

**YENİ İZOLAT *Bacillus subtilis* E6-5 SUŞUNDAN PROTEAZ: ÜRETİM
KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU, KISMİ SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE DERİ ENDÜSTRİSİNDEKİ POTANSİYEL
UYGULAMALARI**

Behice ZEREN



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YENİ İZOLAT *Bacillus subtilis* E6-5 SUŞUNDAN PROTEAZ: ÜRETİM
KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU, KISMİ SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE DERİ ENDÜSTRİSİNDEKİ POTANSİYEL
UYGULAMALARI**

Behice ZEREN
0000-0003-1163-9793

Prof. Dr. Elif DEMİRKAN
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2020
Her Hakkı Saklıdır.

TEZ ONAYI

Behice ZEREN tarafından hazırlanan “YENİ İZOLAT *Bacillus subtilis* E6-5 SUŞUNDAN PROTEAZ: ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU, KISMİ SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU ve DERİ ENDÜSTRİSİNDEKİ POTANSİYEL UYGULAMALARI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Başkan : Prof. Dr. Dilek KUT
0000-0002-9059-0838
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Mühendislik Fakültesi,
Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı

İmza

Üye : Prof. Dr. Elif DEMİRKAN
0000-0002-5292-9482
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye : Doç. Dr. Gamze YILDIZ
0000-0001-6461-0850
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER
0000-0002-0290-1166
Bursa Teknik Üniversitesi,
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi,
Biyomühendislik Bölümü

İmza

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Münevver Müge ÇAĞAL
0000-0002-1786-1216
Bursa Teknik Üniversitesi,
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi,
Biyomühendislik Bölümü

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN Y.
Enstitü Müdürü

.../.../....

B.U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

18/08/2020

Behice ZEREN

ÖZET

Doktora Tezi

YENİ İZOLAT *Bacillus subtilis* E6-5 SUŞUNDAN PROTEAZ: ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU, KISMİ SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE DERİ ENDÜSTRİSİNDEKİ POTANSİYEL UYGULAMALARI

Behice ZEREN

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Bu çalışmada, *Bacillus subtilis* E6-5 suşu proteaz kaynağı olarak kullanılmış ve farklı besi yerlerinde proteaz üretim kapasitesi açısından test edilmiştir. Proteaz üretimi için ortamın optimizasyonu besinsel ve fiziksel koşullar değiştirilerek elde edilmiştir. Maksimum proteaz üretimi, besi yeri bileşiminde, sükröz (karbon kaynağı), tripton (azot kaynağı) BaCl₂ + CaCl₂ (metal iyonları) kullanılarak elde edilmiştir. Maksimum proteaz üretimi için optimal fiziksel parametreler 35°C, pH 8.0, 150 rpm çalkalanma hızı, %4 inokülasyon miktarı, 72 saat inokülasyon yaşı olarak belirlenmiştir. Optimal besinsel ve fiziksel parametreler kombine edilerek elde edilen yeni modifiye ortamda proteaz üretiminde 5 kat bir artış sağlanmıştır. Saflaştırılmış proteazın optimal sıcaklık ve pH değeri sırasıyla 60°C ve 7.0 olarak belirlenmiştir. Termostabilite çalışmaları, enzimin termostabil olduğunu göstermiştir. Saflaştırılmış enzim Ca²⁺, K²⁺ ve Mn²⁺ varlığında aktiftir. Enzim bir metalloproteinazdır. Enzimin V_{max} ve K_m kinetik değerleri sırasıyla 3333 U/mL ve 1 mM olarak saptanmıştır. Moleküler ağırlığı yaklaşık 51.5 kDa olarak belirlenmiştir. Enzimin -20°C'de 45 güne kadar stabilitesini korunduğu belirlenmiştir. Deriden kıl gidermede enzimatik işlem kimyasal işlemden daha efektif bulunmuştur. Histolojik analizler, proteazın derilerin kalitesini arttırdığını göstermiştir. *Bacillus subtilis* E6-5 suşu proteazı, deri endüstrisinde kullanım potansiyeline sahip olabilir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, proteaz, optimizasyon, saflaştırma, karakterizasyon, deri, kıl giderme

2020, x + 157 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

PROTEASE FROM NEW ISOLATE *Bacillus subtilis* E6-5 STRAIN:
OPTIMIZATION OF PRODUCTION CONDITIONS, PARTIAL PURIFICATION,
CHARACTERIZATION, POTENTIAL APPLICATIONS IN LEATHER INDUSTRY

