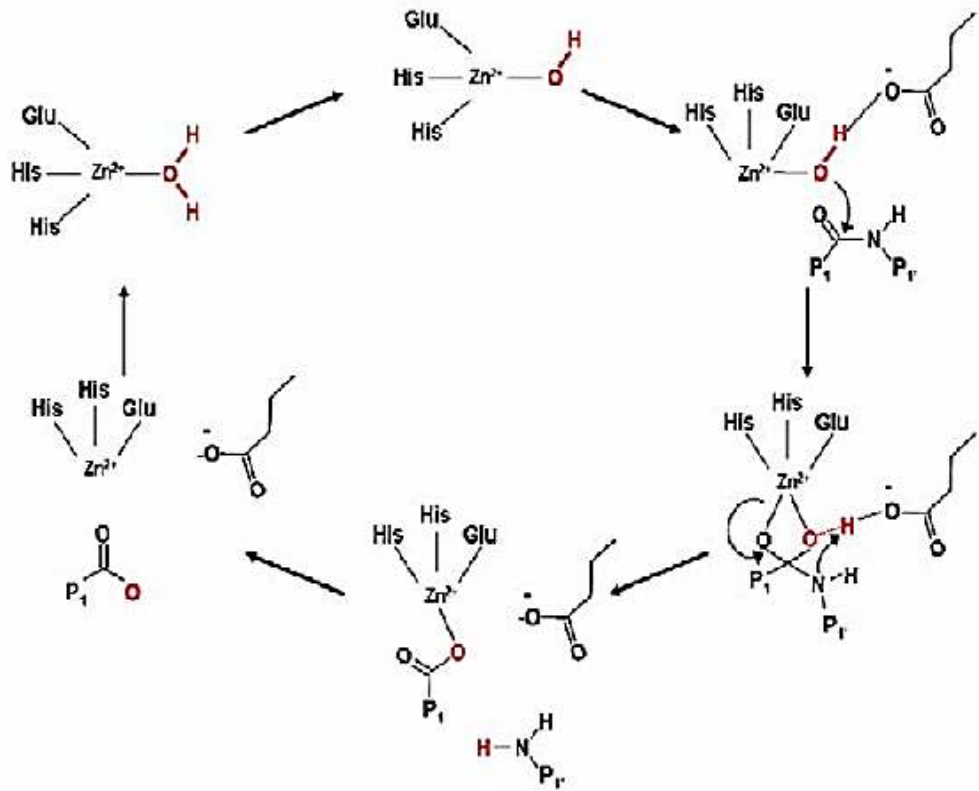
Sistein proteazlar, nötral pH’larda optimum aktivite göstermektedir. Sistein proteazlar moleküler ağırlıkları 20-30 kDa civarında olan küçük moleküllerdir. Sadece katepsin C oligomerik enzim olup moleküler ağırlığı 200 kDa’nın üstündedir (Dubey ve ark., 2007).

1.2.1.4. Metalloproteazlar

Metalloproteazlar mantar, bakteri ve yüksek yapıli organizmalarda bulunan bir proteaz türüdür. Metalloproteazlar ortamda iki değerklikli metalik iyon varlığında aktivite göstermektedir ve genellikle yapısında çinko (Zn) bulundurmaktadır. Farklı durumlarda nikel (Ni), kobalt (Co) gibi metalik iyon varlığında da aktivite gösterebilmektedirler (Wood 2004).

Metalloproteazlar EDTA(etilendiamin tetra asetik asit) varlığında ve diyaliz ile inaktif olabilirler. Enzim aktivitesi için çinko iyonu şarttır, kalsiyum iyonu ise protein yapının kararlı olması için gereklidir. Optimum aktivite gösterdikleri pH değerkleri 5-9 aralığındadır. Metalloproteazların katalitik etki mekanizması Şekil 1.5’de gösterilmiştir.

Günümüzde 30 adet metalloproteaz türü bulunup bunların 17 tanesi endopeptidaz, 12 tanesi ekzopeptidaz ve bir tanesi hem endo hem ekzopeptidazdır. Metalloproteazlar alkali, nötral ve mikrobakter I-II olarak 4 grupta incelenirler. Nötral metalloproteazlar genellikle hidrofobik aminoasitlere özgülken, alkalın metalloproteazların etki alanı daha geniştir (Rao ve ark. 1998).



Şekil 1.5. Metalloproteazların katalitik etki mekanizması (Bugg 2009).

1.2.2. Proteazların Endüstriyel Kullanımı

Endüstriyel enzimler içinde proteazlar önemli bir paya sahiptir. Başta deterjan olmak üzere ilaç, et, süt, deri, fotoğrafçılık ve içki sanayisinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Endüstriyel alanda kullanılan alkalın proteazlar fungus, bakteri ve böceklerden elde edilmektedir. Bu enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanılabilirliğini belirleyen bazı faktörler vardır ve daha önce funguslar üzerine yapılan çalışmalarda bunların türlere göre farklılık gösterdiği saptanmıştır.

Son zamanlarda ters osmoz ve ultrafiltrasyon gibi membran proseslerinin kullanımı, atık arıtım, meşrubat ve süt endüstrilerinde büyük önem kazanmıştır. Bu proseslerde karşılaşılan temel sorun; membran proseslerindeki akış hızının azalması ve membranda yapılan temizlik maliyetinin artmasıdır. Bu aşamada enzim kullanımı ile membranlar temizlenebilse de kullanılan mezofilik tabanlı organizmalardan elde edilen enzimler deterjanlarla inaktif olmakta ve dar pH aralığında aktivite gösterdikleri için istenen verim alınamamaktadır. Bu sebeple deterjanlarla aktivitesi bozulmayan ve alkali ortamlarda aktivite gösteren proteaz enziminin kullanımı büyük fayda sağlayacaktır. Peynir ve süt ürünlerinin yapımında laktik asit bakterileri önemli bir mikroorganizma grubunu oluşturur. Bu bakterilerin görevi sütte yer alan kazeinin peptit bağlarını kırarak kazeinin pıhtılaşmasını ve böylece peynirin oluşmasını sağlamaktır. Laktik asit bakterileri, peynir üretimi esnasında sütün asitlenmesini ve peynirin oluşumunu sağlar. Laktik asit bakterileri bu işlevleri yaparken proteolitik aktivite etkilidir. Protein tabanlı olan tırnak, saç, tüy ve boynuz gibi yapılar atık olarak doğada fazla miktarda bulunur. Proteaz enzimi kullanımıyla bu atıklar kullanılabilir hale getirilebilirler. Diğer bir yöntemse buradaki protein içerikli atıkların proteaz enziminin gösterdiği proteolitik aktivite ile giderimidir. Kümes atıklarının gideriminde de bu yöntem kullanılabilmektedir (Gupta ve ark. 2003).

Fotoğrafçılık sektöründe de alkali proteazlar kullanılmaktadır. Fotoğraf filmleri üzerinde bulunan gümüşün geri kazanımında bu enzimlerden faydalanılmaktadır. Bu yöntemle gümüşün geri dönüşümü daha çevreci bir uygulamayla sağlanabilir. Deri endüstrisinde proteaz enzim kullanımı, derilerin daha pürüzsüz yüzeye sahip olmasını sağlamaktadır. Bu aşamada, geleneksel yöntem olarak kullanılan kireçleme ve sodyum sülfite ile işlenme pahalı ve çevreye zarar verdiğinden, günümüzde dericilik sektöründe enzimlerin kullanımı tercih edilmektedir. Enzimler aracılığıyla deri üzerinde istenmeyen pigmentlerin, kılların ve tüylerin giderimi sağlanmakta buna bağlı olarak daha düzgün ve kullanışlı bir yüzey elde edilmektedir. Deterjanlarda proteaz enziminin kullanımının en temel etkeni alkali pH aralıklarında aktivite göstermeleridir. Deterjanların içerisinde proteaz, lipaz, amilaz gibi enzimler kullanılmaktadır. Bu enzimlerin kullanımı sayesinde protein içerikli lekelerle birlikte karbonhidrat ve nişasta tabanlı lekelerde çıkmaktadır. Enzimlerin deterjan içinde katkı maddesi olarak kullanımını sağlayan başlıca etkenler; alkali pH aralıklarında çalışması ve deterjan içeriğine uyumlu olmasıdır. Bunlara ek olarak deterjanlarda daha iyi temizleme etkisi ve düşük maliyetle olması sebebiyle enzimler deterjan endüstrisinde yaygın olarak

kullanılmaktadır. Deterjanlarda en yaygın kullanılan proteazlar *Bacillus* proteazlardır (Anwar ve Saleemuddin 1998).

1.2.3. Proteaz Enziminin Medikal Alanlarda Kullanımının Tarihçesi

Enzimler vücut içinde meydana gelen sayısız biyokimyasal olayın katalizlenmesinden sorumludur. Uzun yıllardan beri proteaz enziminin kullanımı, fonksiyonel özelliklere sahip olması sebebiyle devam etmektedir. Bu çalışmaların sonunda klinik enzimolojinin bir alanı olan pankreatik enzimlerin medikal kullanımı üzerine odaklanılmıştır. Pankreatik enzimler, ilk uygulamalarında ham enzim şeklinde kullanılsa da ilerleyen teknoloji ile saflaştırılmış formları kullanılmaya başlanmıştır (Scheindlin 2007).

Hayvanlar, bitkiler, bakteriler ve mantarlardan elde edilen enzimlerin terapötik amaçlı kullanımı eski zamanlara dayanmaktadır (kanser, yangı, yara, vb.). Afrika, Amerika, Asya, Avrupa, Avustralya gibi ülkelerde eski zamanlarda bu enzimler geleneksel tedavi yöntemi olarak kullanılmıştır. Proteazların tedavide kullanımı bitkilerden elde edilen enzimlerin hastalıklar üzerinde kullanımı ile başlamıştır. Enzimatik tedavi yöntemleri, karşı çıkanlar olmasına rağmen genel tıbbi tedaviler içinde önemli bir yere sahiptir (Solorazano del Rio 1994).

John Beard 1900'lu yılların başlarında proteaz enzim ekstraktını pankreastan elde edip damar içi ve tümör içine enjekte ederek kullanmıştır. Yapılan bu çalışmayla doku içinde oluşan tümörün gelişimi durmuştur (Aytekin 2016). Beard kullandığı enzimlerin stabilitesini sağlama konusunda problem yaşamıştır. Bu alanda çalışma yapan Max Wolf enzim stabilitesi konusunda bazı çalışmalar yapmıştır. Enzim optimizasyonu ise uzun süren çalışmalar sonrasında Max Wolf ve Helen Benitez tarafından yapılmıştır. Yine bu çalışmaların devamında Wolf ve Benitez enzimlerin sinerjistik kombinasyonlarını kullanarak akut ve kronik enfeksiyonların, ödem ve diğer enfeksiyonların tedavisinde uygun kullanımı ortaya konmuştur. Wolf ve Benitez tarafında hazırlanıp satışa sunulan “Wobenzym” adlı enzim preparatları mevcuttur (Scheindlin 2007). Max Wolf tarafından başlatılan enzim çalışmaları günümüzde de devam etmektedir. Avrupa da yapılan klinik çalışmalarda proteazın tek başına ve farklı enzim kombinasyonlarıyla kullanımları üzerine çalışmalar yapılmakta olup, antibiyotik kombinasyonları üzerine çalışılmaktadır. Bu çalışmalarda enzimlerin antibiyotik etkinliğini arttırdığı gözlenmiştir (Aytekin 2016).

1.2.4. Proteaz Enziminin Kullanıldığı Hastalıklar

Proteolitik enzimler, tıbbi obstetri ve jinekolojide; kronik ürogenital enfeksiyonlar, abortuslar, reproduktif bozukluklar, endometriozis, jinekolojik cerrahi, genital enfeksiyonlarda immünomodülasyon, meme kanseri, infertilite, mastopatiler ve mastitislerin tedavisinde kullanılmaktadır. Proteolitik enzimlerin insanlarda mastitis tedavisinde kullanılmasıyla ilgili çalışmalar bildirilmiştir (Storozhuk ve ark. 1985). Ayrıca, proteolitik enzimlerin; ankiloz, spondilit, adneksitis, arteriyosklerozis, kemik kırıkları, kronik yaralar, dental cerrahi, kolorektal kanser, endometriozis, glomerulonefritis, gastrik ülser, hematom-ezik, varicella zoster (Herpes zoster), ürogenital sistem enfeksiyonları, karaciğer yangısı, meme cerrahisini müteakip lenf ödem, mastodina-fibrokistik mastopati, yaralanmalar, cerrahi yaralar, meme kanseri, multiple myelom, multiple skleroz, osteoarthritis, otitis, prostatitis, tonsillitis, radyoterapinin yan etkileri, sinüzitis, romatoid arthritis, trombozis ve post-trombolitik sendrom vakalarının tedavisinde faydalı olduğu güncel bilimsel tıbbi çalışmalarda ifade edilmektedir (Desser, 2007).

1.2.5. Tedavide Kullanılan Proteazlar

Pankreasta bulunan ekzokrin hücreleri kimotripsin, tripsin, lipaz, amilaz gibi farklı enzimler salgılamaktadır. Ekzokrin hücrelerinde oluşan hasar sonucu pankreatik salgının azaldığı durumlarda, tedavi amaçlı eksojen tripsin enzimi kullanılmaktadır. Bu enzim sığır veya domuz pankreasından üretilmektedir. Tripsinin sindirim sistemindeki görevi; ince bağırsaktaki protein yapıları peptit ve aminoasitlere dönüştürmektir. Tripsinin kan pıhtılarını çözme özelliği de bulunmaktadır (Scheindlin 2007).

Tedavi amaçlı kullanılan bir diğer enzim de Serrapeptidaz enzimidir. İpek böceğinin bağırsağında yer alan *Serratia e15* bakterisi tarafından sentezlenir. Serrapeptidaz enzimi kan pıhtılarının, ölü dokuların, kistlerin ve plakların uzaklaştırılmasını sağlar. İnflamasyonun iyileştirmesinde de etkili olduğu gözlenmiştir (Scheindlin 2007).

Nattokinaz enzimi ise *Bacillus subtilis*' ten saflaştırılmaktadır. Bu enzim yüksek fibrinolitik aktivite gösteren bir enzimdir. Tromboz hastalarında tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Scheindlin 2007).

Bromelain enzimi ise tropikal ananas meyvesinden elde edilen bir enzimdir. Bromelain enzimi ananasın en fazla kök kısmında bulunmaktadır ve ananasın toplanmaya hazır olduğu

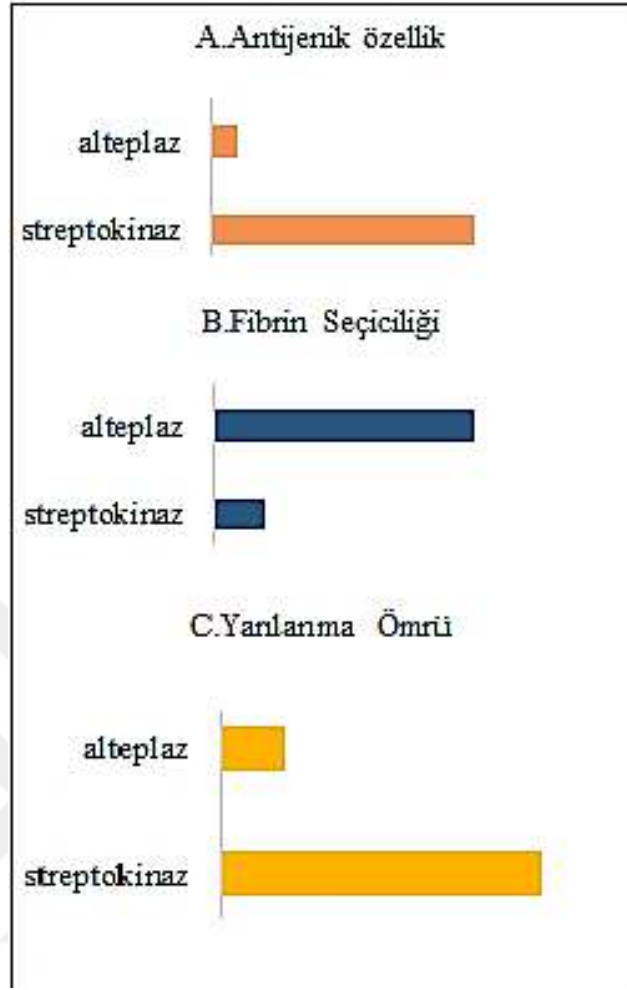
olgunlaşma döneminde elde edilir. Sindirim sistemi bozukluklarında tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Scheindlin 2007).

Papain enzimi ise papaya meyvesinin lateksindeki öz suyun pıhtısından elde edilmektedir. Bu maddenin ekstraksiyonu ile toz ve sıvı olmak üzere farklı formlarda saf papain oluşmaktadır. Sindirim sistemi bozukluklarında, yaralanmalarda ve alerjik tedavilerde kullanılmaktadır (Scheindlin 2007).