Behice ZEREN

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

In this study, *Bacillus subtilis* E6-5 strain was used as a protease source and tested for protease production capacity in different media. Optimization of the medium for protease production was obtained by modifying nutritional and physical conditions. Maximum protease production has achieved using sucrose (carbon source), tryptone (nitrogen source) and BaCl₂ + CaCl₂ (metal ions) in medium composition. The optimal physical parameters for maximum protease production were determined as 35°C, pH 8.0, 150 rpm agitation rate, 4% inoculum size, 72 hours inoculum age. In the new modified medium obtained by combining optimal nutritional and physical parameters, a 5-fold increase in protease production was achieved. The optimal temperature and pH of the purified protease were determined as 60°C and 7.0, respectively. Thermostability studies have shown that the enzyme is thermostable. The purified enzyme was active in the presence of Ca²⁺, K²⁺ and Mn²⁺. The enzyme was a metalloprotease. V_{max} and K_m kinetic values of the enzyme were determined as 3333 U/mL and 1 mM, respectively. The molecular weight was determined about 51.5 kDa. The activity of the enzyme was found to be stable up to 45 days at -20°C. The enzymatic treatment was found to be more effective than the chemical treatment for hair removal from the skin. Histological analyses revealed that the protease has enhanced the quality of skins. The protease of *Bacillus subtilis* E6-5 strain may have the potential to be used in the leather industry.

Key Words: *Bacillus*, protease, optimization, purification, characterization, skin, dehairing

2020, x + 157 pages.

TEŞEKKÜR

Büyük sabır ve emekle hazırlanan bu doktora tezinin oluşumunda bilgi ve tecrübelerinden yararlanma fırsatı bulduğum, beni lisansüstü eğitime teşvik eden ve bilgi birikimiyle beni aydınlatan, sabır, mütevazılık ve hoşgörüsüyle kendisine imrendiğim, bana her konuda destek olan, beni yetiştiren ve doktora eğitimimi bitirebilmemde çok büyük payı olan çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Elif DEMİRKAN'a

Doktora tez izleme komitesi üyeleri olarak tez çalışmasıyla ilgili görüş ve önerileriyle doktora tezime katkı sağlayan Sayın Sayın Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ ve Sayın Prof. Dr. Dilek KUT'a,

Doktora tezimin histolojik analizinde yardımlarını gördüğüm Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Berrin ZİK, Doktora öğrencisi Deniz ASMAZ'a ve tezim için tecrübelerinden yararlandığım Dr. Aynur AYBEY'e,

Kendisini tanımanın bir ayrıcalık olduğunu bana ve aileme her fırsatta hissettiren, daima manevi olarak desteğini gördüğüm aile büyüğümüz Sayın Spyridon GKİOLMAS'a

Bana her zaman sonsuz destek, anlayış ve güven sunan anneme, babama, dayıma ve değerli kardeşim Şiir'e teşekkürü bir borç bilir ve saygılarımı sunarım.

18/08/2020

Behice ZEREN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Enzimlerin Tarihçesi	5
2.2. Enzimlerin Genel Özellikleri	6
2.3. Enzimlerin Sınıflandırılması ve İsimlendirilmesi	8
2.4. Proteazların Tarihçesi	9
2.5. Proteazların Genel Özellikleri	10
2.6. Proteazların Sınıflandırılması	12
2.6.1. Reaksiyonun çeşidine göre sınıflandırma	13
2.6.2. Reaksiyonun kimyasal mekanizmasına göre sınıflandırma	16
2.6.3. Enzimin moleküler yapısına göre sınıflandırma	20
2.7. Proteaz Kaynakları	20
2.7.1. Bitkisel kaynaklı proteazlar	21
2.7.2. Hayvansal kaynaklı proteazlar	21
2.7.3. Mikrobiyal kaynaklı proteazlar	21
2.8. Proteazların Kullanım Alanları.....	24
2.8.1. Gıda endüstrisi	25
2.8.2. İçecek endüstrisi	27
2.8.3. Antialerjik ürünler, yapay tatlandırıcılar ve enzim takviyeleri	27
2.8.4. Biyoaktif peptid üretimi	28
2.8.5. Hayvan yem ve mamalarının üretimi	30
2.8.6. Deterjan ve kuru temizleme endüstrisi	31
2.8.7. Tekstil endüstrisi	32
2.8.8. Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi	32
2.8.9. Farmasötik teknoloji	33
2.8.10. Kişisel bakım ve kozmetik	34
2.8.11. Sanat eseri restorasyonu	34
2.8.12. Enantiyoselektif sentez	35
2.8.13. Fotografik filmlerden gümüşün geri kazanılması	35
2.8.14. Atık yönetimi	36
2.8.15. Deri endüstrisi	36
2.9. Dericilik	37
2.9.1. Dericilik tarihi	37
2.9.2. Deri ve bileşenlerinin yapısı	38
2.9.3. Deri işlenmesi	40
2.9.4. Deriden kıl giderimi	43
2.9.5. Deri endüstrisi ve çevre	46
2.9.6. Kıl gideriminde bakteriyel proteazlar	49