1.2.6. Trombolitik ilaçlar

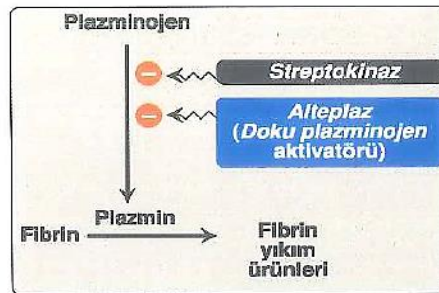
Damar duvarına yapışan kan kitlesine trombüs; duvar içinde yüzen kan pıhtılarına ise emboli denir. Damar içinde oluşan pıhtı dokuların kanlanmasına ve diğer dokuların besinsiz ve oksijensiz kalmasına neden olur. Arteriyel tromboz ve venöz tromboz olarak ikiye ayrılır. Arteriyel tromboz genellikle trombositlerce zengin bir yapıya sahiptir. Fakat venöz tromboz kan akışını yavaşlatır, pıhtılaşma basamaklarının yanlış aktivasyonu ile tetiklenir ve hemostatik savunma sisteminin bozukluğu sonucu karşımıza çıkar. Venöz tromboz da fibrince zengin bir yapıdadır ve arteriyel tıkaçlarda trombozdan daha az trombosit içerir. Damar içinde oluşan trombüs sonucunda miyokard enfarktüs, felç, derin ven trombozu gibi rahatsızlıklar ortaya çıkar (Turan, 2016).

Akut olarak gelişen tromboz vakalarında hastalar, plazminojenin plazmine dönüşümünü artırarak fibrin yapının parçalanmasıyla tedavi edilir. Bu alanda kullanılmaya başlanan ilk ilaç streptokinaz, tüm vücutta kanama sorunlarına yol açabilecek fibrinolitik etki gösterir. Alteplaz ise fibrin yapı üzerinde daha lokal bir etkiye sahiptir. Sıklıkla kullanılan fibrinolitik ilaçların karşılaştırması Şekil 1.6'da verilmiştir. Klinik deneyler alteplaz ve streptokinaz ilaçların yakın etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Fakat enfarktüs rahatsızlıklarının yaklaşık olarak %20'sinde yarar sağlanamamaktadır. Ve yine yaklaşık %15'inde yeniden tıkanma riski ile karşılaşılmaktadır. Fibrinolitik ilaçlar akut miyokard enfarktüse anjiyoplasti uygulandığında ve acil vakalarda kullanılmaktadır (Turan, 2016).



Şekil 1.6. Streptokinaz ve alteplazın karşılaştırılması (Fallis 2013).

Trombolitik ilaçların etki mekanizması benzer özelliklere sahiptir. Genel çalışma prensipleri plazminojeni plazmine dönüştürerek etki göstermeleridir. Plazmin yapı da doğrudan fibrini parçalamaktadır (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Fibrinolitik ilaçlar ile plasminojenin aktivasyonu (Fallis 2013).

Pulmoner emboli ve derin ven trombozu rahatsızlıklarında kullanılan trombolitik ilaçlar, kanama oluşturma gibi bir yan etkiye sebep olmaları nedeniyle bu rahatsızlıkların tedavisinde ve periferik arter trombozları, miyokart enfarktüs gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanımı gittikçe azalmaktadır. Trombolitik ilaçlar damar içi stent ve kataterin açılmasında da kullanılır.

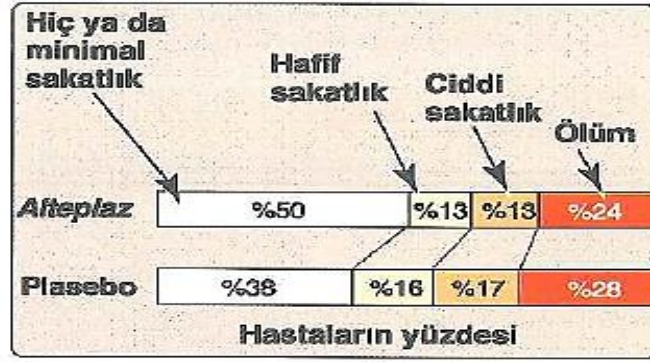
Miyokart enfarktüs rahatsızlığı geçiren hastalarda damar açıklığının yeniden oluşabilmesi için trombolitik ilaçlar damar içine uygulanmaktadır. Miyokart enfarktüsün kateterizasyonla tedavisi rahatsızlık yaşandıktan sonraki 2 ile 6 saat içinde uygulanmamaktadır. Bu sebepten dolayı trombolitik ajanların uygulanması hızlı, pratik ve düşük maliyetli olmaktadır.

Trombolitik ajanlar damar içinde oluşan istenen ve istenmeyen trombüsü ayırt edemediği için olumsuz bir etki oluşturmaktadır. Bu sebeple vücut içinde istenmeyen kanamalar oluşur. Bu ilaçların hamilelikte, yarası olanlarda, serebrovasküler kanama öyküsü olan hastalarda kullanımı risklidir. Trombolitik ajanlar pıhtıyı parçaladıktan sonra artan trombüs konsantrasyonu sebebiyle tekrar pıhtı oluşturma riski vardır (Değer, 2009).

Alteplaz (t-PA): Doku plazminojen aktivatörü olarak bilinen alteplaz, insan hücre kültüründen elde edilmiş bir serin proteazdır. Rekombinant DNA teknolojisi kullanımıyla üretimi yapılmaktadır.

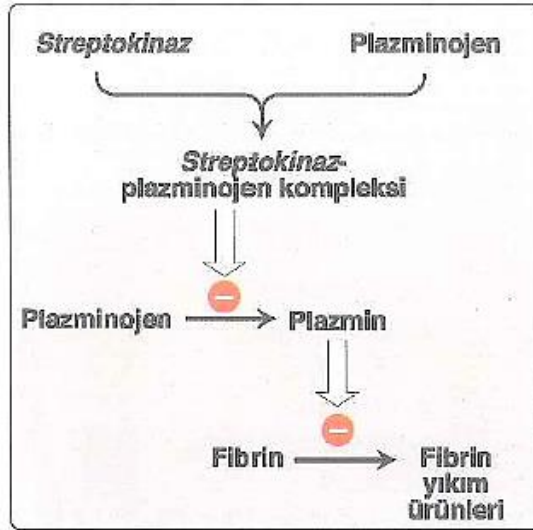
Alteplaz kan dolaşımında bulunan plazminojene düşük afinitesi olmasına rağmen fibrin yapıda bulunan plazminojene spesifitesi yüksektir ve hızlı çözünme sağlar. Bu sebepten dolayı alteplaz “fibrin spesifik” olarak bilinir ve damar içi pıhtı parçalanmasında hızlı etki gösterir. Bu sebepten dolayı alteplaz sadece pıhtı içindeki plazminojene etki edip diğer mevcut sistemde kanama yan etkisi oluşturmadiğı için farklıdır.

Akut iskemik inme, miyokart enfarktüs, pulmoner emboli hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Alteplaz streptokinaza kıyasla daha iyi bir çözücüdür. İskemik inme hastalarında, vakanın yaşanmasından sonraki 3 saat içinde kullanımı tedavi başarısını artırır ve hastanın yaşamsal faaliyetlerini iyileştirir. Serebral ve gastrointestinal sistemlerde kanama komplikasyonu gelişebilir. Alteplaz kullanımı ve plasebo kullanımı durumunda hasta üzerindeki etkileri şekil 1.8’de verilmiştir.



Şekil 1.8. Alteplaz ve plasebonun hastalar üzerindeki etkileri (Fallis 2013).

Streptokinaz: Streptokinaz grup C B-hemofilik streptokok kök hücre kültüründen saflaştırılıp kullanılan bir proteindir. Streptokinazın etki mekanizması şekil 1.9'da gösterilmiştir.



Şekil 1.9. Streptokinazın etki mekanizması (Fallis 2013).

Enzimatik aktivitesi olmayan streptokinaz, plazminojen ile aktif kompleks oluşturup plazminojeni aktif plazmin haline dönüştürmektedir. Plazminojen-streptokinaz kompleksi fibrin yapının parçalanmasıyla birlikte oluşan fibrinojen, faktör 5 ve 7'nin yıkımını da katalizlemektedir (Değer, 2009) .

1.3. Yapılan Çalışmalar

Myokard enfarktüs, felç ve venöz tromboembolik rahatsızlıklar gibi kardiyovasküler hastalıklar dünyada geniş çaplı ölümlere sebep olmaktadır (Choi ve ark. 2013). Yapılan bir araştırmada CVD (kardiyovasküler hastalıkların) gelişmiş ülkelerde arttığı bilgisine ulaşılmıştır (Tibazarwa ve Damasceno 2014). Damarlarda hemostatik dengenin bozulmasıyla damar duvarlarında pıhtı oluşumu gerçekleşir. Pıhtı oluşumu fibrinojen üzerindeki trombinin hidrolitik eyleminin kontrol edilememesiyle gerçekleşir. Bu durum patojenik şartları oluşturarak intravasküler koagülopati olarak adlandırılan rahatsızlığı ortaya çıkarır (Marder ve Novokhatny 2010). İntravasküler koagülopati olarak adlandırılan hastalık, genellikle kardiyovasküler hastalıkların tetiklenmesine sebep olur. İntravasküler koagülopati hastalığı yıllarca damar içi enjeksiyon veya oral olarak kullanılan ve kandaki pıhtıları çözen trombolitik ajanlarla tedavi edilmeye çalışılmıştır (Budzynski ve ark. 1994).

Pahalı fakat etkili olan streptokinaz, ürokinaz ve doku plasminojen faktörü gibi ilaçların ilk olarak kanda inaktif olarak bulunan plazminojeni aktif plazmin haline dönüştürdüğü ve bu plazminde fibrini yıktığı bilinmektedir. Buna rağmen bu ilaçların sebep olduğu yan etkilerde vardır; aşırı kanama, trombozis kalıntıları sebebiyle aynı yerde pıhtının tekrar oluşması, hemoraj ve kusma gibi. Bunun ötesinde intravenöz sistemlerdeki fibrin etrafında düşük spesifite göstermektedir (Kim ve ark. 1996). Diğer yandan plazmin benzeri pıhtı yıkımında direkt etkili nattokinaz, lumbrokinaz ve kimotripsin gibi fibrinolitik enzimler trombinin hızlıca çözer ve kanama, hemoraj risk faktörlerini arttırmaksızın tam bir çözünme sağlar (Mukhametova ve ark. 2002). Plazminde klinik potansiyele sahip direkt etkili fibrinolitik enzim; ilk olarak 1950 yılında trombolitik hastaların tedavilerinde kullanılmıştır. Bundan sonraki yıllarda plazmin benzeri enzimler doğal kaynaklardan sağlanarak daha ucuz, daha etkili, daha spesifik ve güvenli fibrinolitik enzim arayışı ve terapisi araştırılmıştır (Kotb 2013).

Rafaat ve arkadaşları, nişasta ve dimetiloetil metakrilatla (DMAEMA) oluşturulan hidrojel yapıyı λ ışınlama ile sentezlemişlerdir. Bu malzeme fibrinolitik etkiye sahip ekstrasellüler enzim üreten *Bacillus subtilis* 'in izolasyonu için taşıyıcı yüzey olarak kullanılmıştır. Polimerik jel içerisine hapsedilmiş bakteriyel hücrelerin üremesi taramalı mikroskop analiziyle incelenmiştir. Fibrinolitik enzim üretim süresi serbest hücrelerde 120 saat iken immobilize hücrelerde 96 saat olarak bulunmuştur. İmmobilizasyonda optimum

aktivite gösterilen sıcaklık aralığı genişlemiş ve optimum pH aralığında değişiklikler gözlenmiştir. Tekrarlanabilir kesikli fermantasyon şartları altında immobilize hücrelerin tekrar kullanılabilirliği de incelenmiştir. Nişasta/2-dimetilamino etil metakrilat üzerindeki *Bacillus subtilis* hücrelerinin immobilizasyonu ile optimum üretim şartlarında enzim aktivitesinde 4 kat artış gözlenmiştir (Raafat ve ark. 2012).

Tian ve arkadaşları *Porcellio scaber latreille*'den yeni bir fibrinolitik ve antikoagülant özelliklerine sahip olan bir enzim üretmişlerdir. Amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyonu ve iyon değiştirme kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Elde edilen enzimin moleküler kütlesi 38,5 Da olarak belirlenip tek zincirli bir protein yapıda olduğu görülmüştür. SDS-Page ve Maldi-TOF MS(kütle spektrometresi) Spektrofotometre ile N-terminalinin 15 aminoasit sekansı belirlenmiştir. Elde edilen enzimin aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı 20-30 °C iken pH aralığı ise 6-10 olarak belirlenmiştir. Maksimum fibrinolitik aktivitenin gözleendiği şartlar ise pH 7 ve 40 °C'dır. Potasyum (K) ve sodyum (Na) varlığında enzim aktivitesinde bir artış olmamasına rağmen magnezyum (Mg) varlığında düşük bir artış gözlenmiştir. Aprotinin ve pepstain A tarafından enzim tamamen inhibe olmuştur. Yapılan fibrin plate analizlerinde elde edilen enzimin fibrini direk degrades etmediği fakat plazminojeni aktive ederek etkinlik gösterdiği gözlenmiştir. Enzim kromojenik substrat olan S-2251'e yüksek spesifite göstermiştir. Bunlarla birlikte enzim fibrin yapıdaki α bağlarını en hızlı, β bağlarını orta hızda ve λ bağlarını yavaş bir şekilde degrades ettiği görülmüştür (α bağları > β bağları > λ bağları). Pıhtı üzerinde ise enzim miktarı arttıkça çözünmenin daha hızlı gerçekleştiği saptanmıştır. Tüm bu analizlerden yola çıkarak elde edilen enzimin potansiyel olarak trombozis tedavisinde kullanılabileceği görülmüştür (Tian ve ark. 2015).

Hahn ve arkadaşları, peygamberdevesi olarak bilinen *Tenodera sinensis*'in yumurtasından sırasıyla amonyum sülfatla çöktürme, biyojel-P-60 jel filtrasyonu ve affinite kromatografisi ile fibrolaz enzimi saflaştırılmıştır. Enzimin homojenliği SDS-Page kullanılarak değerlendirilmiş ve moleküler kütlesi 31500 Da olarak saptanmıştır. İzoelektrik noktası 6,1 olarak gözlemlenmiştir. N-terminal sekansındaki aminoasit bileşimi "Alfa-Asp-Val-Gln-Gly-Asp-Ala-Rro-Ser" olarak bulunmuştur. Fibrolazın trombüsteki α ve β bağlarını hızlı bir şekilde parçaladığı λ bağlarını ise nispeten daha yavaş parçaladığı görülmüştür. Enzimin fibrin yapıya uygulandığında hızlıca hidroliz olduğu görülmüştür. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği şartlar ise pH 7 ve sıcaklık 30°C'dır. Yapılan

fibrinolitik çalışmalarda enzimin güçlü bir hidroliz etkisi olduğu görülmüştür (Hahn ve ark. 1999).

Park ve arkadaşları, *Cirriformia tentaculata*'dan üç farklı alkalın serin proteaz saflaştırarak enzimatik özelliklerini inceleyip kinetik karakterizasyonunu yapmışlardır. CTSP-1, CTSP-2, CTSP-3 olarak adlandırılan enzimlerin moleküler kütleleri yaklaşık olarak 28-30,9-28,4 kDa olarak bulunmuştur. Bu enzimler maksimum aktivitelerini pH 8,5-9 ve 50 - 60°C aralığında göstermiştir. Enzimler fenilmetasülferil (PMSF) tarafından tamamen inhibe edilmiştir. Bu da enzimlerin tipik birer serin proteaz türünde olduklarını göstermiştir. Burada elde edilen enzimlerin fibrin parçalayıcı olup trombüsün çözülmesi için ajan olarak kullanılabileceği saptanmıştır (Park ve ark. 2013).

Mukharjee ve Rai tarafından yapılan çalışmada *Bacillus Sp. AS-S20-I* türünden saflaştırılan trombolitik ve antikoagülan etkili serin proteaz saflaştırılmıştır. Bafibrinase olarak adlandırılan enzim monomerik yapıda olup moleküler kütlesi 32,3 kDa olarak bulunmuştur. Bu enzimin katalitik aktiviteleri incelendiğinde serin proteazları inhibe edicilerle inhibe olduğu için bir serin proteaz olduğu görülmüştür. Enzimin Km ve Vmax değerleri 0,24 mM ve 2,8 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{dk}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Enzim maksimum aktivitesini 37 °C ve pH 7,4 fizyolojik şartlarında göstermiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda fibrinolitik enzimin fibrindeki α ve λ bağlarını parçaladığı görülmüştür. Bafibrinase enzimi kollojeni parçalamadığı gibi HT2 hücreleri veya memeli eritrositlere de toksik değildir. Bunların ötesinde bafibrinase enzimi 2 mg/kg'lık dozunda hiçbir toksik etki görülmemiştir ve fareler üzerindeki çalışmalarda trombolitik ilaç olarak daha güvenli ve iyi olduğu için geliştirilmesi uygun görülmüştür. Bafibrinase enzimi aynı zamanda invitro trombüs parçalanmasında insan plazmininden daha etkilidir. Bafibrinase enziminin invivo antikoagülant doğası tedavi ve korumada etkili olduğu keşfedilmiştir (Mukherjee ve Rai 2011).

Zhang ve arkadaşları, yeni bir fibrinolitik enzim saflaştırıp sınıflandırmışlardır. N-V proteaz 2 kDa molekül ağırlığında tek zincirli bir proteindir. Optimum pH ve sıcaklık değerleri 7,8 ve 45 °C 'dır. Enzim aktivitesi serin proteazın inhibe edicileri tarafından tamamen inhibe olmuştur. NCBI (Ulusal biyoteknoloji bilgi merkezi) veri tabanında yapılan incelemede Maldi-TOF MS analizlerine göre hiçbir protein sekans eşleşmesine rastlanmamıştır (Zhang ve ark. 2007).

Majumdar ve ark. bu çalışmada *Brevibacillus FFO2B* türünden fibrinolitik serin proteaz olan Brevithrombolase enziminin farmakolojik karakterizasyonunu ve biyokimyasal özelliklerini incelemişlerdir. Ayrıca bu enzimin trombolitik potansiyelide değerlendirilmiştir. Bu monomerik proteazın moleküler ağırlığı 55 kDa olarak bulunmuştur. Brevithrombolase enziminin optimum aktivitesi pH 7,4 ve 34°C'da görülmüştür. Hidrolitik aktivitesinin kazein ve fibrinojen substratları üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. Brevithrombolase, plazmin ve streptokinaz enzimleri arasındaki en yüksek fibrinolitik ve trombolitik etkili enzim olarak bulunmuştur. Brevithrombolase enzimin kardiyovasküler hastalıklarda tedavi edici ilaçlar için geliştirilebileceği gösterilmiştir (Majumdar ve ark. 2014).

Wang ve arkadaşları tarafından *Neanthes Japonica* ile üretilip amonyum sülfat çöktürme, hidrofobik kromatografi ve jel filtrasyon kromatografisiyle saflaştırılarak NJP adlı bir proteaz enzimi elde edilmiştir. Moleküler kütlesi SDS-Page ve Maldi-Tof kütle spektrofotometresi kullanılarak yaklaşık olarak 28,6-33,5 kDa arasında olduğu belirlenmiştir. Monomerik formda bir proteazdır. İzoelektrik noktası 9,2 olarak belirlenmiş olup pH'ı 7-10 aralığında stabil olduğu görülmüş; optimum şartları 40 °C ve pH 9 olarak belirlenmiştir. NJP enziminin hidroliz işlemi α bağları ile başlayıp λ bağları ve β bağları şeklinde devam etmiştir. NJP enzimi PMSF(fenil metil sülfonil florür) ile tamamen inhibe olmuştur. NJP enzimi bir alkalın serin proteazdır ve trombozis tedavisinde umut vaadeden bir enzim olarak belirlenmiştir (Wang ve ark. 2011).

Silva ve arkadaşları, *Streptomyces DPUA1576* türü ile üretilen fibrinolitik enzimin saflaştırmasını PEG (polietilenglikol)-fosfat tuzu iki fazlı su sistemini kullanarak yapmışlardır. Fibrinolitik proteazın ayrılmasında pH, PEG'in molar kütlesi, PEG ve fosfat konsantrasyonunun etkileri 2^5 fonksiyonel dizayn yöntemi kullanılarak incelenmiştir. En yüksek ayrılma oranı % 20 PEG ve % 15 fosfat ortamında pH 8 olduğu durumda görülmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda PEG-Fosfat metodunun enzim ayırma için alternatif bir yöntem olduğu ifade edilmektedir (Silva ve ark. 2013).

Cha ve arkadaşları tarafından katı kültür şartlarında substrat olarak mısır koçanının kullanımıyla *Pleurotus eryngii*'den enzim eldesi incelenmiştir. Fibrinolitik proteaz enziminin saflaştırılması ve biyokimyasal özellikleri üzerine çalışılmıştır. Elde edilen enzimin moleküler kütlesi SDS-Page kullanılarak 14 kDa olarak belirlenmiştir. Enzimin kromojenik substratlar üzerindeki etkisi incelendiğinde en yüksek aktiviteyi Tosyl-Gly-Pro-Pro-Lys-P-Nitronilide için bulunmuştur. K_m ve V_{max} değerleri 0.18 mM ve 535 U/ml olarak

bulunmuştur. Enzim fenilmetilsülfonilflorür (PMSF) varlığında tamamen inhibe olmuştur. Buda bir serin proteaz olduğunu gösterir. N terminal sekansı “A-M-D-S-Q-T-D-A-S-Y-G-LA-N-D” olarak bulunmuştur. Enzim aktivitesinin pH’ ı 4.0-6.0 aralığında stabil, pH=5 ve 40 °C’da optimum olduğu saptanmıştır. Enzimin beş dakikalık inkübasyon sonunda α bağlarının hepsini hidroliz ettiği ve sonraki on dakika içinde β bağlarını yıktığı görülmüştür (Cha ve ark. 2010).

Patel ve arkadaşları, *Euphorbia hirta* bitki özünden iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisiyle fibrinolitik aktiviteye sahip proteaz enzimi saflaştırmışlardır. N terminal sekansındaki aminoasit dizilimi “Y-A-V-Y-I-G-L-I-L-L-E-T-A-A-I-N-N-E” olarak bulunmuştur. Elde edilen bu enzimin esteraz ve amilaz aktivitesi gösterdiği de görülmüştür. Bu enzim fibrin pıhtısındaki α , β ve λ bağlarını sırasıyla parçalar. Enzimlerin aktivite gösterdiği optimum pH ve sıcaklığın sırasıyla 7,2 ve 50 °C olduğu saptanmıştır. PMSF kimyasalı kullanıldığında tamamen inhibe olmuştur. Enzimin CD-spectra görüntülemeye beta kırılmalı yapısının alfa heliks yapısından daha yoğun olduğu görülmüştür. Bu sonuçlardan da yola çıkarak elde edilen enzimin trombin benzeri bir serin proteaz olduğu görülmüş, endüstriyel ve terapötik uygulamalarda gelecek vaat ettiği düşünülmüştür (Patel ve ark. 2012).

Shirasaka ve arkadaşları, ticari olarak satılan geleneksel fermente pirinç yiyeceğinden izole edilen *Aspergillus oryzae* KSK-3 suşu ile fibrinolitik aktivitesi olan bir enzim üretmişlerdir. *Aspergillus oryzae* KSK-3’ün kültür sıvısı ultra filtrasyonla konsantre edilip amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kullanılarak saflaştırılmıştır. SDS-Page ile moleküler kütlesi 30 kDa olarak bulunmuştur. Enzimin maksimum fibrinolitik aktivitesi pH 6 ve 50 °C’da gözlenmiştir. Saflaştırılan enzimin pH 4-9 ve sıcaklık 45 °C’ın üstünde stabil olduğu görülmüştür. Kromojenik substratlar arasında en yüksek aktivite S-2238 görülmüş olup PMSF ile tamamen inhibe olmuştur. Bu sonuçlardan yola çıkarak bu enzimin serin proteaz olduğuna karar verilmiştir. Enzimin oral kullanımında yüksek verimlilik ve nontoksik etkili olduğu saptanmış olup gelecekteki terapötik uygulamalarda kullanılabilir olduğu görülmüştür (Shirasaka ve ark. 2012).

Avhad ve arkadaşları, *Bacillus sphaericus* MTCC 3672’den fibrinolitik enzim üretimini bir litrelik biyoreaktör ölçeğinde ultrasonik ses dalgaları kullanarak incelemişlerdir. Ultrasonik ses dalgaları destekli üretimin optimizasyonu için merkezi kompozit dizayn metodu (MKD) kullanılmıştır. Farklı proses parametreleri etki zamanı, uygulama hacmi ve

ultrasonik ses dalgaları gücü gibi değişkenler 11 deneysel uygulamada yürütülmüştür. Reaktördeki üretime ultrasonik sesin kütle transferine etkisini incelemek amacıyla sonikasyon yapılmayan sistemle kıyaslama yapılmıştır. Optimize edilmiş ultrasonikasyon protokolünün fibrinolitik enzim üretiminde 1.48 kat artış sağladığı belirtilmiştir. Bu çalışma ile reaktörlerde sonikasyon kullanımı kütle transferini ve dolaylı olarak enzim üretimini arttırdığı için alternatif bir yöntem olarak kaydedilmiştir (Avhad ve Rathod 2015).

Singh ve arkadaşları, Hindistan geleneksel yiyeceklerinden izole edilen fibrinolitik aktiviteye sahip mikroorganizmalar üzerine çalışmışlardır. Fibrinolitik aktivite tayini için basit ve hızlı bir spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Çoğunlukla soya ve balık ürünleri tabanlı proteince zengin fibrinolitik aktiviteye sahip 31'den fazla fermente gıda üzerinde çalışılmıştır. Yüksek fibrinolitik aktivite fermente küçük balık *Cyprid*'de gözlenmiştir. Fermente soya ürünlerinde ve fermente balıktaki fibrinolitik aktiviteler substrat olarak fibrin kullanılarak zymogramda tayin edilmiştir (Singh ve ark. 2014).

Choi ve arkadaşları, *Asterina pectinifera*'dan saflaştırılan starase enzimiyle çalışmışlardır. Starase enzimi SDS-Page ile yapılan ölçümlerde tek bant göstererek moleküler ağırlığı yaklaşık 48 kDa olarak bulunmuştur. Starase enziminin N-Terminal sekansı "A-I-P-T-E-F-D-A-R-T-K-K-H-N-N" olarak bulunmuş olup bilinen hiçbir fibrinolitik proteaza benzememektedir. Starase enzimi en yüksek spesifiteyi H-D-Val-Lev-Lys-pNA substratında göstermiştir. Fibrinolitik aktivite gösteren starase enziminin sadece fibrin tıkanıklığını parçalamadığı aynı zamanda plazminojeni aktive ettiği görülmüştür. Starase enzimi güçlü bir fibrinolitik aktivite göstermiş ve fibrindeki üç bağı da hızlı bir şekilde parçalamıştır (Choi ve ark. 2014).

Bi ve arkadaşları, dünya çapında en fazla ölüme sebep olan üç faktörden biri olan kardiyovasküler hastalıkların tedavisi için antitrombolitik etkili bir ilaç geliştirdiklerini ifade etmişlerdir. *Urechis unicinctus* kurdundan anyon değiştirici ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak UFEIII enzimi saflaştırılmıştır. Moleküler kütlesi, fibrinolitik aktivitesi ve UFEIII 'ün fibrinolitik davranışları belirlenmiştir. Buna ek olarak UFEIII enziminin antitrombolitik etkisi tavşanlarda ve ratlarda invivo uygulamalarda denenmiştir. UFEIII enziminin moleküler kütlesi 20.8 kDa olarak bulunmuştur. UFEIII enzimi direk fibrini degrades etmemiş fakat plazminojeni aktive etmiştir. Ratlarda yapılan uygulamalar sonucu trombozis azalmış ve tavşanlarda vena caval trombozis azalmıştır. UFEIII enziminin fibrinolitik davranışında α bağları > β bağları > λ bağları şeklinde olduğu gösterilmiştir (Bi ve ark. 2013).

Gion ve arkadaşları fibrinolitik terapinin etki ve güvenliğini geliştirmek için yılan zehrinden izole ettikleri fibrinolitik enzimlerde çalışmışlardır. 2 fibrinolitik enzim bulunmuştur, bunlar; Colombienases I ve Colombienases II 'dir. Kayda değer bir aktivite *Bothrops colombiensis* zehrinden izole edilen enzim tarafından gösterilmiştir. Colombienases enziminin fibrinolitik sistemi harekete geçirmeksizin fibrinojenin α ve β bağlarını yıkmıştır. Ek olarak Colombienases -II enzimi fibrinojenin λ bağlarını da yıkmıştır. Laminin ve tip-4 kolajenin Colombienases enzimine karşı dirençli olduğu görülmüştür. Jelatin-zymogram analizi *B. Colombiensis*'in zehrindeki bantlar 64 ve 148 kDa aralığında olduğunu göstermiştir. Enzim metalloproteaz inhibitörleri tarafından inhibe olmuştur. Bu çalışmada Colombienases enzimlerinin direkt fibrinolitik aktivite gösterdikleri görülmüştür. Yani terapötik çalışmalarda trombolitik ajan olarak kullanılabileceği kaydedilmiştir (Gion ve ark. 2008).

Afifah ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada enzim üretimindeki yüksek maliyetin, endüstrideki enzim uygulamalarının sınırlayıcısı olduğunu belirlemişlerdir. Enzim üretiminde besiyeri seçimi oldukça önemlidir. Enzim üretiminin optimizasyonundaki temel parametreler; besiyeri bileşimi, büyüme ve çevresel şartlar olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada *Bacillus licheniformis* RO3; red oncom geleneksel besininden izole edilmiştir. Farklı besiyerleri kullanılarak fibrinolitik proteaz üretimi test edilmiştir. 3 tip besiyeriyle çalışılmıştır. Proteaz aktivitesi substrat olarak kazein kullanımıyla spektrofotometrik yöntemlerle test edilmiştir ve proteaz aktivitesi fibrinojen substratı kullanılarak zymogram analizleriyle onaylanmıştır. LB (Luria-Bertani) besiyeri içinde *Bacillus licheniformis* RO3 36 saatlik fermentasyon sonunda en yüksek proteaz aktivitesi maksimum 0,024 U/ml olarak bulunmuştur. En iyi sonuç LBS (Skim milk ekli LB ortamı) besiyerinde *Bacillus licheniformis* RO3 ile sağlanan en yüksek proteaz aktivitesi 0,051 U/ml olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlar göstermiştir ki red oncom powder; fibrinolitik proteaz üretimi için potansiyel besiyeri olarak kullanılabilir (Afifah ve ark. 2015).

Chang ve arkadaşları, deniz bakterisi *Bacillus vallismortis*'ten alkalın serin proteaz geni Bvsp'yi klonlamışlardır. 320 aminoasit kodlanmış ve moleküler kütlesi 34,4 kDa olarak bulunmuştur. Aminoasit sekans analizi göstermiştir ki Bvsp %72'lik bir oranla daha önce rapor edilen proteazlara benzerdir. Bvsp enzimi optimum aktivitesini pH 6,5'de 54 °C'da göstermiş ve 6-10 pH ve 40-60°C sıcaklıkta stabil kalmıştır. Enzim aktivitesi bazı metal iyonları varlığında (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} ve Ba^{+2}) artmaktadır, özellikle Ca^{+2} iyonu varlığında enzim aktivitesi 100 U/ml'ye kadar ulaşmıştır. Bvsp enzimi plazminojen aktivatörü değildir.

Bvsp ayrıca α ve β bağlarını kolayca fakat λ bağlarını yavaş yavaş parçalamıştır. Böylece Bvsp'nin kardiyovasküler hastalıkların tedavisi için bir potansiyel oluşturduğu görülmüştür (Cheng ve ark. 2015).

Vijayaraghavan ve ark. tarafından katı hal fermantasyonunda tarım kalıntıları fibrinolitik enzim üretiminde substrat olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada 2^5 faktöriyel dizayn ve merkezi kompozit dizayn (MKD) yöntemi fermantasyon ortamının optimizasyonu için kullanılmıştır. 2^5 faktöriyel dizayn metoduyla fiziksel faktörler; pH ve nem ve besin bileşenlerinin; trehalose, kazein ve sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) fibrinolitik enzim üretimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Merkezi kompozit dizayn yönteminde bu üç faktörün optimum değerleri araştırılmıştır. Optimize edilen besiyeri fibrinolitik aktivitenin 2751 U/ml olduğunu göstermiş ve bu aktivitenin optimize edilmemiş besiyerine göre 2,5 kat daha yüksek olduğu görülmüştür. Fibrinolitik enzimin moleküler ağırlığı 55.5 kDa, optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 8,0 ve 50 °C olarak kaydedilmiştir (Vijayaraghavan ve Vincent 2015).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Proteaz Üretici Mikroorganizma

Çalışmada materyal olarak proteaz enzimi üretme yeteneğine sahip mikroorganizma yerel marketlerden temin edilen ürünlerden izole edilmiştir. Çalışmada kullanılan proteince zengin kaynaklar olarak; sucuk, sosis, salam, süt, yoğurt, peynir türleri ve konserve balık türleri kullanılmıştır.

2.1.2. Ekipman

- Hassas Terazı (Radwag AS 220.R2)
- Soğutmalı Santrifüj (Nüve NF 800)
- Manyetik Karıştırıcı(Wisd MSH-20A)
- pH metre(Orion 3 Star)
- Buzdolabı (Vestel White FR 510P)
- Spektrofotometre(Genesys 10S UV-VIS)
- Vorteks (Velp ZX3)
- Çalkalamalı İnkübatör (Wisd Wisebath)
- Otoklav (Lab Companion ST-G Series)
- Laminer Akışlı Kabin (Heal Force)
- Çalkalamalı su banyosu (Nüve ST402)
- Otomatik Pipetler (Brand Transferpette)

2.1.3. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan bütün kimyasallar analitik saflıktadır. Kullanılan kimyasallar şöyledir; maya özütü, fibrinojen, trikloro asetik asit, sodyum asetat, çinko asetat, tirozin, sodyum karbonat, kalsiyum klorür, amonyum klorür, üre, jelatin, kazein, glikoz, sükroz,

maltoz, nutrient broth, thrombin, plate count skim milk agar, agaroz, çinko asetat, mangan klorür, fruktoz, potasyum fosfat, magnezyum sülfat, Tris-HCl, maya özütü, Folin Ciocalteu.

2.1.4. Besiyerleri ve Substratlar

Plate Count Skim milk Agar; 5 g/l kazein, pepton, 2,5 g/l maya özütü, 1 g/l D- glikoz, 15 g/l agar bileşiminde olup 121 °C’ da 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika sterilizasyon normu uygulanarak hazırlanmıştır. Bu karışım ticari olarak satın alınmış olup belirli oranlarda çözelti hazırlanıp otoklavlandıktan sonra her petriye 12,5 ml eklenerek kullanılmıştır.

Kanlı Agar Seçimli Besiyeri; Maya özütü 10,0 g/l, pepton 10,0 g/l, sodyum klorür 5,0 g/l, agar 15,0 g/l ve steril defibrine edilmiş kan içerikli besiyeri ticari olarak satın alınmış olup petriler direk kullanılmıştır.