2.9.7. Kıl gideriminde fungal proteazlar	49
2.9.8. Kıl gideriminde bitkisel ve hayvansal proteazlar	50
2.10. <i>Bacillus</i> Cinsinin Genel Özellikleri	50
2.11. <i>Bacillus</i> Cinsi Proteazının Genel Özellikleri	52
3. MATERYAL ve YÖNTEM	56
3.1. Materyal	56
3.2. Yöntem	56
3.2.1. Bakterinin korunması ve geliştirilmesinde kullanılan besi ortamları	56
3.2.2. Proteaz üretim ortamının belirlenmesi ve bakteri inkübasyon koşulları	56
3.2.3. Bakteri üremesinin ölçülmesi	58
3.2.4. Tirozin kalibrasyon (standart) eğrisi ve hazırlanması	58
3.2.5. Proteaz aktivitesinin ölçülmesi	59
3.2.6. Proteaz üretimi üzerine besinsel faktörler ve metal iyonlarının etkisi	62
3.2.7. Proteaz üretimi üzerine fiziksel faktörlerin etkisi	62
3.2.8. Maksimum proteaz üretimi için modifiye ortamın hazırlanması	63
3.2.9. Proteaz enziminin kısmi saflaştırılması	63
3.2.10. Protein miktarı tayini	65
3.2.11. Saf proteaz enziminin karakterize edilmesi	67
3.2.12. Saf enzimin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	67
3.2.13. Saf enzimin aktivitesi üzerine pH değerinin etkisi	68
3.2.14. Saf enzimin aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi	68
3.2.15. Saf enzimin kinetik parametreleri	69
3.2.16. Moleküler ağırlığın tespiti	69
3.2.17. Zimogram analizi	72
3.2.18. Ham enzimin depolanma stabilitesinin belirlenmesi	73
3.2.19. Deriden kıl giderimi (dehairing)'nde proteaz uygulaması	74
3.2.20. Derilerin histolojik analizi	74
4. BULGULAR	76
4.1. Proteaz Üretim Ortamının Belirlenmesi	76
4.2. Proteaz Üretimi Üzerine Besinsel Faktörler ve Metal İyonlarının Etkisi.....	78
4.3. Proteaz Üretimi Üzerine Fiziksel Faktörlerin Etkisi	82
4.4. Modifiye Ortamda Bakteri Üremesi ve Enzim Üretimi	88
4.5. <i>Bacillus subtilis</i> E6-5 Proteaz Enziminin Saflaştırılması	89
4.6. Saf Enzimin Karakterizasyonu	90
4.6.1. Saf enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi ve sıcaklık stabilitesi.....	90
4.6.2. Saf enzim aktivitesi üzerine pH değerinin etkisi ve pH stabilitesi.....	92
4.6.3. Saf enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi	94
4.6.4. Kinetik Parametreler	95
4.6.5. Moleküler Ağırlığın Tespiti	97
4.7. Ham Enzimin Depolanma Stabilitesinin Belirlenmesi	98
4.8. Deriden Kıl Giderimi (Dehairing)'nde Proteaz Potansiyelinin Araştırılması	99
4.9. Histolojik Analiz	105
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	109
KAYNAKLAR	133
ÖZGEÇMİŞ	156

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
$(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$	Amonyum Nitrat
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Amonyum Sülfat
atm	Atmosfer
CuSO_4	Bakır (II) Sülfat
BaCl_2	Baryum Klorür
BaSO_4	Baryum Sülfat
β	Beta
>	Büyük
ZnSO_4	Çinko Sülfat
dk.	Dakika
FeSO_4	Demir (II) Sülfat
$^\circ\text{C}$	Santigrat Derece
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Diamonyum fosfat
K_2HPO_4	Dipotasyum Fosfat
Na_2HPO_4	Disodyum Fosfat
H_3PO_4	Fosforik Asit
g	Gram
% w/v	Hacimde Ağırlıkça Yüzde
% v/v	Hacimde Hacimce Yüzde
H_2S	Hidrojen Sülfür
HCl	Hidroklorik Asit
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Kalsiyum Hidroksit
CaCl_2	Kalsiyum Klorür
kDa	Kilodalton
L	Litre
LiSO_4	Lityum Sülfat
MgCl_2	Magnezyum Klorür
MgSO_4	Magnezyum Sülfat
V_{max}	Maksimum Enzim Aktivitesi
MnCl_2	Mangan (II) Klorür
MnSO_4	Mangan (II) Sülfat
Mb	Megabaz
MPa	Megapaskal
m^2	Metrekare
K_m	Michealis-Menten Sabiti
μ	Mikro
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μmol	Mikromol
μM	Mikromolar
M.Ö.	Milattan Önce
mg	Miligram
mL	Mililitre

Simgeler	Açıklama
mM	Milimolar
M	Molar
NaH ₂ PO ₄	Monosodyum Fosfat
nm	Nanometre
N	Normal
KCl	Potasyum Klorür
KNO ₃	Potasyum Nitrat
R ²	Regresyon Katsayısı
sa.	Saat
cm	Santimetre
cm ²	Santimetrekare
NaOH	Sodyum Hidroksit
NaSH	Sodyum Hidrosülfid (Sodyum Sülfidrat)
Na ₂ S	Sodyum Sülfür
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
NaCl	Sodyum Klorür
U	Ünite
V	Volt
%	Yüzde Orantı