Fibrin Plate; 20 mM Tris-HCl içinde hazırlanan %1,5’lik bovine fibrinojen çözeltisinden 3 ml alınarak üzerine 1 ml thrombin (1 U/ml 20 mM Tris-HCl tamponunda hazırlanmış) ve 3 ml %1’lik agaroz karıştırılarak 80 °C’da 30 dakika boyunca ısıtılmıştır. Hazırlanan çözelti petrilere dökülerek donması beklenmiştir.

Nutrient Broth; 5,0 g/l pepton, 3,0 g/l et ekstraktı içeriğine sahip besiyeri ticari olarak satın alınmış olup belirlenen miktarlarda çözelti hazırlanarak sıvı besiyeri için kullanılmıştır.

Kazein Substratı; Proteaz enzim aktivitesinin kantitatif ölçümü için substrat olarak kazein kullanılmıştır. 0,6 g kazein 100 ml 50 mM pH 7,5 Tris-HCl tamponu ile manyetik karıştırıcı üzerinde çözdürülmüştür. Kazein substratı, analizler için taze olarak hazırlanmıştır.

2.1.5. Tampon ve Çözeltiler

50 mM Sodyum-Fosfat pH (6,0-6,5) ; 6,8 g potasyum dihidrojen fosfat ve 13,40 g disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) son hacim 1 litre olacak şekilde distile suyla karıştırıldı. Hazırlanan çözeltinin pH’ı, HCl veya NaOH kullanılarak istenilen değere ayarlandı.

50 mM Tris-HCl pH (7,0-7,5-8,0-8,5); 6,057 g Tris-HCl distile su ile 1 litreye tamamlandı. HCl ile istenen pH ayarlandı.

Sitrat Tamponu (4,0-5,0); Tamponu hazırlamak için iki farklı solüsyon kullanıldı. Birinci çözelti 0,1 M’lık sitrik asit solüsyonu, ikinci çözelti ise 0,1 M’lık sodyum sitrat

solüsyonudur. pH'ı 4 olan tampon hazırlanırken birinci çözeltiden 33,0 ml ve ikinci çözeltiden 17,0 ml alınarak saf suyla 100 ml'ye tamamlandı. pH'ı 5 olan tampon hazırlanırken birinci çözeltiden 20,5 ml ve ikinci çözeltiden 29,5 ml alınarak saf suyla 100 ml'ye tamamlandı.

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

2.2.Yöntem

2.2.1. Proteaz Enzimi Üreten Suşun İzolasyonu

Çalışmada kullanılan suşlar proteince zengin kaynaklardan 1 g tartılarak 100 ml steril saf su içinde seyreltilmiştir. Ardından hazırlanmış skim milk agar içeren petrilere ekim yapılarak 37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda petriler üzerinde oluşan temiz alanlar incelenerek en fazla açıklık oluşturan koloniler seçilmiş ve en yüksek proteolitik aktiviteyi gösteren suş seçilmiştir. En fazla açıklık oluşturan suş belirlenmiş ve katı besiyerine alınmıştır.

2.2.2. Aktif Kültürün Hazırlanması

Skim milk agarda izole edilen suşların Laminer flow kabinde bek alevi başında 50 ml nutrient broth sıvı besiyeri içeren ortama öze ile ekimi yapılmıştır. 37 °C'da 150 rpm'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda elde edilen ortam 12000 rpm'de santrifüjlenerek fibrin plate ve kanlı agar çalışmalarında kullanılmıştır.

2.2.3. Kanlı Agar Petrilerine Proteaz Enzim Aktivitesi Belirlenmesi

Ticari olarak satın alınmış kanlı agar petrilerine santrifüjleme sonucu elde edilen süpernatantlar ilave edilerek 37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda petriler üzerinde oluşan temiz alanlar incelenmiştir.

2.2.4. Fibrin Plate Ortamında Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Santrifüjleme sonucu elde edilen süpernatantın fibrin plate üzerine uygulaması yapıldı. Bu amaçla, 3 ml'lik fibrinojen çözeltisi (20mM Tris-HCl içinde %1,5'lik bovine fibrinojen), 1 ml thrombin (1 U/ml 20 mM Tris-HCl tamponunda hazırlanmış), 3 ml %1'lik agaroz karıştırılarak 80 °C'da 30 dakika boyunca ısıtıldı. Ardından her petriye eşit olacak şekilde dağıtılarak donması bekledi. Katı hale gelen agar üzerine pastör pipeti yardımıyla eşit yarıçaplara sahip kuyucuklar açıldı. Açılan bu kuyucuklar üzerine 25 µl enzim çözeltisi eklenerek 37 °C'da inkübasyona bırakıldı ve 12-24 saat inkübasyon süresi sonunda oluşan açık alanlar gözlemlendi.

2.2.5. Proteaz Enzim Aktivitesinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi

Takami ve arkadaşlarının tanımladığı yöntemle göre proteaz aktivite tayini yapılmıştır. İlk olarak pH 7,4'de hazırlanan %0,6'lık kazein çözeltisinden 2,5 ml cam tüpe konulmuştur. Üzerine 0,5 ml enzim örneği ilave edilerek 37 °C'da 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşamada enzim substratı hidroliz ederek tirozin aminoasitlerini açığa çıkarması sağlanmıştır. Ardından ortam üzerine 2,5 ml TCA çözeltisi eklenerek reaksiyonun durması ve diğer proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. Bu aşamada da 30 dakika inkübasyona bırakılan ortam süzgeç kâğıdından süzülerek süzüntüden 0,5 ml alınmıştır. Bu ortam üzerine 2,5 ml 0,5 M'lık Na₂CO₃ çözeltisi eklenerek üzerine 0,5 ml %50'lik Folin Ciocalteau çözeltisi ilave edilmiştir. Bu aşamada 30 dakika inkübasyona bırakılarak bu süre sonunda vortekslenmiştir ve 660 nm dalga boyunda okunmuştur(Takami ve ark. 1989). Ardından daha önceden oluşturulmuş tirozin standart grafiği kullanılarak aktivite hesabı yapılmıştır. Hesaplama için ise Eşitlik 1'deki formül kullanılmıştır. Bu aşamalarda kullanılan bütün cam tüpler 200 °C'da 2 saat bekletilip steril edilerek kullanılmıştır.

$$\text{Enzim Aktivitesi} \left(\frac{U}{ml} \right) = \frac{\left(\frac{A_{660}}{E_{gim}} \right) \times \text{Toplam Hacim}(ml)}{\text{Enzim Hacmi}(ml) \times \text{inkübasyon süresi}(dak.)} \times \text{Seyreltme Faktörü} \quad E1$$

2.2.6. Tirozin Standart Eğrisinin Hazırlanması

Standart grafik hazırlanırken 1 µl tirozin, 1ml 50 mM Tris-HCl tamponunda çözündürülmüştür. Hazırlanan bu stok çözelti temel alınarak Tablo 2.1'de tanımlanan farklı tirozin konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmıştır.

Tablo 2.1.Tirozin standart eğrisi hazırlanırken kullanılan çözeltilerin bileşimleri

Konsantrasyon (µg/ml)	Stok çözeltiden eklenen miktar (µl)	Tampondan eklenen miktar (µl)
10	10	990
20	20	980
30	30	970
40	40	960
50	50	950

2.2.7. Ortam Bileşenlerinin Proteaz Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi

Vijayaraghavan ve ark. tanımlamış olduğu, 10 g/l glikoz, 10 g/l pepton, 10 g/l maya özütü, 1 g/l K₂HPO₄, 0,5 g/l MgSO₄, 0,5 g/l CaCl₂ temel alınarak farklı karbon, azot ve iz elementlerin etkisi incelenmiştir (Vijayaraghavan ve Vincent 2015).

2.2.8. Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi

Karbon kaynaklarının etkisi incelenirken besiyeri olarak seçilen ortamdaki karbon kaynağı yerine literatürde yaygın olarak kullanılan farklı karbon kaynaklarının kullanılabilirliği incelendi. Bu amaçla temel alınan besi yerinde bulunan karbon kaynağına eş miktarda glikoz, maltoz, fruktoz, sükroz, nişasta kullanılmıştır. Ortamdan farklı zamanlarda numune alınarak enzim aktivitesi takip edilmiş ve maksimum aktivite belirlenmiştir.

2.2.9. Farklı Azot Kaynaklarının Etkisi

Ortama azot kaynaklarının etkisi incelenirken temel besiyeri olarak kullandığımız ortamdan azot kaynakları çıkarıldı. Bunun yerine aynı oranlarda seçilen azot kaynakları ilave edildi. Farklı azot kaynağı kullanılarak yapılan denemelerde üre, kazein, jelatin, pepton, maya özütü kullanılmıştır. Besiyeri ortamında azot kaynağı olarak maya özütü-pepton ve maya özütü- üre bileşimlerinin birlikte kullanıldığı deneyler yapılmıştır.

2.2.10. İz Elementlerin Etkisi

Bu aşamada en uygun karbon ve azot kaynakların kullanıldığı ortamda bakteriyel proteaz üretiminde etkisinin tanımlandığı iz elementlerin olumlu ve olumsuz etkileri belirlenmiştir. Bu amaçla iz elementlerin etkisi 6 farklı ortamda incelenmiştir. Birinci ortamda temel besiyerine ek olarak KH_2PO_4 (1 g/l), MgSO_4 (0,5 g/l), CaCl_2 (0,5 g/l) bileşimi kullanılmıştır. İkinci ortamda ise birinci ortamdan farklı olarak tüm bileşimden KH_2PO_4 bileşiği çıkarılmıştır. Üçüncü ortamda ise birinci ortamdan farklı olarak MgSO_4 çıkarılmıştır. Dördüncü ortamda ise birinci ortamdan farklı olarak CaCl_2 çıkarılmıştır. Beşinci ortamda ise birinci ortama ek olarak $\text{ZnC}_4\text{H}_6\text{O}_4$ bileşiği 0,5 g/l oranında eklenmiştir. Altıncı ortamda ise birinci ortama ek olarak 0,5 g/l oranında MnCl_2 eklenmiştir. Bu şekilde bu elementlerin izole edilen suş ortamına etkisi belirlenmiştir.

2.2.11. Protez Aktivitesinin Maksimum Olduğu Besiyeri Bileşiminin Belirlenmesi

Proteaz aktivitesinde önemli olan ortam bileşenlerinin en yüksek aktivite değerini veren ortam konsantrasyonları deneysel tasarım yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla kullanılan Merkezi Kompozit Dizayn Yöntemi 2 veya daha fazla faktörün bir veya birkaç cevap üzerine etkilerini modelleyerek optimizasyonunun yapılması amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntem deneylerin tasarlanması, elde edilen veriler kullanılarak cevaplar üzerine faktörlerin etkisinin belirlenmesi, bu etkilerin matematiksel modeller ile ifade edilmesi ve faktörlerin optimizasyonu aşamalarını içermektedir. Deneysel tasarım ve sonuçların değerlendirilmesi amacıyla Design Expert 8.0 yazılımı kullanılmıştır.

Merkezi Kompozit Dizayn yöntemi uygulanırken 20 deney yapılmıştır. Besiyeri ortamları 37°C'da 150 rpm'de 24 saat inkübasyon şartlarında yapılmıştır. Bu aşamada besiyeri içerisindeki optimum pepton, maya özütü ve fruktoz konsantrasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Deneysel çalışmada kullanılan farklı konsantrasyon değerleri Tablo 2.2'de belirtildiği gibidir.

Tablo 2.2. Merkez Kompozit Dizaynına göre deneysel matris

Deney No	Pepton Kons. g/l	Maya özütü Kons., g/l	Fruktoz Kons., g/l
1	7,50	7,50	7,50
2	12,50	7,50	7,50
3	7,50	12,50	7,50
4	12,50	12,50	7,50
5	7,50	7,50	12,50
6	12,50	7,50	12,50
7	7,50	12,50	12,50
8	12,50	12,50	12,50
9	5,80	10,00	10,00
10	14,20	10,00	10,00
11	10,00	5,80	10,00
12	10,00	14,20	10,00
13	10,00	10,00	5,80
14	10,00	10,00	14,20
15	10,00	10,00	10,00
16	10,00	10,00	10,00
17	10,00	10,00	10,00
18	10,00	10,00	10,00
19	10,00	10,00	10,00
20	10,00	10,00	10,00

2.2.12. Proteaz Enzim Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.12.1. Optimum Sıcaklık ve pH'ın Belirlenmesi

Enzim aktivitesi ölçümü başlamadan önce %0,6'lık kazein çözeltisiyle hazırlanan substrat ortamları incelenen sıcaklıklarda 30 dakika bekletilerek reaksiyon sıcaklığına gelmesi sağlandı. Ardından istenen sıcaklığa gelmiş substratlar (37, 50, 60, 70, 80, 90 °C) üzerine 0,5 ml enzim eklenerek daha önceki adımlarda yapılan proteaz aktivite tayini aşamaları aynı şekilde yapılmıştır.

Proteaz aktivite ölçümünde farklı pH değerlerine sahip tamponlar kullanılarak enzimin optimum pH'ı incelenmiştir. Bu aşamada pH; 4-9 aralığı incelenmiştir. Tablo 2.3'te verilmiş farklı tamponlarda hazırlanmış 2,5 ml %0,6'lık kazein çözeltisi üzerine 0,5 ml enzim eklenip aktivite tayin prosedürü takip edilerek aktivite sonuçları belirlenmiştir.

Tablo 2.3.Farklı pH değerleri incelenirken kullanılan tamponlar

pH	Kullanılan Tampon
4	50 mM Sitrat Tamponu
5	50 mM Sitrat Tamponu
6	50 mM Fosfat Tamponu
6,5	50 mM Fosfat Tamponu
7	50 mM Tris-HCl Tamponu
7,5	50 mM Tris-HCl Tamponu
8	50 mM Tris-HCl Tamponu
9	50 mM Tris-HCl Tamponu

2.2.12.2. Enzimin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Enzim kinetik sabitlerinin belirlenmesi amacıyla 50 mM Tris-HCl tamponuyla 2.5 mg/ml konsantrasyonunda kazein stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözelti kullanılarak Tablo 2.4’te tanımlanan farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış çözeltiler kullanıldı.

Tablo 2.4. Enzim kinetik parametreleri belirlenirken kullanılan çözeltiler

Konsantrasyon (mg/ml)	Stok çözeltiden eklenen miktar (ml)	Tampondan eklenen miktar (ml)
0,4	1,6	8,4
0,6	2,4	7,6
0,8	3,2	6,8
1	4	6
1,2	4,8	5,2
1,4	5,6	4,4
1,6	6,4	3,6
1,8	7,2	2,8
2	8	2
2,5	10	0

Farklı substrat konsantrasyonlarına karşı ölçülen proteaz aktiviteleri ile oluşturulan grafikte Eşitlik 2 kullanılarak K_m ve V_{max} değerleri bulundu.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max} \cdot S} + \frac{1}{V_{max}}$$

E2

2.2.13. 16S rRNA Analizi

16S rRNA analizi, hizmet alımı yoluyla yapılmıştır. Elde edilen 16S rRNA dizileri Gen Bankasında (URL-2, 2017) var olan diğer bakteriyel dizilerle karşılaştırılmıştır (BLAST analizi). Karşılaştırma sonucu aralarındaki benzerlik oranları tespit edilmiştir.

2.2.14. Hücre Büyüme Eğrisi

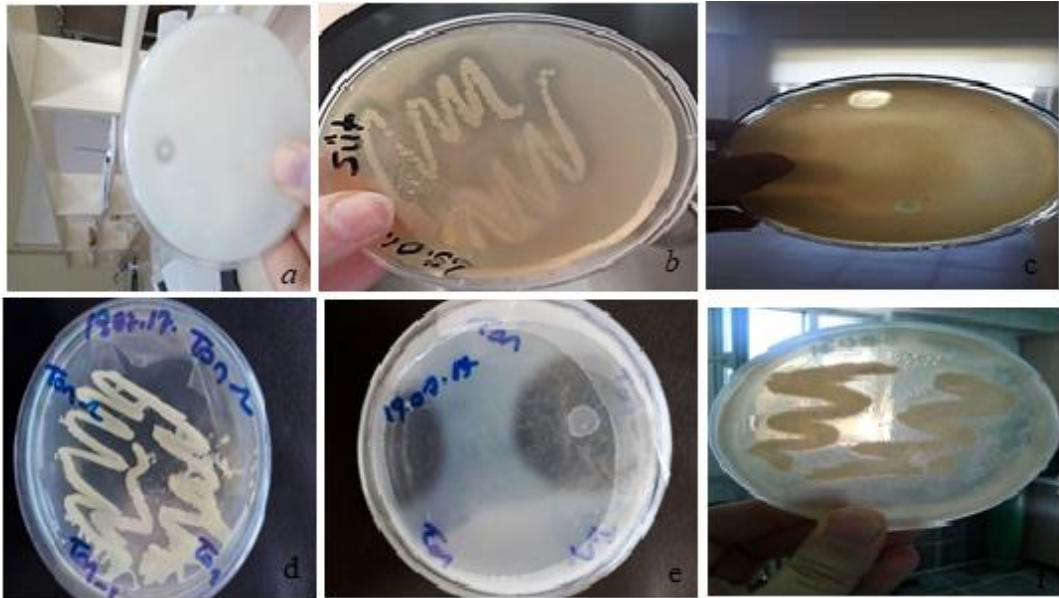
Belirlenen optimum ortamda hücrenin büyüme eğrisi elde edilmiştir. Bu amaçla farklı zamanlarda alınan örnekler 5000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenerek hücreler ayrılmıştır. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 0,5 ml saf su eklenerek vorteksle homojenize edildikten sonra 600 nm absorbansta köre karşı okunmuştur.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Fermentatif Protein Kaynaklarından Suş İzolasyon Sonuçları

Proteazlar; farklı endüstriyel ve medikal uygulamalarda kullanılan, yüksek medikal ve biyoteknolojik potansiyele sahip enzimlerdir. Biyoteknolojik faaliyetlerdeki çeşitli kullanımları sebebiyle proteaz üreten suşlar ve enzimler büyük önem taşımaktadır. Fibrinolitik aktiviteye sahip enzim üreten suşun izolasyonu amacıyla yaptığımız çalışmada farklı proteince zengin kaynakların alınan örneklerinden 20 suş izole edilmiştir. Bu izolatlardan 2 suşun proteaz üretim ortamında yapılan analiz sonucunda proteaz üretiminde negatif sonuç verdiği, 18 suşun ise proteaz ürettiği saptanmıştır.

İzole edilen suşların enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla skim milk agarlı katı enzim üretim besiyerlerine ekim yapıp 37 °C’da 1 gece inkübasyona bırakılarak bu süre sonunda petriler üzerinde oluşan temiz alanlar incelenmiştir ve en yüksek açıklık oluşturan suşların petrideki görüntüleri Şekil 3.1’ de gösterilmiştir. Ton balığı ve sütten elde edilen suşlarda oluşan saydam kısmın diğer kaynaklardan elde edilenlerden büyük olduğu görülmüştür.



Şekil 3.1. Skim milk katı besiyerinde suşların oluşturduğu açıklıklar (a. Peynirden elde edilen suş, b.sütten elde edilen suş, c.sucuktan elde edilen suş, d, e, f. ton balığından elde edilen suş)

Skim milk agar katı besiyerinde yüksek aktivite gösterdiği belirlenen 4 suş kanlı agar seçimli katı besiyerine uygulandı. Bu uygulamadan sonra 37 °C’da 24 saat inkübasyon sonrası besiyeri üzerinde oluşan açık alanlar incelendi. Ton balığından elde edilen suş kanlı agarda açıklık oluşturmuştur. Bu analizin sonucunda kanlı agarda oluşan açıklık Şekil 3.2’de görülmektedir.



Şekil 3.2. Kanlı agar besiyerinde ton balığından elde edilen suşun oluşturduğu açıklığın görünümü

Skim milk agarda yüksek aktivite gösterdiği belirlenen 4 suş fibrin plate seçimli katı besiyerine uygulandı. Fibrin plate katı ortamının temeli invitro ortamda fibrinojen ve thrombinin fibrin yapısını oluşturmaya dayanmaktadır. Belirlenen suşlar ortama uygulandıktan sonra 37 °C’da 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından besiyeri üzerinde oluşan temiz alanlar incelenmiştir. Oluşan temiz alanlar mikroorganizmanın fibrinolitik aktivite gösterdiğini kanıtlar. Oluşan açık alanlar ne kadar büyükse enzim aktivitesi o kadar yüksektir. Bu aşamada en fazla temiz alan oluşumu ton balığı suşunda görülmüştür. Bu analizin sonucu Şekil 3.3’de gösterilmiştir. Fibrin plate ve kanlı agar analizlerinden yola çıkarak en fazla açıklık gösteren buna bağlı olarak da en yüksek fibrinolitik aktiviteyi gösteren suş ton balığı kaynaklı suş olduğu için 16S rRNA analizi bu suş için yapılmıştır.



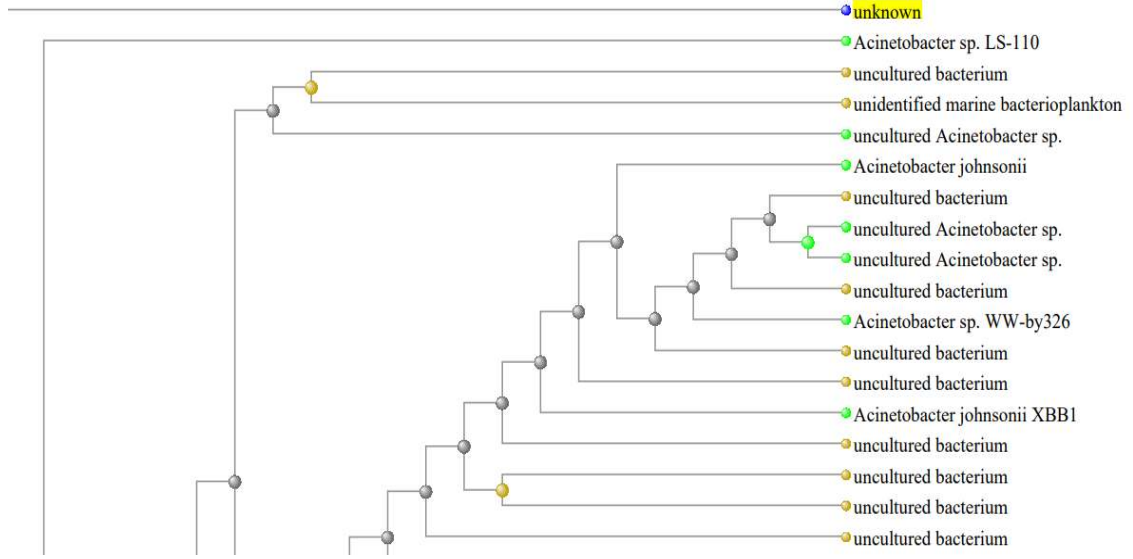
Şekil 3.3. Fibrin plate katı besiyerinde suşların oluşturduğu açıklıkların görünümü

3.2. 16S rRNA Analizi

16S rRNA dizi analizi sonucu “Chromas” programı kullanılarak elde edilen nükleotid dizisi verilmiştir.

“CGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGGAAGGGTAGCTTGCTACCTGA
CCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGAC
AACATTCCGAAAGGAATGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGCAGG
GGATCTTCGGACCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCAGATTAGCTAGTTGG
TGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATC
CGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAG
AAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTGAGATTAA
TACTCTTGGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCGAG”

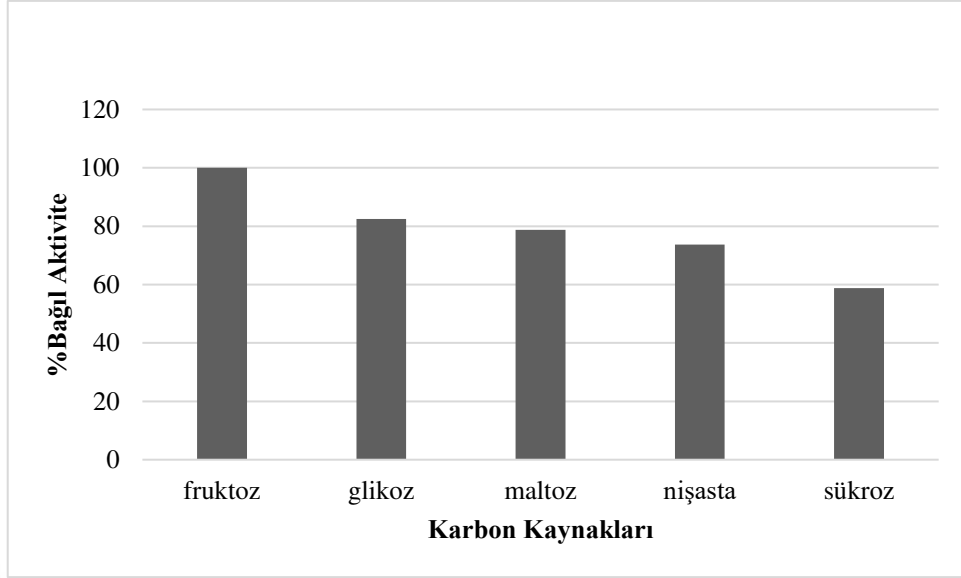
Elde edilen dizi, blast analizi yapıldıktan sonra izolatın en yakın türler ile akrabalık ilişkisini belirleyen soyağacı çizilmiş ve %93 benzerlik oranıyla yeni bir bakteri sınıfına ait olduğu görülmüştür (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Filogenetik Ağaç

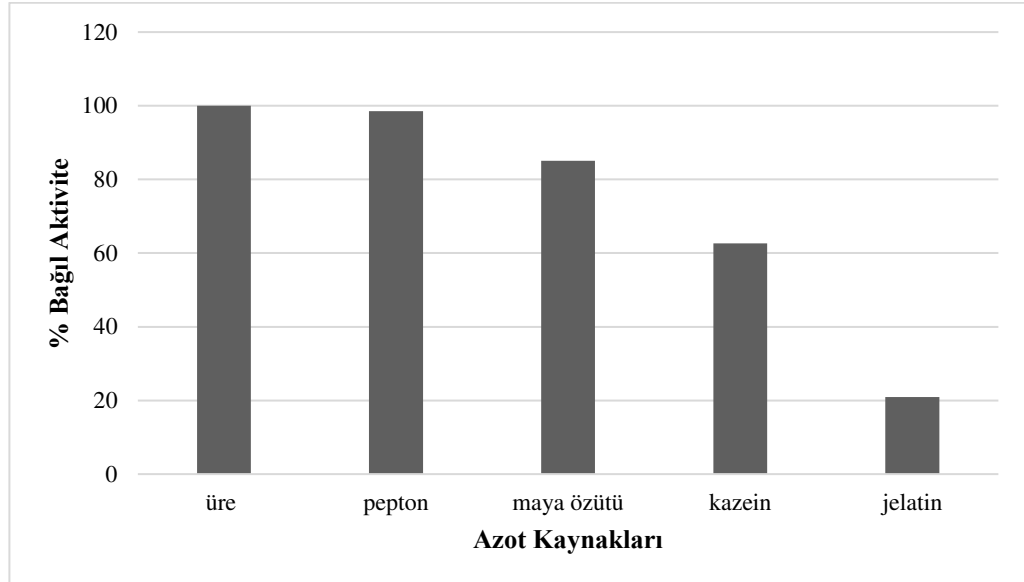
3.3. Besiyeri Bileşenlerinin Proteaz Enzim Üretimine Etkisi

Besiyerinde farklı karbon, azot ve iz elementlerin proteaz enzim üretimine etkisi, ton balığından elde edilen suş için incelenmiştir. Farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı ortamlarda üretilen proteaz enzim aktivite ölçüm sonuçlarına göre, analiz yapılan süre içerisinde en yüksek enzim sentezinin karbon kaynağı olarak fruktozun kullanıldığı ortamda gerçekleştiği belirlenmiştir. Ayrıca diğer bir karbon kaynağı olarak kullanılan glikoz ise fruktozdan sonra en yüksek aktivite gösteren karbon kaynağı olarak saptanmıştır. Farklı karbon kaynaklarına ait fruktoza göre bağlı aktivite değerleri Şekil 3.5'deki grafikte karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.5. Farklı karbon kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine oluşturduğu etkiler

Azot kaynakları da enzim üretimi üzerinde oldukça önemli bir faktördür. Azot kaynağı olarak kullanılan üre, jelatin, pepton, maya özütü ve kazein bileşenleri arasında en yüksek enzim aktiviteleri üre, pepton ve maya özütünün kullanıldığı ortamlarda elde edilmiştir. Farklı azot kaynaklarının kullanıldığı deneylerden elde edilen üreye göre bağlı aktivite sonuçları Şekil 3.6'da karşılaştırılmıştır.

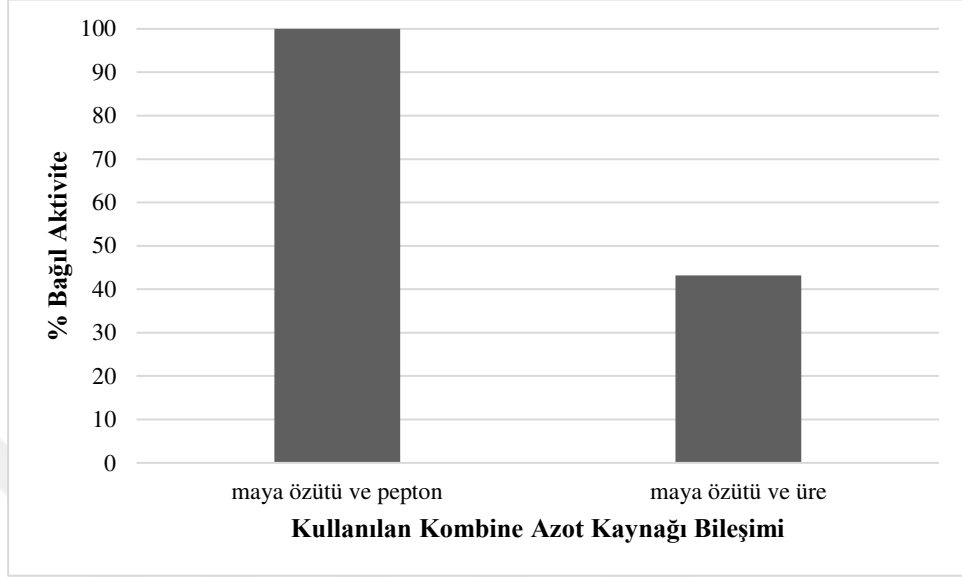


Şekil 3.6. Farklı azot kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine oluşturduğu etkiler

Literatürde yapılmış çalışmalarda da benzer karbon ve azot kaynakları besiyeri ortam bileşenleri olarak denenmiştir. Chuprom ve arkadaşlarının *Halobacterium LBU50301* türüyle yaptığı çalışmada besiyerinde azot kaynağı olarak jelatin, maya özütü, et ekstraktı, kazein, kazaminoasit, tripton kullanıldığında en yüksek aktivitenin bizim çalışmamızdan farklı olarak jelatine görüldüğü saptanmıştır (Chuprom ve ark. 2016). Chauhan ve arkadaşları *Bacillus RGR-14* türüyle yaptığı çalışmada ise besiyerinde karbon kaynağı olarak nişasta, mannitol, maltoz, gliserol, fruktoz, glikoz, sükroz ve laktozu kullanmış ve en yüksek aktiviteyi çalışmamızdan farklı olarak nişastada gözlemlemişlerdir, aynı şekilde azot kaynağı olarak soya, kazaminoasit, pepton kullanmış en yüksek aktiviteyi kazaminoasitte gözlemlemişlerdir (Chauhan ve ark. 2004). Tari ve arkadaşları *Bacillus sp.*'den yaptığı çalışmada besiyerinde karbon kaynağı olarak glikoz, glikoz şurubu, fruktoz ve maltozu kullanmış en yüksek aktiviteyi maltozda gözlemlemişlerdir. Azot kaynağı olarak ise kazein, soya ve kesilmiş süt kullanmış ve en yüksek aktiviteyi soyada elde etmişlerdir (Tari ve ark. 2006). Liu ve arkadaşları *Bacillus natto NLSSE* türüyle yaptıkları çalışmada besiyerinde karbon kaynağı olarak kristal şeker, maltoz, sükroz, gliserol, soya ve glikoz kullanmıştır. En yüksek aktiviteyi çalışmamızdan farklı olarak glikozda görüntülemişlerdir, aynı şekilde azot kaynağı olarak soya, sodyum glutamat, amonyum sülfat ve maya özütü kullanmış ve en yüksek aktiviteyi maya özütünde görüntülemişlerdir. İnorganik kaynaklar incelenirken de CaCl_2 , NaCl , KCl_2 , MgSO_4 , CuSO_4 ve K_2HPO_4 kullanılmış olup KH_2PO_4 ve MgSO_4 varlığında aktivitenin çalışmamızdan farklı olarak arttığını gözlemlemişlerdir (Liu ve ark. 2005). Mishra *Brevibacillus brevis BT2* türüyle yaptığı çalışmada besiyerinde karbon kaynağı olarak nişasta, sükroz, maltoz, glikoz ve fruktoz kullanmış olup en yüksek aktiviteyi nişastada görüntülemiştir, aynı şekilde azot kaynağı olarak soya, maya özütü, pepton, tripton ve amonyum sülfat kullanmış en yüksek aktiviteyi soyada görüntülemiştir (Mishra 2006). Yaptığımız çalışmada literatür çalışmalarıyla aynı veya benzer karbon ve azot kaynakları kullanılmış maksimum aktivite karbon kaynağı olarak fruktozda, azot kaynağı olarak ise pepton, üre ve maya özütünde görülmüştür.