Kısaltmalar	Açıklama
ATP	Adenozin Trifosfat
Tris	2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-Diol
APS	Amonyum Persülfat
BOD	Biochemical Oxygen Demand (Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı)
BSA	Bovine Serum Albümin (Sığır Serum Albümin Proteini)
COD	Chemical Oxygen Demand (Kimyasal Oksijen İhtiyacı)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DIFP	Diizopropil Florofosfat
DMSO	Dimetil Sülfoksit
dH ₂ O	Distile Su
DTT	Ditiotreitol
EC	Enzyme Commission (Enzim Komisyonu)
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
PMSF	Fenil Metil Sülfonil Florid
GRAS	Generally Recognized as Safe (Genellikle Güvenilir Kabul Edilen)
IUB	International Union of Biochemistry (Uluslararası Biyokimya Birliği)
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology (Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği)
MW	Molecular Weight (Moleküler Ağırlık)
OD	Optical Density (Optik Yoğunluk)
pH	Power of Hydrogen Ion
rpm	Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
RNA	Ribonükleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TEMED	N,N,N',N'-Tetra Metil-Etilen Diamin
E64	N-(N-(L-3-Trans-Karboksiran-2-Karbonil)-L-Lösil)-Agmatin
TCA	Trikloroasetik Asit
sp.	Tür
USFDA	U.S. Food and Drug Administration (FDA) (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Endopeptidaz ve ekzopeptidazların aktivite gösterdiği peptid bağlarının konumu.....	15
Şekil 2.2. Dipeptidazların aktivite gösterdiği peptid bağının konumu	15
Şekil 2.3. Omega peptidazların aktivite gösterdiği peptid bağlarının konumu	16
Şekil 2.4. Deri kesiti ve kılın yapısı	40
Şekil 3.1. Tirozin kalibrasyon (standart) grafiği ve denklemi	59
Şekil 3.2. BSA kalibrasyon (standart) grafiği ve denklemi	66
Şekil 4.1. <i>Bacillus subtilis</i> E6-5'in farklı içerikli besi yerindeki üremelerinin karşılaştırılması.....	76
Şekil 4.2. <i>Bacillus subtilis</i> E6-5'in farklı içerikli besi yerindeki proteaz üretim kapasitelerinin karşılaştırılması	77
Şekil 4.3. <i>Bacillus subtilis</i> E6-5'in Besi yeri 3 (Çizelge 3.1)'de proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimi	77
Şekil 4.4. Farklı karbon kaynaklarının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi	79
Şekil 4.5. Farklı azot kaynaklarının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi	80
Şekil 4.6. Farklı metal iyonlarının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi	82
Şekil 4.7. Sıcaklık değerinin üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi	83
Şekil 4.8. pH değerlerinin üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi	84
Şekil 4.9. Çalkalama hızının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi	85
Şekil 4.10. İnokülasyon miktarının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi	86
Şekil 4.11. İnokülasyon yaşının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi	87
Şekil 4.12. Sıcaklığın proteaz aktivitesi üzerine etkisi	90
Şekil 4.13. Proteaz enziminin sıcaklık stabilitesi	91
Şekil 4.14. pH'nın proteaz aktivitesi üzerine etkisi	92
Şekil 4.15. Proteaz enziminin pH stabilitesi	93
Şekil 4.16. Enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi	95
Şekil 4.17. Proteaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk ve Michaelis-Menten Grafiği)	96
Şekil 4.18. SDS-PAGE ve zimogram analizi jellerinin profili	97
Şekil 4.19. Ham enzim depolanma stabilitesi	99
Şekil 4.20. Dana derisinde enzimatik ve kimyasal kıl giderimi	102
Şekil 4.21. Keçi derisinde enzimatik ve kimyasal kıl giderimi	103
Şekil 4.22. Koyun derisinde enzimatik ve kimyasal kıl giderimi	104
Şekil 4.23. Dana derisi kesitlerinin fotomikrografları	106
Şekil 4.24. Keçi derisi kesitlerinin fotomikrografları	107
Şekil 4.25. Koyun derisi kesitlerinin fotomikrografları	108