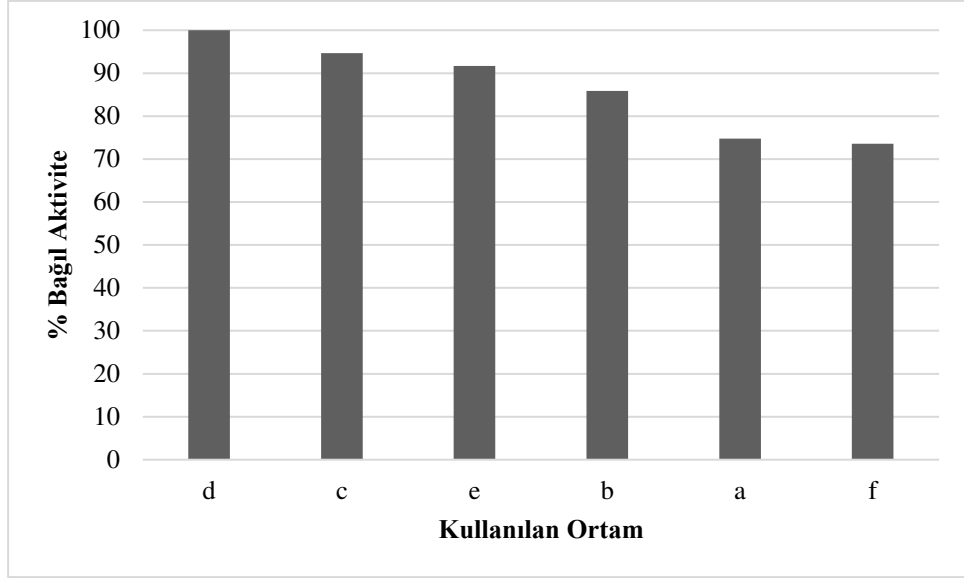
Ayrı ayrı azot kaynaklarının izole edilen suş tarafından kullanımının incelendiği deneylerde üre ile peptonun benzer bir verime ulaştığı görülmüştür. Besiyeri ortamında azot kaynağı olarak maya özütü-pepton ve maya özütü-üre içeren ortamları birlikte denenmiştir. Azot kaynağı olarak maya özütü-pepton içeren ortam kullanıldığında elde edilen enzim aktivitesi maya özütü-üre kullanılan ortama göre daha yüksek olarak bulunmuştur. Bu sebepten dolayı diğer aşamada yapılan merkezi kompozit dizayn yönteminde optimum azot

kaynağı konsantrasyonu belirlenirken pepton ve maya özütü ortam bileşenleri olarak seçilmiştir. Farklı kombine azot kaynaklarına ait bağıl aktivite değerleri Şekil 3.7’ deki grafikte karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.7. Farklı kombine azot kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine oluşturduğu etkiler

Yapılan çalışmada ton balığından elde edilen suşun enzim aktivitesi üzerine iz elementlerin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla K_2HPO_4 ’ın bulunmadığı (a), $MgSO_4$ ’ın bulunmadığı (b), $CaCl_2$ ’ün bulunmadığı (c), $ZnC_4H_6O_4$ ’ ın bulunduğu (d), $MnCl_2$ ’ün bulunduğu (e) ortamlarında enzimin bağıl aktivitesi belirlenmiştir. Ayrıca tüm bileşenlerin bulunduğu besi yeri (f) sonuçlarıyla da karşılaştırılmıştır. Tüm bu ortamlardan elde edilen bağıl aktivite sonuçları Şekil 3.8’de gösterilmiştir.



Şekil 3.8. İz elementlerin enzim aktivitesi üzerinde oluşturduğu etkiler

Şekil 3.8’de görüldüğü gibi b, c, d, e ortamlarında enzim bağli aktivitesinin arttığı gözlenmiştir ve $MgSO_4$, $CaCl_2$, KH_2PO_4 bileşenlerinin enzim üretimine olumsuz etki gösterdiği belirlenmiştir. $MnCl_2$, $ZnC_4H_6O_4$, $MnCl_2$ elementlerinin ise pozitif etki oluşturduğu gözlenmiştir.

3.4. Merkezi Kompozit Dizayn (MKD) Yöntemi Deney Sonuçları

MKD ‘ye göre tasarlanan ve Tablo 3.1’de verilen deneysel plana göre 20 adet deney yapılmıştır. Proteaz üretiminde etkin olduğu belirlenen fruktoz konsantrasyonu, maya özütü konsantrasyonu, pepton konsantrasyonu bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir. Ayrıca iz elementlerin etkisinin incelendiği deneylerde proteaz aktivitesinin artmasına neden olan 0,5 g/l $ZnC_4H_6O_4$, 0,5 g/l $MnCl_2$ tüm ortamlara ilave edilmiştir. Tablo 3.1’de deneysel tasarıma uygun şartlarda elde edilen deney sonuçları ve kuadratik modele göre beklenen sonuçlar görülmektedir.

Tablo 3.1. Besiyeri bileşiminin etkisinin incelendiği MKD tasarımı ve sonuçları

Deney No	Pepton kons, g/l	Maya özütü kons, g/l	Fruktoz kons, g/l	Deneysel Sonuç Aktivite, IU/ml	Model Sonucu Aktivite, IU/ml
1	7,5	7,5	7,5	4,966	5,30
2	12,5	7,5	7,5	6,434	6,44
3	7,5	12,5	7,5	5,813	5,94
4	12,5	12,5	7,5	7,215	7,20
5	7,5	7,5	12,5	5,820	6,11
6	12,5	7,5	12,5	6,970	7,13
7	7,5	12,5	12,5	6,461	6,74
8	12,5	12,5	12,5	7,937	7,89
9	5,80	10	10	6,077	5,60
10	14,20	10	10	7,447	7,52
11	10	5,80	10	5,885	5,55
12	10	14,20	10	6,800	6,73
13	10	10	5,80	6,649	6,52
14	10	10	14,20	8,058	7,79
15	10	10	10	6,676	7,04
16	10	10	10	7,130	7,04
17	10	10	10	7,294	7,04
18	10	10	10	6,676	7,04
19	10	10	10	7,130	7,04
20	10	10	10	7,294	7,04

Deneysel planın matematiksel modele uyumu kullanılan yazılım yardımıyla istatistiksel olarak analiz edilmiş ve sonuçlar Tablo 3.2 'de verilmiştir. İncelenen aralıklarda deneysel sonuçlarla uyumlu model ifade olarak kuadratik model seçilmiştir.

Tablo 3.2. Deneysel sonuçların model eşitliklerine uyumunun istatistiksel özeti

Kaynak	Sıralı p-değeri	Lack of Fit p-değeri	Uyarlanmış R ²	Tahmini R ²	
Lineer	< 0.0001	0.1244	0,675	0,559	Önerilmiş
2FI	0.9951	0.0727	0,602	0,122	
Kuadratik	0.0193	0.2587	0,800	0,427	Önerilmiş
Kübik	0.6436	0.0779	0,768	-7,030	

Kuadratik model denklemin uygunluğunun istatistiksel sonuçları Tablo 3.3’de görülmektedir. Model regresyon katsayısı (R^2) 0,89 olarak bulunmuştur. Üç bağımsız değişkenin incelenen aralıktaki değişimlerinin %89 oranında model tarafından tanımlanabildiği önerilmektedir. Ayrıca model için daha uygun bir tanım olan uygunlaştırılmış regresyon sabiti $\text{adj}R^2$ ifadesi 0,8 gibi yüksek bir değerde bulunması modelin açıklayıcılığının yeterli olduğunu göstermektedir.

Tablo 3.3. Bağımlı ve bağımsız değişkenlerin uygunluğunun istatistiksel verileri

Std. Sapma	0,341	R^2	0,895
Ortalama	6,736	Uyarlanmış R^2	0,800
Varyasyon Katsayısı	5,068	Tahmini R^2	0,427
Tahmini Kareler Toplamı	6,343	Uygun Keskinlik	10,741

Design Expert 8.0 (State Ease) programı yardımıyla elde edilen modelin ANOVA test sonuçları Tablo 3.4’ de görülmektedir. %95 güven aralığına göre önerilen model önemlidir. *p-değeri* 0,05’ten daha küçük olan model terimlerinin sonuç üzerine etkisinin önemli, 0,1’den büyük terimlerin ise model için önemsizdir. Buna göre incelenen üç bağımsız değişkenin lineer etkileri ile maya özütü konsantrasyonunun üstel etkisi proteaz enzimi üretimi için önemli terimlerdir. İncelenen aralıkta bu üç bağımsız değişkenin etkileşimlerinin sonuç üzerine etkisi görülmemektedir.

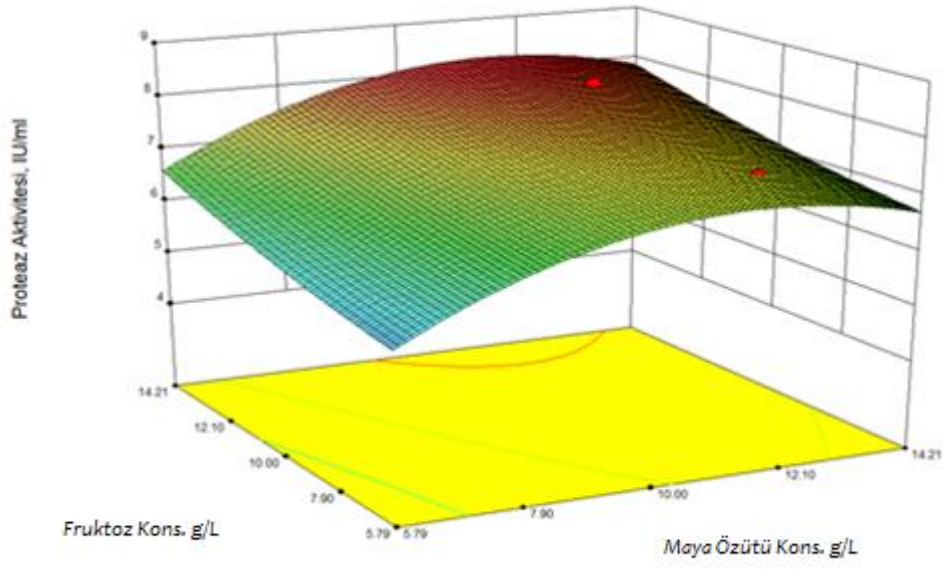
Tablo 3.4.Besiyeri bileşenleri için önerilmiş modelin ANOVA test sonuçları

	Karelerinin toplamı	Serbestlik derecesi	Karelerin ortalaması	F Değeri	p-değeri Prob > F	
Model	9,916	9	1,102	9,452	0.0008	Önemli
A-Pepton	4,455	1	4,455	38,218	0.0001	
B-YE	1,670	1	1,670	14,328	0.0036	
C-Fruktoz	1,927	1	1,927	16,535	0.0023	
AB	0,008	1	0,008	0,072	0.7937	
AC	0,007	1	0,007	0,064	0.8057	
BC	0,000	1	0,000	0,000	0.9842	
A ²	0,419	1	0,419	3,598	0.0871	
B ²	1,466	1	1,466	12,576	0.0053	
C ²	0,021	1	0,021	0,183	0.6781	
Kalıntı	1,166	10	0,117			
Veriye uyum eksikliği	0,756	5	0,151	1,846	0.2587	Önemli değil

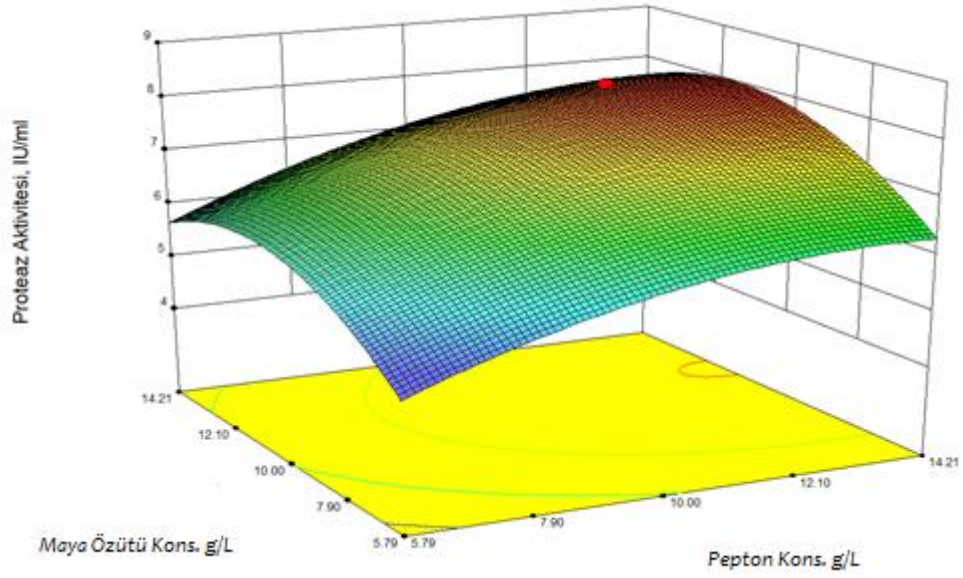
Deneyisel tasarıma göre elde edilen sonuçlara uygun olarak önerilmiş matematiksel ifade Eşitlik 3’de verilmiştir. Model ifade bağımsız değişkenlerin gerçek değerleri cinsinden tanımlanmış formudur.

$$\begin{aligned} \text{Proteaz (IU/ml)} = & -5,367 \\ & 0,771 \quad * \text{Pepton} \\ & 1,113 \quad * \text{YE} \\ & 0,080 \quad * \text{Fruktoz} \\ & 0,005 \quad * \text{Pepton} * \text{YE} \\ & -0,005 \quad * \text{Pepton} * \text{fruktoz} \\ & 0,000 \quad * \text{YE} * \text{fruktoz} \\ & -0,027 \quad * \text{Pepton}^2 \\ & -0,051 \quad * \text{YE}^2 \\ & 0,006 \quad * \text{fruktoz}^2 \end{aligned} \quad \text{E3}$$

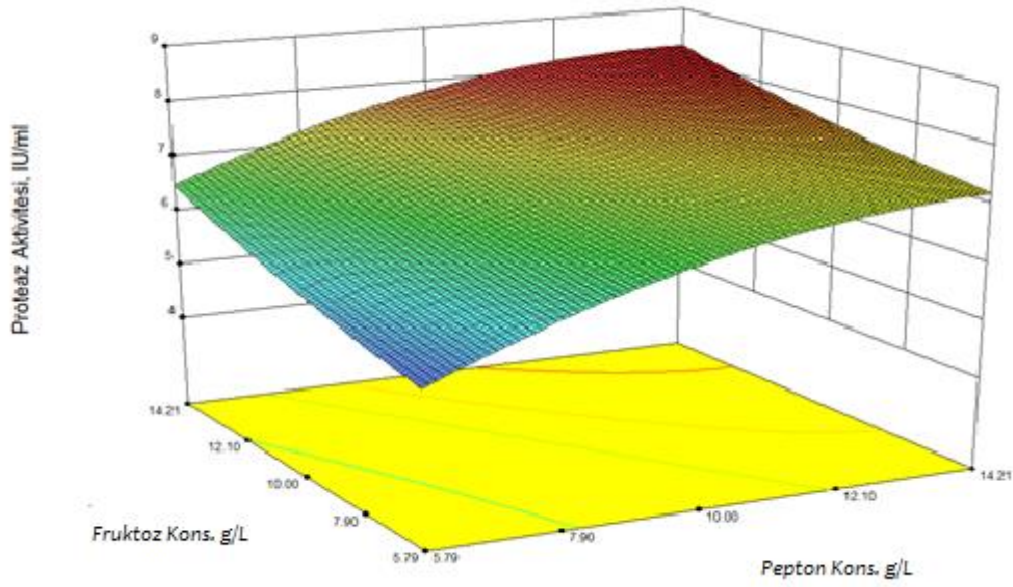
İncelenen iki bağımsız değişkenin farklı noktalarında proteaz aktivitesi üzerine etkisi kontür ve üç boyutlu grafikler yardımıyla görülebilmektedir. Şekil 3.9, 3.10, 3.11 ‘de görülen üç boyutlu grafikler ile birlikte etkileri gösterilmiştir. Kompleks azot kaynakları ve fruktoz konsantrasyonunun proteaz aktivitesine etkisi Şekil 3.9 ve 3.10’da görülmektedir. Her iki azot kaynağında da artan fruktoz konsantrasyonuyla enzim aktivitesinde artış gözlenmektedir. Maya özütünün yüksek konsantrasyonunda bir azalma gözlenirken peptonun yüksek konsantrasyonlarında artış eğiliminde bir azalma gözlenmektedir. İki azot kaynağının konsantrasyonundaki değişimin proteaz aktivitesine etkisi Şekil 3.10’da görülmektedir. Fruktoz ile olan eğrilerdeki değişime benzer bir eğilim bu grafikte de görülmektedir. Düşük konsantrasyonlarda azot kaynaklarındaki artış ile enzim aktivitesinde artış gözlenmektedir. Peptonun üst konsantrasyonlarında bu artış dururken maya özütünün üst konsantrasyonunda aktivitede azalma gözlenmektedir.



Şekil 3.9. Fruktoz ve maya özüğü konsantrasyonuna göre proteaz aktivitesinin zamanla değişimi



Şekil 3.10. Pepton ve maya özüğü konsantrasyonuna göre proteaz aktivitesinin zamanla değişimi



Şekil 3.11. Fruktoz ve pepton konsantrasyonuna göre proteaz aktivitesinin zamanla değişimi

Elde edilen model denklemin Myers ve Montgomery tarafından önerilen sayısal optimizasyon yöntemiyle maksimum proteaz aktivitesi (8,30 IU/ml) için incelenen aralıktaki bağımsız değişkenlerin değerleri 14,22 g/l pepton, 11,190 g/l maya özütü, 14,22 g/l fruktoz olarak belirlenmiştir.

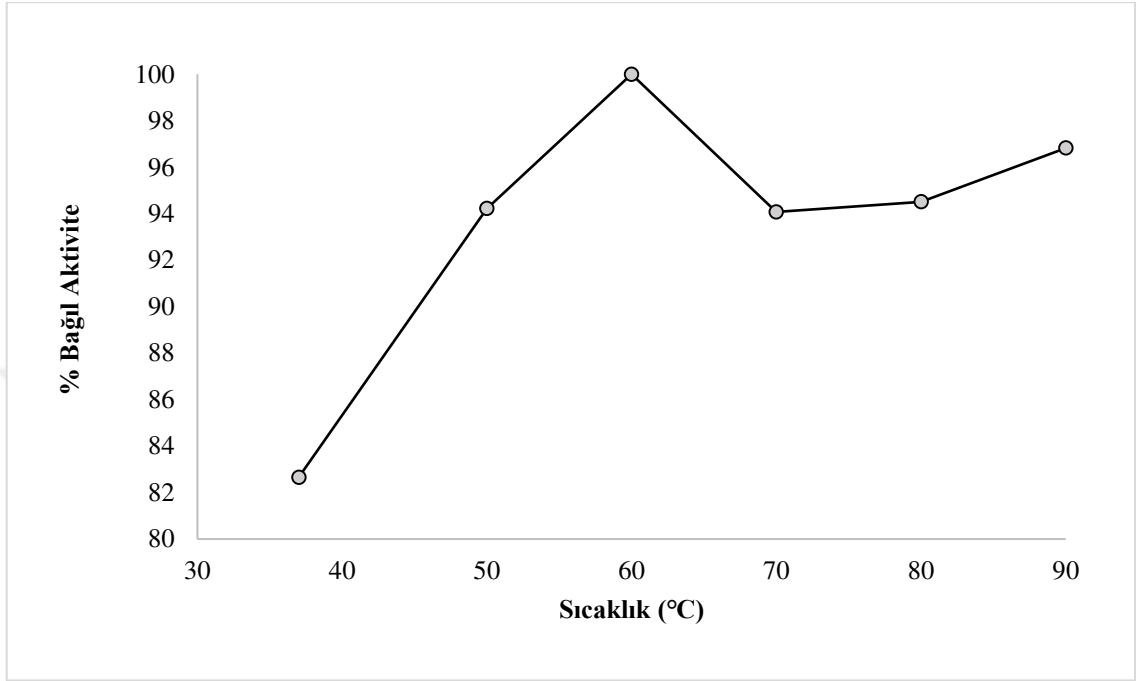
İz elementler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda da kullanılacak optimum besiyeri bileşimi 0,5 g/l $ZnCl_2$, 0,5 g/l $MnCl_2$, 14,22 g/l pepton, 11,190 g/l maya özütü, 14,22 g/l fruktoz olarak belirlenmiş olup bu aşamadan sonraki bütün çalışmalarda bu besiyeri kullanılmıştır. Optimum besiyerinin belirlenmesine müteakip enzimin optimum sıcaklık ve pH değerlerini belirlemek amaçlı enzim karakterizasyonu yapılmıştır.

3.5. Enzim Karakterizasyon Sonuçları

Ton balığından elde edilen suş, optimum besiyerine ekilerek 37 °C’da inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası enzim oda sıcaklığında 12000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenerek diğer hücrelerden uzaklaştırılarak süpernatant kısımda kalan enzimlerle farklı sıcaklık ve pH aralıklarında enzim aktivitesi incelenmiştir.

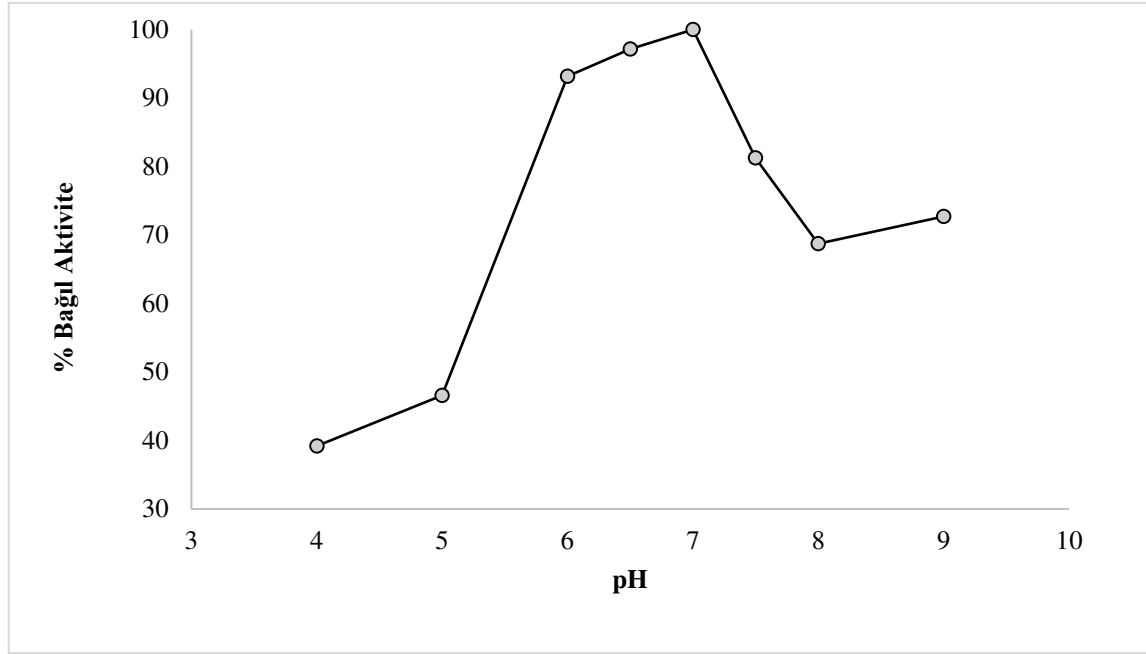
Ton balığından elde edilen suşun proteaz enzim aktivite tayini yapılırken enzim ve % 0,6’lık kazein substratı 37- 90 °C sıcaklıklar arasında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin 60°C olduğu

belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda farklı sıcaklıklarda belirlenen enzim aktivite değerleri Şekil 3.12’deki grafikte gösterilmiştir.



Şekil 3.12. Farklı sıcaklıklarda ölçülen enzim aktivite değerleri

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek amacıyla enzim ve substrat pH 4,0-9,0 aralığında farklı tamponlar kullanılarak hazırlanan %0,6’lık kazein çözeltisi 60 °C’ da 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu çalışma sonucunda farklı pH değerlerinde belirlenen enzim aktivite değerleri Şekil 3.13’deki grafikte gösterilmiştir. İnkübasyon sonrası en yüksek enzim aktivitesinin pH 7,0’da olduğu saptanmıştır.



Şekil 3.13. Farklı pH değerlerinde ölçülen enzim aktivite değerleri

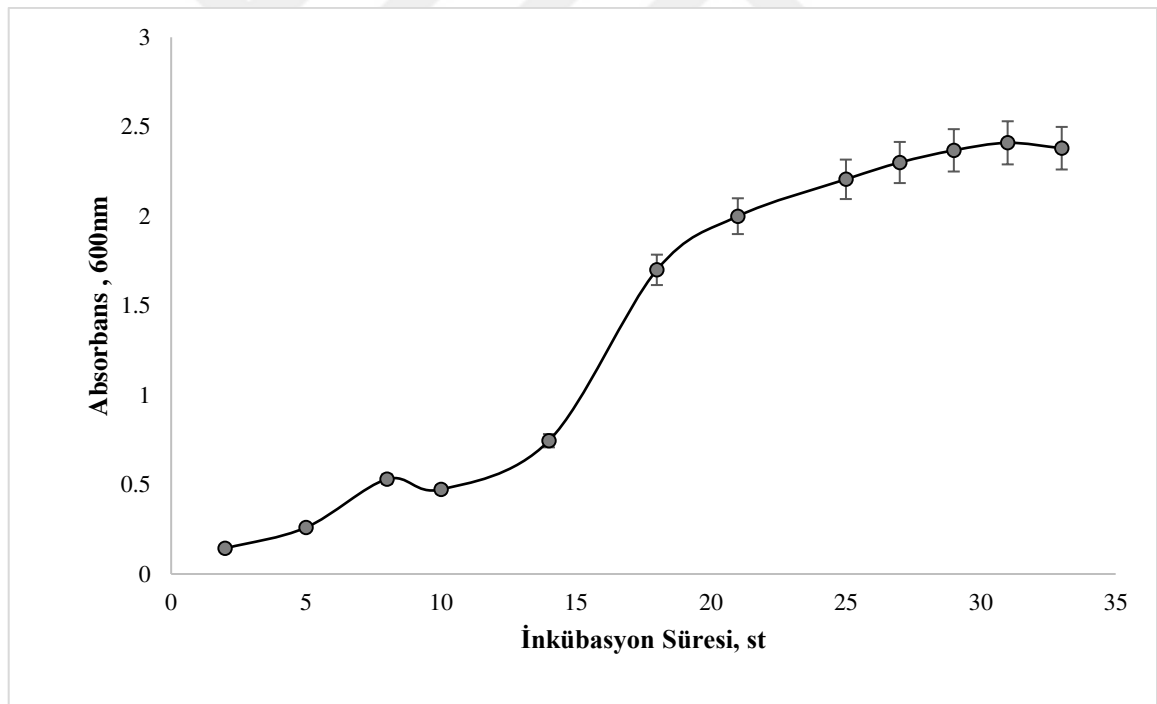
Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *Neanthes japonica* 'dan elde ettikleri NJP adlı enzimin pH 7-10 aralığında aktivite gösterdiğini saptamış ve optimum pH ve sıcaklık değerlerini çalışmamızdan farklı şekilde 9 ve 40°C olarak bulmuştur (Wang ve ark. 2011). Cha ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *Pleurotus eryngii*'den elde ettikleri fibrinolitik enzimin pH 4-6 aralığında aktivite gösterdiğini ve optimum pH, sıcaklık değerlerini ise çalışmamızdan farklı şekilde 5 ve 40°C olarak bulmuşlardır (Cha ve ark. 2010). Shirasaka ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *Aspergillus oryzae* KSK-3'den saflaştırılan fibrinolitik enzimin pH 4-9 aralığında stabil olduğunu ve optimum pH ve sıcaklık değerlerinin ise çalışmamızdan farklı şekilde 6 ve 50°C olarak bulunmuştur (Shirasaka ve ark. 2012). Tian ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada fibrinolitik etkiye sahip enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık ve pH değerleri çalışmamızla benzer şekilde 40 °C ve 7 olarak bulunmuştur (Tian ve ark. 2015). Hahn ve arkadaşları ise *Tenedora sinensis*'ten elde ettikleri fibrolaz enziminin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık ve pH değerlerini çalışmamızla benzer şekilde 30 °C ve 7 olarak bulmuştur (Hahn ve ark. 1999). Mukharjee ve Rai tarafından yapılan çalışmada *Bacillus Sp. AS-S20-I* türü ile üretilen babifibraz adlı enzimin optimum aktivite sıcaklık ve pH değerleri çalışmamıza benzer şekilde 37 °C ve 7,4 olarak bulunmuştur (Mukherjee ve Rai 2011). Zhang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada elde ettikleri optimum

sıcaklık ve pH değerleri çalışmamıza benzer şekilde 45 °C ve 7,8 olarak bulunmuştur (Zhang ve ark. 2007).

Literatür araştırmasında farklı kaynaklardan elde edilen enzimlerin farklı sıcaklık ve pH değerinde maksimum aktivite göstermektedir. Çalışmada ham enzim kullanılarak yapılan deneylerde nötral pH 'larda ve nispeten yüksek sıcaklıklarda maksimum enzim aktivitesi elde edilmiştir.

3.6. Hücre Büyüme Eğrisi

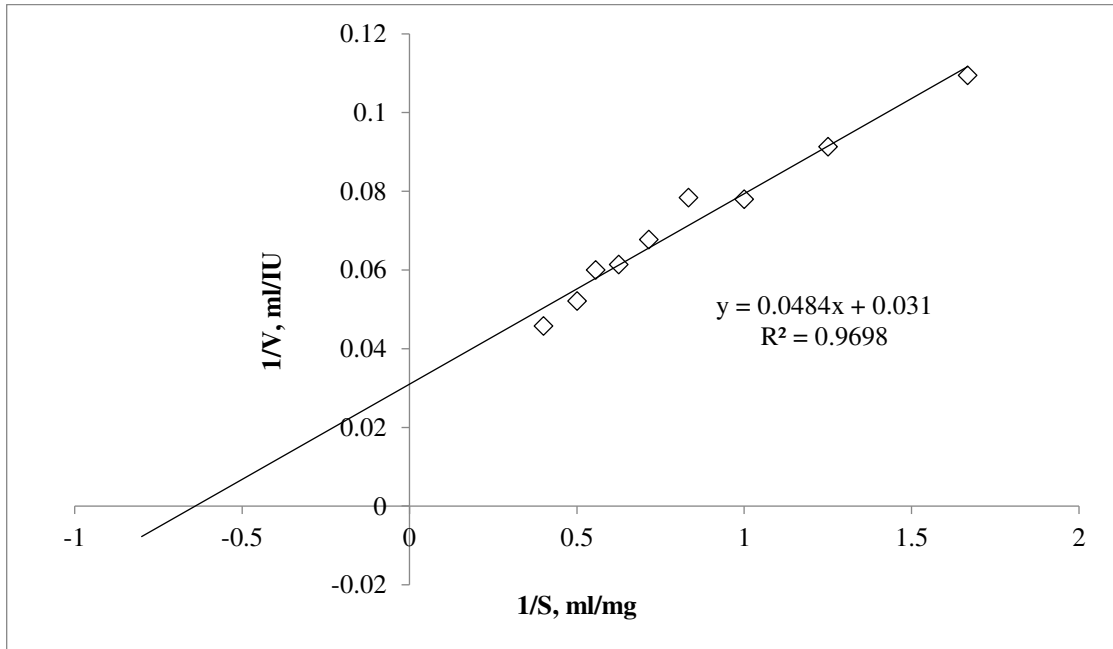
Ton balığından izole edilen suşun büyüme eğrisi oluşturmak amacıyla 32 saat boyunca belirli saat aralıklarında alınan örneklerden yapılan ölçümler sonucu elde edilen büyüme eğrisi Şekil 3.14'de verilmiştir. Bu grafiğe göre izolat 25.saat itibari ile logaritmik büyümesini tamamlamaktadır. 25. Saatten sonra ise mikroorganizma durağan fazda devam etmektedir.



Şekil 3.14. Mikroorganizmaya ait büyüme eğrisi

3.7. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

İzole edilen suş kullanılarak elde edilen ham proteaz enziminin 0,4 - 2,5 mg/ml kazein varlığında Michaelis-Menten kinetik parametreleri; K_m ve V_{max} , Lineweaver-Burk grafiği çizilerek hesaplanmıştır. K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 1,5615 mg/ml ve 32,25 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{dk}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Literatürde yapılan çalışmalarda Majumdar ve arkadaşları K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 0,39 mM ve 14,3 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{dk}^{-1}$ olarak bulmuştur (Majumdar ve ark. 2014), Cha ve arkadaşları yaptıkları çalışmada K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,18 mM ve 53,5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{dk}^{-1}$ olarak bulmuştur (Cha ve ark. 2010). İşmarcı'nın yaptığı çalışmada K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 0,77 mg/ml ve 3,58 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{dk}^{-1}$ olarak bulmuştur (İşmarcı 2014). Yapılan literatür araştırması sonucu elde edilen V_{max} değerinin genellikle diğer çalışmalara göre büyük veya yaklaşık olduğu sonucuna varılmıştır. V_{max} değeri enzimin aktivite gösterdiği maksimum hız olarak tanımlandığından elde edilen enzimin aktivitesinin yüksek olduğu sonucuna varılır. Elde edilen K_m değerleri incelendiğinde ise genellikle literatürdeki K_m değerlerinden küçük olduğu görülmüştür. K_m değeri enzimin substrattan ayrılma eğilimini ifade ettiğinden K_m değerinin küçük olması enzim aktivitesi için olumlu bir sonuca götürür. Hesaplama işleminin yapıldığı Lineweaver-Burk grafiği Şekil 3.15'de verilmiştir.



Şekil 3.15. Proteaz Enziminin kazein substratıyla elde edilen Lineweaver-Burk Grafiği

4.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Farklı fermentatif protein kaynaklarından alınan örnekler kullanılarak elde edilen bakteriyel bir suştan fibrinolitik proteaz enzim üretiminin araştırıldığı bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir;

1. Proteince zengin kaynaklar kullanılarak toplamda 20 tane suş izole edilmiştir. Bu suşların 18 tanesinin proteaz ürettiği 2 tanesinin proteaz üretmediği belirlenmiştir.
2. Fibrinolitik proteaz üreten 18 suş için skim milk katı enzim üretim ortamında yapılan analizler sonucu fermente ton balığı, süt, peynir ve sucuk kaynaklı suşların en yüksek aktivite gösterdikleri belirlenmiştir.
3. Belirlenen suşların kanlı agar katı ortamına uygulandığında tek aktivite gösteren suş ton balığı kaynaklı suş olmuştur. Burada kanlı agar katı besiyeri üzerinde temiz alanlar oluşturarak enzim aktivitesinin varlığı gözlenmiştir.
4. Yine bu suşlar fibrin-plate katı besiyeri ortamına uygulandığında en yüksek aktiviteyi ton balığı kaynaklı suşun gösterdiği görülmüştür. Bu gözlemden katı besiyeri ortamındaki fibrin yapıyı enzim hidrolize ederek plate üzerinde temiz alanlar oluşturmuştur. Buda suşun sahip olduğu fibrinolitik proteaz aktivitesini kanıtlar niteliktedir.
5. Seçilen ton balığı kaynaklı suşun belirlenmesi ve kimliklendirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan genetik test 16S rRNA analizi kullanılmıştır. 16S rRNA analizi sonucuna göre suşun %93 oranında benzer olduğu tespit edilmiştir.
6. Enzim üretiminin maksimum olduğu sıcaklık ve pH değerleri belirlenmesi için yapılan analizde, belirlenen suşun 60 °C'da ve 7.0 pH'da maksimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Buda elde edilen suşun kısmen yüksek sıcaklıklarda dirençli olduğu ve nötral pH seviyelerinde optimum olduğunu göstermiştir.
7. Enzim üretimi için kullanılan besiyerinde karbon, azot ve iz elementlerin enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi için karbon kaynağı olarak; glikoz, maltoz, nişasta, fruktoz, sükroz kullanılmıştır. Karbon kaynaklarında en yüksek proteaz aktivitesi fruktoz kullanıldığında elde edilmiştir. Azot kaynağı olarak ise üre, jelatin, pepton, maya özütü, kazein kullanılmıştır. Suşun yüksek aktivite gösterdiği

ortam karbon kaynağı fruktoz iken azot kaynağı ise maya özütü ve pepton olduğu gözlenmiştir.