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Hidrolazların isimlendirilmesi	13
Çizelge 2.2. Serin, sistein, aspartik ve metallo proteazların bazı özellikleri	19
Çizelge 2.3. İlaç olarak kullanılan proteaz enzimi örnekleri	33
Çizelge 2.4. <i>Bacillus</i> cinsinin taksonomik konumu	50
Çizelge 2.5. Bazı <i>Bacillus</i> suşlarından izole edilen proteazların karakteristik özellikleri.....	53
Çizelge 2.6. <i>Bacillus</i> kaynaklı bazı ticari proteaz enzimleri	54
Çizelge 3.1. <i>Bacillus subtilis</i> E6-5 suşunun korunması, geliştirilmesi ve proteaz üretiminde kullanılan besi ortamları.....	57
Çizelge 3.2. Proteaz aktivite tayini basamakları	61
Çizelge 3.3. SDS-PAGE yöntemi için hazırlanan jellerin içerikleri	71
Çizelge 3.4. Zimogram analizi için hazırlanan jellerin içerikleri	73
Çizelge 4.1. <i>Bacillus subtilis</i> E6-5'in 3 farklı besi yerindeki üreme ve proteaz üretimlerinin karşılaştırılması	76
Çizelge 4.2. Farklı karbon kaynaklarının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi	78
Çizelge 4.3. Farklı azot kaynaklarının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi	80
Çizelge 4.4. Metal iyonlarının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi	81
Çizelge 4.5. Kombine metal iyonlarının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi	82
Çizelge 4.6. Sıcaklık değerinin üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi	83
Çizelge 4.7. pH değerinin üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi	84
Çizelge 4.8. Çalkalama hızının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi	85
Çizelge 4.9. İnokülasyon miktarının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi	86
Çizelge 4.10. İnokülasyon yaşının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi	87
Çizelge 4.11. Bazal ve modifiye ortamın kapasitesinin karşılaştırılması	88
Çizelge 4.12. Proteaz enziminin saflaştırma basamakları	89
Çizelge 4.13. Sıcaklığın proteaz aktivitesi üzerine etkisi	90
Çizelge 4.14. Proteaz enziminin sıcaklık stabilitesi	91
Çizelge 4.15. pH'nın proteaz aktivitesi üzerine etkisi	92
Çizelge 4.16. Proteaz enziminin pH stabilitesi	93
Çizelge 4.17. Enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi	94
Çizelge 4.18. Enzimin aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi	96
Çizelge 4.19. Ham enzim depolanma stabilitesi	98
Çizelge 4.20. Enzimatik ve kimyasal işlemler ile kıl giderim süresinin belirlenmesi ...	101

1. GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmalardaki çoğu fizyolojik faaliyetin yürütülmesinde, dolayısıyla hayatın devamlılığının sağlanması için gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonların neredeyse tamamında görev yapan, doğal olarak canlılar tarafından sentezlenen, genellikle protein yapısında olan özgül biyolojik katalizörlerdir. Antik çağlarda ne olduğunu ve nasıl çalıştığı bilinmeden asırlar boyunca şarap, sirke, bira, peynir, ekmek gibi yiyecek ve içeceklerin yapımında kullanılmış olan enzimatik reaksiyonlar, bu açıdan düşünüldüğünde farkında olunmadan gerçekleştirilen ilk biyoteknolojik uygulamalardır. Antik çağlardan günümüze uzanan enzim teknolojisindeki hızlı gelişmeler ile birlikte enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere gündelik ve ekonomik hayata girmiştir. Ekonomik olarak üretilebilmeleri, biyolojik olarak bozunabilir olmaları, spesifik olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, konvensiyonel yöntemlerle karşılaştırıldığında daha az atık oluşturmaları, çalışan ve çevre sağlığı açısından tehlikesiz olmaları, reaksiyon ortamından kolaylıkla geri kazanılmaları gibi birçok avantaja sahip olan kompleks yapıları bu organik makromoleküller birçok endüstriyel alanda yavaş yavaş inorganik katalizörlerin yerini almaktadır (Choi ve ark. 2015, Seager ve ark. 2018).

Enzimler hayvanlar ve bitkiler tarafından da üretilmesine rağmen, kontrollü koşullarda kısa sürede elde edilmesinden dolayı mikroorganizmalar enzim üretiminde asıl kaynağı oluşturmaktadır. Endüstriyel amaçlı kullanılan enzimlerin yaklaşık %96'sı mikroorganizmalardan üretilmektedir. Bunların yaklaşık %60'ı filamentöz funguslardan, %24'ü bakterilerden, %6'sı hayvanlardan, %4'ü mayalardan ve %2'si *Streptomyces*'den elde edilmektedir (Lowe 2001).

Günümüzde enzimler deri, tekstil, yem, gıda, içecek, deterjan, ilaç, atık giderimi, biyoyakıt ve kağıt endüstrisinde kullanılmaktadır (Van Beilen ve Li 2002). Ayrıca kişisel bakım, kozmetik, kuru temizleme, enantioselektif sentez, filmlerden gümüşün geri kazanımı, sanat eseri restorasyonu ve biyoaktif peptid, antialerjik ürün, yapay tatlandırıcı üretimi gibi spesifik alanlarda da kullanımları yaygın hale gelmiştir (Anonim 2020a).