8. Suş üzerine iz elementlerin etkisi incelendiğinde $MgSO_4$, $CaCl_2$, KH_2PO_4 bileşenlerinin enzim üretimine olumsuz etki gösterdiği gözlenmiş olup $ZnC_4H_6O_4$, $MnCl_2$ elementlerinin ise pozitif etki oluşturduğu belirlenmiştir.
9. Bu aşamalara ek olarak RSM olarak bilinen merkezi dizayn optimizasyon yöntemiyle suş için optimum besiyeri; 0,5 g/l $ZnC_4H_6O_4$, 0,5 g/l $MnCl_2$, 14,22 g/l pepton, 11,190 g/l maya özütü, 14,22 g/l fruktoz olarak belirlenmiştir.
10. Suşun hücre büyüme eğrisinde logaritmik artışın 15-25. saatler arasında olduğu, durağan fazın 30. saatten sonra başladığı gözlenmiştir.
11. Ham enzim için yapılan kinetik parametrelerin incelenme çalışmasında K_m ve V_{max} kinetik değerleri sırasıyla 1,5615 mg/ml ve $32.25 \mu g \cdot ml^{-1} \cdot dk^{-1}$ olarak bulunmuştur.

5. KAYNAKLAR

1. Afifah, D. N., Sulchan, M., Syah, D., ve Suhartono, M. T. (2015). The use of red Oncom powder as potential production media for fibrinolytic protease derived from *Bacillus licheniformis* RO3. *Procedia Food Science*, 3, 453-464.
2. Anwar, A., ve Saleemuddin, M. (1998). Alkaline proteases: a review. *Bioresource technology*, 64(3), 175-183.
3. Avhad, D. N., ve Rathod, V. K. (2015). Ultrasound assisted production of a fibrinolytic enzyme in a bioreactor. *Ultrasonics sonochemistry*, 22, 257-264.
4. AYTEKIN, O. (2016). Uses of Proteolytic Enzymes on Treatment and Effects on Cow's Mastitis Treatment. *Van Veterinary Journal*, 27(1).
5. Bi, Q., Chu, J., Feng, Y., Jiang, Z., Han, B., ve Liu, W. (2013). Purification and characterization of a new serine protease with fibrinolytic activity from the marine invertebrate, *Urechis unicinctus*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 170(3), 525-540.
6. Bugg, T. D. (2012). *Introduction to enzyme and coenzyme chemistry*. John Wiley ve Sons.
7. Budzynski, A. Z., Knight, L. C., ve Hasan, A. A. (1994). *U.S. Patent No. 5,288,490*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
8. Crerar, L. D. (2005). Bats: Biology, Behavior and Folklore. *The American Biology Teacher*, 67(8), 509.
9. Cha, W. S., Park, S. S., Kim, S. J., ve Choi, D. (2010). Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solid-state conditions using corn cob. *Bioresource technology*, 101(16), 6475-6481.
10. Chauhan, B., ve Gupta, R. (2004). Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14. *Process Biochemistry*, 39(12), 2115-2122.
11. Cheng, Q., Xu, F., Hu, N., Liu, X., ve Liu, Z. (2015). A novel Ca²⁺-dependent alkaline serine-protease (Bvsp) from *Bacillus* sp. with high fibrinolytic activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 117, 69-74.
12. Choi, J. H., Sapkota, K., Kim, S., ve Kim, S. J. (2014). Starase: a bi-functional fibrinolytic protease from hepatic caeca of *Asterina pectinifera* displays antithrombotic

- potential. *Biochimie*, 105, 45-57.
13. Choi, J. H., Sapkota, K., Park, S. E., Kim, S., ve Kim, S. J. (2013). Thrombolytic, anticoagulant and antiplatelet activities of codiase, a bi-functional fibrinolytic enzyme from *Codium fragile*. *Biochimie*, 95(6), 1266-1277.
 14. Collins, J. J., ve Works, H. S. T. (2008). Systemic Enzyme Therapy.
 15. Contreras, A., Paape, M. J., Miller, R. H., Corrales, J. C., Luengo, C., ve Sánchez, A. (2009). Effect of bromelain on milk yield, milk composition and mammary health in dairy goats. *Tropical animal health and production*, 41(4), 493-498.
 16. Chuprom, J., Bovornreungroj, P., Ahmad, M., Kantachote, D., ve Dueramae, S. (2016). Approach toward enhancement of halophilic protease production by *Halobacterium* sp. strain LBU50301 using statistical design response surface methodology. *Biotechnology Reports*, 10, 17-28.
 17. Daniushchenkova, N. M., Berenshtein, T. F., Kardovich, G. A., ve But-Gusdaim, A. M. (1982). Efficacy of antibiotics and proteolytic enzymes in the treatment of patients with chronic osteomyelitis. *Antibiotiki*, 27(3), 196-199.
 18. Değer, N. (2009). Akut Miyokard İnfarktüsünde Trombolitik Tedavi Kime, Ne Zaman, Nasıl Yapılmalıdır?. *Türkiye Klinikleri Journal of Cardiology Special Topics*, 2(2), 38-44.
 19. Dittmar, F. W., ve Dittmar, F. W. (2000). Enzyme therapy-a method of immune therapy for women with a history of immunologically-induced habitual abortion. *Forum Medizin Verlagsgesellschaft, Forum Immunologie*.
 20. Dubey, V. K., Pande, M., Singh, B. K., ve Jagannadham, M. V. (2007). Papain-like proteases: Applications of their inhibitors. *African Journal of Biotechnology*, 6(9).
 21. e Silva, G. M. D. M., Marques, D. D. A. V., Porto, T. S., Lima Filho, J. L., Teixeira, J. A. C., Pessoa-Júnior, A., ve Porto, A. L. F. (2013). Extraction of fibrinolytic proteases from *Streptomyces* sp. DPUA1576 using PEG-phosphate aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, 339, 52-57.
 22. Fallis, A. (2013). Lippincott Illustrated Reviews: Pharmacology. *Journal of Chemical Information and Modeling*.
 23. Friedrich, F. (2003). Wobenzym® in the treatment of chronic pelvic inflammatory disease. *Pharmascript Report, Kathi-Kobus-Steig*, 1.

24. Gençkal, H., ve Tari, C. (2006). Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 703-710.
25. Girón, M. E., Salazar, A. M., Aguilar, I., Pérez, J. C., Sánchez, E. E., Arocha-Piñango, C. L., ve Guerrero, B. (2008). Hemorrhagic, coagulant and fibrinolytic activities of crude venom and fractions from mapanare (*Bothrops colombiensis*) snakes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology ve Pharmacology*, 147(1), 113-121.
26. Gupta, R., Beg, Q., Khan, S., ve Chauhan, B. (2002). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(4), 381-395.
27. Hahn, B. S., Cho, S. Y., Wu, S. J., Chang, I. M., Baek, K., Kim, Y. C., ve Kim, Y. S. (1999). Purification and characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from *Tenodera sinensis* (praying mantis). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1430(2), 376-386.
28. Van Holde, K. E., Johnson, W. C., ve Ho, P. S. (2006). Principles of physical biochemistry.
29. Kato, T., Yamagata, Y., Arai, T., ve Ichishima, E. (1992). Purification of a new extracellular 90-kDa serine proteinase with isoelectric point of 3.9 from *Bacillus subtilis* (natto) and elucidation of its distinct mode of action. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56(7), 1166-1168.
30. Kim, W., Choi, K., Kim, Y., Park, H., Choi, J., Lee, Y., ve Lee, S. (1996). Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(7), 2482-2488.
31. Kotb, E. (2013). Activity assessment of microbial fibrinolytic enzymes. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(15), 6647-6665.
32. Liu, J., Xing, J., Chang, T., Ma, Z., ve Liu, H. (2005). Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods. *Process Biochemistry*, 40(8), 2757-2762.
33. Lu, F., Lu, Z., Bie, X., Yao, Z., Wang, Y., Lu, Y., ve Guo, Y. (2010). Purification and characterization of a novel anticoagulant and fibrinolytic enzyme produced by endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Thrombosis Research*, 126(5), e349-e355.

34. Majumdar, S., Sarmah, B., Gogoi, D., Banerjee, S., Ghosh, S. S., Banerjee, S., ve Mukherjee, A. K. (2014). Characterization, mechanism of anticoagulant action, and assessment of therapeutic potential of a fibrinolytic serine protease (Brevithrombolase) purified from *Brevibacillus brevis* strain FF02B. *Biochimie*, 103, 50-60.
35. Marder, V. J., ve Novokhatny, V. (2010). Direct fibrinolytic agents: biochemical attributes, preclinical foundation and clinical potential. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8(3), 433-444.
36. Mishra, V. K. (2016). Optimization of thermotolerant alkaline protease production from *Brevibacillus brevis* strain BT2 using surface response methodology. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 7, 87-94.
37. Mukhametova, L. I., Aïsina, R. B., Lomakina, G., ve Varfolomeev, S. D. (2002). Characterization of urokinase type plasminogen activator modified by phenylglyoxal. *Bioorganicheskaia khimiia*, 28(4), 308-314.
38. Mukherjee, A. K., ve Rai, S. K. (2011). A statistical approach for the enhanced production of alkaline protease showing fibrinolytic activity from a newly isolated Gram-negative *Bacillus* sp. strain AS-S20-I. *New biotechnology*, 28(2), 182-189.
39. Mukherjee, A. K., Rai, S. K., Thakur, R., Chattopadhyay, P., ve Kar, S. K. (2012). Bafibrinase: A non-toxic, non-hemorrhagic, direct-acting fibrinolytic serine protease from *Bacillus* sp. strain AS-S20-I exhibits in vivo anticoagulant activity and thrombolytic potency. *Biochimie*, 94(6), 1300-1308.
40. Narasaki, R., Kuribayashi, H., Shimizu, K., Imamura, D., Sato, T., ve Hasumi, K. (2005). Bacillolysin MA, a novel bacterial metalloproteinase that produces angiostatin-like fragments from plasminogen and activates protease zymogens in the coagulation and fibrinolysis systems. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 14278-14287.
41. Park, J. W., Park, J. E., Choi, H. K., Jung, T. W., Yoon, S. M., ve Lee, J. S. (2013). Purification and characterization of three thermostable alkaline fibrinolytic serine proteases from the polychaete *Cirriformia tentaculata*. *Process Biochemistry*, 48(5-6), 979-987.
42. Patel, G. K., Kawale, A. A., ve Sharma, A. K. (2012). Purification and physicochemical characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from latex of a medicinal herb *Euphorbia hirta*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 52, 104-111.
43. Patel, R., Dodia, M., ve Singh, S. P. (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. *Process*

- Biochemistry*, 40(11), 3569-3575.
44. Percival, M. (1999). Understanding the natural management of pain and inflammation. *Clin. Nutr. Insights*, 4, 1-5.
 45. Raafat, A. I., Araby, E., ve Lotfy, S. (2012). Enhancement of fibrinolytic enzyme production from *Bacillus subtilis* via immobilization process onto radiation synthesized starch/dimethylaminoethyl methacrylate hydrogel. *Carbohydrate polymers*, 87(2), 1369-1374.
 46. Rai, S. K., ve Mukherjee, A. K. (2010). Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzziprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochemical Engineering Journal*, 48(2), 173-180.
 47. Raksakulthai, R., ve Haard, N. F. (2003). Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: a review.
 48. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., ve Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(3), 597-635.
 49. Scheindlin, S. (2007). Clinical enzymology: Enzymes as medicine. *Molecular interventions*, 7(1), 4.
 50. Sedat, K. "Katı faz fermantasyon yöntemi ile *Bacillus licheniformis* atcc 14580'den proteaz üretimi üzerine bazı parametrelerin araştırılması
 51. Shen, H. B., ve Chou, K. C. (2009). Identification of proteases and their types. *Analytical biochemistry*, 385(1), 153-160.
 52. Shirasaka, N., Naitou, M., Okamura, K., Fukuta, Y., Terashita, T., ve Kusuda, M. (2012). Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. *Mycoscience*, 53(5), 354-364.
 53. Singh, T. A., Devi, K. R., Ahmed, G., ve Jeyaram, K. (2014). Microbial and endogenous origin of fibrinolytic activity in traditional fermented foods of Northeast India. *Food research international*, 55, 356-362.
 54. Solorazano del Rio, H. E. (1994). Systemic enzyme therapy-supplement to the art of getting well. Programa de Estudios de Medicinas Alternativas, Universidad de Guadalajara, Guadalajara. *Jal. Mexico*.
 55. Storozhuk, V. T., Shamolina, I. I., ve Lobova, A. B. (1985). Immobilized papain in the treatment of acute destructive lactation mastitis. *Vestnik khirurgii imeni II*

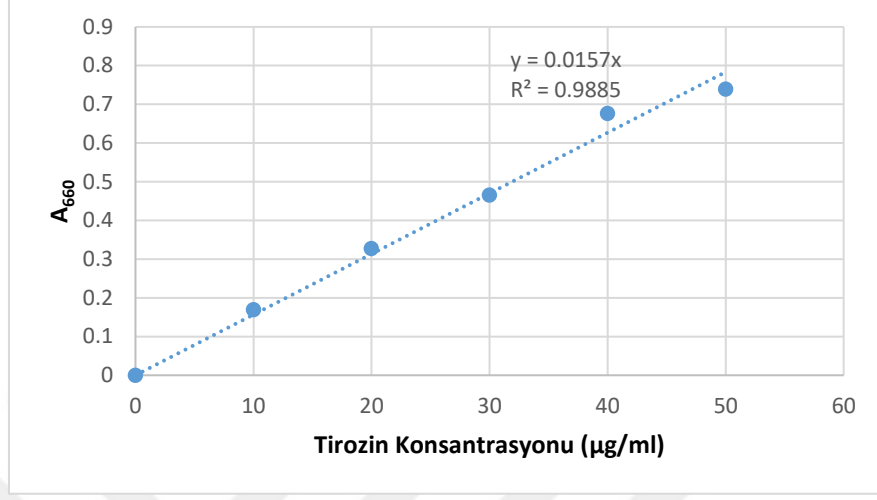
Grekova, 135(10), 42-46.

56. Tari, C., Genckal, H., ve Tokatlı, F. (2006). Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. *Process Biochemistry*, 41(3), 659-665.
57. Takami, H., Akiba, T., ve Horikoshi, K. (1989). Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30(2), 120-124.
58. Tian, Z., Li, B., Guo, L., Wu, M., Fu, T., Cheng, H., and Zhu, H. (2015). Purification and biochemical characterization of a novel fibrinolytic enzyme, PSLTro01, from a medicinal animal *Porcellio scaber* Latreille. *International journal of biological macromolecules*, 80, 536-546.
59. Tibazarwa, K. B. ve Damasceno, A. A. (2014). Hypertension in developing countries. *Canadian Journal of Cardiology*. 30(5): 527-533.
60. Turan, G. Koagülasyon Mekanizmaları ve Antikoagülan İlaçlar.
61. URL-1. (n.d.). “Enzimlerin kullanım Alanları”. Retrieved from <http://jes.ksu.edu.tr/public/journals/1/backIssues/sayi/eski/sayi/91/91.1219.pdf>, Kasım 2017.
62. URL-2, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Basic Local Alignment Search Tool, Kasım 2017.
63. Wood, A. P., Aurikko, J. P., ve Kelly, D. P. (2004). A challenge for 21st century molecular biology and biochemistry: what are the causes of obligate autotrophy and methanotrophy?. *FEMS microbiology reviews*, 28(3), 335-352.
64. Vijayaraghavan, P., ve Vincent, S. P. (2015). A low cost fermentation medium for potential fibrinolytic enzyme production by a newly isolated marine bacterium, *Shewanella* sp. IND20. *Biotechnology Reports*, 7, 135-142.
65. Wang, S., Deng, Z., Li, Q., Ge, X., Bo, Q., Liu, J., ... ve Hong, M. (2011). A novel alkaline serine protease with fibrinolytic activity from the polychaete, *Neanthes japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 159(1), 18-25.
66. Wolfe, M. S. (2009). Intramembrane-cleaving proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 284(21), 13969-13973.
67. Xiao-Lan, L., Lian-xiang, D., Fu-ping, L., Xi-qun, Z., ve Jing, X. (2005). Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Rhizopus chinensis* 12. *Applied microbiology and biotechnology*, 67(2), 209-214.

68. Zhang, Y., Cui, J., Zhang, R., Wang, Y., ve Hong, M. (2007). A novel fibrinolytic serine protease from the polychaete *Nereis (Neanthes) virens* (Sars): Purification and characterization. *Biochimie*, 89(1), 93-103.
69. İşmarcı, M. (2014) *Bacillus megaterium*'dan Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (2014) Gazi Üniversitesi FBE. Yayınlanmış YT. Ankara.



EKLER



Şekil E.1. Tirozin Standart Grafiği

ÖZGEÇMİŞ

Betül DÜZLEME

Doğum tarihi: 01.07.1992

Doğum yeri: Elazığ

E-posta: betlumay@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

- ❖ 2014-2019 : Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı
- ❖ 2014-2016: Fırat Üniversitesi, Sağlık Meslek Yüksekokulu, Tıbbi görüntüleme Teknikleri Bölümü
- ❖ 2010-2014: Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü
- ❖ 2006-2010: Ahmet Kabaklı Anadolu Öğretmen Lisesi