Enzimlerin kullanım alanları arttıkça pazarı da genişlemektedir. Küresel enzim pazarının 2007 yılından bu yana her yıl %7.6'lık bir oranla büyüdüğü belirlenmiştir. 2018 yılında pazarın yıllık değerinin 7.1 milyar ABD doları olduğu ve bu değerinin yıllık %5.5'lik büyüme hızıyla 2026 yılında 11.03 milyar ABD dolarına ulaşacağı tahmin edilmektedir. Enzimler

farklı organizmadan elde edilebilmekte fakat küresel enzim pazarında en büyük pay sahibi mikrobiyal kaynaklı enzimlerdir. Mikrobiyal kaynaklı enzimlerin 2018 yılında küresel enzim pazarının yaklaşık olarak %37'lik kısmını elinde tuttuğu ve bu oranın %5.8'lik büyüme oranı ile 2026 yılında %38'e ulaşacağı tahmin edilmektedir (Anonim 2019a).

Dünya genelinde proteazlar yaklaşık %60 pazar payı ile pazardaki en çok satan enzimdir ve bunu karbohidrazlar (amilazlar, glukanzlar, selülozlar), fitazlar ve lipazlar takip etmektedir (Kumar ve ark. 2014). Hidrolazların endüstriyel enzim pazarının üçte ikisinden fazlasını (yaklaşık olarak %75-80) elinde tuttuğu buna ek olarak hidrolazların arasında ise endüstriyel açıdan en fazla rağbet gören grup ise proteazlardır (Anonim 2018). Proteazların yıllık %6.4'lük büyüme hızı ile 2022 yılında değerinin 3.29 milyar ABD dolarına ulaşacağı tahmin edilmektedir (Anonim 2019a).

Proteazlar, proteinlerdeki peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir, biyoteknoloji ve endüstrinin birçok sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde kurabiyelerin lezzet ve renginin geliştirilmesinde, unlu mamullerin üretiminde unun işlenerek hamur dokusunun iyileştirilmesinde, peynir üretiminde lezzet ve aromanın geliştirilmesinde, etlerin yumuşatılmasında, bazı antialerjik ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır (Singh ve ark. 2016). Deri endüstrisinde kıl giderimi, sama ve ıslatma gibi aşamalarda kullanılmaktadır Hayvan yemlerinde sindirilebilirliğinin artırılmasında, temizleme ajanı olarak çamaşır ve bulaşık deterjanlarının formülasyonlarında kullanılmaktadırlar. Deterjanlara ek olarak gıda (et ve süt) endüstrisinde kullanılan malzemelerin, ameliyatlarda kullanılan cerrahi aletlerin ve kontakt lens gibi bazı spesifik materyallerin temizlenmesinde kullanılmaktadırlar. Buna ek olarak röntgen ve fotoğraf filmlerinden gümüşü çıkarmakta ve en fazla da deri endüstrisinde kullanılmaktadırlar (Joo ve Chang 2006, Jellouli ve ark. 2011).

Deri endüstrisi, deri kullanılarak ayakkabı, çanta, giysi gibi birçok ürünün üretiminin gerçekleştirildiği çok eski bir imalat sektörüdür. Bilinen en kirletici sektörlerden biri olan dericilikte, toksik ve tehlikeli kimyasalları içeren bol miktarda katı ve sıvı atık oluşumuna yol açmaktadır; deri endüstrisinden kaynaklanan bu atıklar ise canlılar ve çevre üzerinde zararlı etkilere yol açmaktadır. Bu atıklara örnek olarak tabaklama işleminde kullanılan arsenik ve krom gibi ağır metallerin yanı sıra klorür, sülfat, hidrokarbon, amin, aldehit

içeren bileşikler verilebilir (Sivaram ve Barik 2019). Geleneksel (konvansiyonel) yöntem olarak da adlandırılan ve yüksek oranda kireç ve sülfürlü bileşikler kullanılarak yapılan kıl giderimi işlemi, deri üretimi kaynaklı kirliliğinin ortalama olarak % 80-90'ına sebep olduğu için üretimin en kirlitici aşaması olarak kabul edilmekte ve çevre, arıtım tesisi ve kanalizasyon sistemine verdiği zararların yanında deri sektöründe çalışanlarında kanser gibi hastalıklara hatta ölümlere bile sebebiyet vermektedir (Balasubramanian ve Pugalenth 2000). Günümüzde dünya çapında yaklaşık olarak 9 000 tabakhane deri üretimini yapıldığı tahmin edilmektedir (Anonim 2019b). Ortalama atık su deşarjı günde yaklaşık 15 milyon tondur. Yıllık yaklaşık olarak 1,8 milyar m² işlenmiş haldeki deri piyasaya sürülmekte ve bu işlem sonunda 2,4 milyon ton çamurlaşmış atık ve 250 milyon ton sıvı atık oluştuğu tahmin edilmektedir (Chowdhury ve ark. 2013). Tüm bu olumsuz etkilerden dolayı, deri işlenmesi kırmızı kategoridedir (Fathima ve ark. 2012). Son yıllarda deri endüstrisinde ıslatma, kıl giderimi, sama ve yağ giderimi gibi işlemlerde biyoteknolojinin kullanımı artmıştır. Özellikle kıl gidermede kimyasal işlemler yerine enzimatik işlemler alternatif olarak kabul edilmiştir. Böylece, proteolitik enzimler sayesinde sülfürlü kimyasallar kaynaklı çevresel kirlilik ve yarattığı toksik etkinin azaltılabilirliği sağlanmıştır (Padmapriya ve ark. 2012). Bu sayede kılın iyi kalitede geri kazanımı (Hidrolize kıl gübre, ilaç, kozmetik ürün, aminoasit, hayvan yem ve mama üretiminde kullanılmaktadır), çalışanlar ve çevre açısından temiz bir atmosfer yaratılması mümkün olmaktadır (Arunachalam ve Saritha 2009). Proteazlar, deri endüstrisinde ıslatma, kıl giderimi ve samada kullanılmaktadır. Bakteriyel proteazlar, derinin kollajen olmayan yapılarının seçimli hidrolizinde, globulinler ve albuminler gibi fibril yapıda olmayan proteinlerin uzaklaştırılmasında, deriden kılların ayrılmasında ve derinin yumuşatılmasında kullanılmaktadır (Anwar ve Saleemuddin 1998).

Enzim teknolojisindeki hızlı gelişmeler ile birlikte, deri endüstrisinde mikrobiyal proteazlara olan talebi de arttırmıştır. Ürüne artan talep doğrultusunda sanayide maliyet düşürmek ve reaksiyon verimliliğini arttırmak gibi unsurlar öne çıkmaktadır. Bu sebeple sanayide kullanılacak yeni biyokatalizörlerin keşfi ve bu unsurlarla mücadelede aslında kilit taşı görevi görmektedir. Yeni biyokatalizörlerin keşfi ile verimlilikte artma; maliyet, zaman, tüketilen enerji miktarı, kullanılan kimyasal madde miktarı ve üretilen atık miktarı, bertarafı yapılması gereken atık miktarı gibi unsurlarda ise azalma hedeflenmektedir (Castilla ve ark. 2018).

Mikrobiyal yolla enzim üretiminin ilk aşaması uygun mikroorganizmanın seçimidir. Birçok mikroorganizma proteaz üretebilmektedir. Fakat sadece yeterli miktarda ekstraselüler proteaz üretebilen mikroorganizmaların endüstriyel açıdan önemi vardır. Endüstride kullanılmakta olan mikrobiyal proteazların en önemli kaynakları maya, küf ve bakterilerdir. Bakteriler içerisinde ise *Bacillus* cinsi proteaz üretiminde en fazla kullanılan mikroorganizmadır (Si ve ark. 2018). Bunun nedeni, çok çeşitli ortamlardan izolasyonlarının nispeten kolay olması, hem kompleks hem de sentetik besi yerinde gelişebilmeleri, bol miktarda ekstrasellüler proteaz üretebilmeleri ve dirençli sporlara sahip olmalarıdır (Mabrouk ve ark. 1999). Diğer yandan, organizmanın enzim üretimi, besi yeri bileşenleri ve kültürel koşullardan fazlaca etkilenmektedir. Dolayısıyla bu parametrelerin optimizasyonu enzim üretimi açısından çok önemlidir (Das ve Prasad 2010, Vanitha ve ark. 2014).

Bu tez projesinin amacı, doğal kaynaklarımız olan toprak örneklerinden daha önceden izole edilmiş ve tür düzeyinde adlandırılmış olan yeni izolat *Bacillus subtilis* E6-5 suşundan proteaz enziminin üretim koşullarının optimizasyonu, enzimin saflaştırılarak karakterize edilmesi ve farklı hayvan derilerinde kıl giderme potansiyelinin araştırılmasıdır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Enzimlerin Tarihçesi

Evrenin oluşumunun 20 milyar yıl, ilk yaşam formunun oluşumunun 4,2 milyar yıl olduğu göz önüne alındığında organik evrim hızının inorganik evrim hızına göre çok hızlı olduğu görülebilmektedir. Bu durum biyokimyasal reaksiyonların hızının artması ile dolayısıyla enzimlerin varlığı ile ilişkilendirilmektedir (Arya ve ark. 2018). Eski medeniyetler, ne olduğunu bilmeden binlerce yıl boyunca enzimleri kullanmıştır. Asırlar boyunca şarap, sirke, bira, peynir, ekmek gibi yiyecek ve içeceklerin yapımında kullanılmış olan enzimatik reaksiyonlar, aslında farkında olunmadan gerçekleştirilen ilk biyoteknolojik uygulamalardır. Üzüm fermentasyonu ve bira üretimi gıda biyoteknolojisinin ilk örnekleridir. M.Ö. 4000-2000 yıllarında yaşadıkları düşünülen ve bilinen en eski uygarlık olan Sümerlerin bira üretip, içtiği bilinmektedir. Aslında bu işlemlerin M.Ö. 6000 öncesinde başladığı düşünülmektedir (Tavano ve ark. 2018).

Enzimlerin ticari olarak kullanımında bilinen en eski kaynak ise içeriğinde bira ve şarap yapımı gibi uygulamaların da yer aldığı M.Ö. 1760 yılında eski Babil döneminde yazılmış olan Hammurabi kanunlarıdır. Ayrıca Roma, Yunanistan, Mısır, Çin ve Hindistan'da yaşamış çeşitli uygarlıkların dönemlerinde yazılmış bazı metinlerde de enzimatik uygulamalara yer verilmiştir. Bu metinlerde özellikle sirke üretimi ile ilgili birçok bilgi bulunmaktadır. Bunun nedeni sirkenin hem yiyecek hem de tıbbi amaçlar için kullanılmasıdır. Süte göre daha uzun süre depolanabilen peynir de sütün proteaz enzimi etkisi ile kesilmesi ile oluşmaktadır. Antik çağlarda bunun için incir ağacı lateksinden elde edilen fisin denilen özüt ve buzağı midesi (genç geviş getiren hayvanın şirdeninin iç mukozasından) elde edilen rennin kullanılmıştır. M.Ö. 700-800 civarında yazılan Homeros'un Troya Savaşı'nı anlattığı İlyada destanında, süte fisin eklendiğinde, sütün hızla koagüle olduğuna yer verilmiştir (Buxbaum 2007).

Payen ve Persoz (1833), alkollü maltın nişastayı şekere dönüştürebildiğini bildirmiştir. Yunancada "ayırarak" anlamına gelen ve malt kabuğunun soyulmasına verilen isim olan diyastaz'dan esinlenerek, enzimle alakalı yayımlanan ilk bilimsel bildiriye bu faktöre diyastaz (diastase) denilmiştir. Theodor Schwann (1836), mide özusunun, test tüpündeyken bile yiyecekleri parçalayabildiğini keşfetmiş ve pepsin adını verdiği bu maddeyi hayvandan izole etmiştir (Florkin 1957). Berzelius (1836), kataliz kavramının

farkına varmış; katalize örnek olarak mayanın şekerleri fermente etmesini göstermiştir. 1850'lerde Louis Pasteur, mayayla şekerin alkole fermantasyonunun "ferment" olarak adlandırdığı maddeler tarafından katalizlendiğini ve bu ferment denilen maddelerin her zaman maya hücreleri ile ilişkili olduğunu iddia etmiştir (Pouyan 2014). O dönemde maya hücresinden fermentler izole edilemediğinden fermantasyonda canlı hücrelerin bulunmasının şart olduğu düşünülmüştür (Windelspecht 2003). Wilhelm Friedrich Kühne (1877), fermentleri ifade etmek için yunanca "maya içinde" (en=in=içinde; zyme=yeast=maya) anlamına gelen "enzim" kelimesini ilk kez kullanmıştır. Eduard Buchner (1897), mayayı öğütürerek maya özütü hazırlamış, daha sonra maya özütünü filtre ederek hücre içermeyen bir çözelti elde etmiştir. Muhafaza etmek için çözeltiye şeker (koruyucu olarak) eklemiş, sonrasında şekerin fermantasyona uğradığını farketmiş ve fermantasyon için canlı hücrelere değil, bazı küçük varlıklara ihtiyaç olduğunu keşfetmiştir. Emile Duclaux (1898), biyokatalizörler için -az (-ase) ekinin kullanılmasını önermiştir (Arya ve ark. 2018). Endüstriyel ölçekte üretilen ilk enzim, "taka-diastrase" denilen amilazdır. *Aspergillus oryzae* kaynaklı olan, nişasta sindirimini sağlayan bu enzim, sindirim bozukluklarında kullanılmak üzere patentlenmiştir. Bu patent, mikrobiyal enzim için alınmış ilk patenttir (Takamine 1894).

2.2. Enzimlerin Genel Özellikleri

Enzimler, biyokimyasal reaksiyonları ılımlı sıcaklık, basınç ve pH koşullarında 10^3 - 10^{17} kat hızlı gerçekleştirebilen, doğal olarak canlılar tarafından sentezlenen, protein yapısında ya da bir kısmı protein olan spesifik biyokatalizörlerdir (Giraldo ve ark. 2006). Basit enzimler sadece proteinden oluşurken, bileşik enzimler bu protein yapıya ek olarak protein yapıda olmayan organik veya inorganik moleküllerden oluşmaktadır. Holoenzim olarak da bilinen bileşik enzimlerin proteinden oluşan kısmına apoprotein (apoenzim); aktivitesi için gerekli inorganik veya organik moleküllere ise kofaktör denilmektedir. Organik kofaktörler, koenzim olarak da adlandırılmaktadır. Apoenzime sıkı şekilde bağlanmış koenzimlere prostetik grup, gevşek şekilde bağlanmış koenzimlere kosubstrat denilmektedir. Enzimler genellikle substratına göre çok büyüktür, fakat enzimin yaklaşık 3-4 aminoasit kalıntısı yani çok küçük bir bölgesi kataliz ile ilişkilidir. Aktif merkez denilen bu bölge oluk ya da yarık şeklindedir. Enzimin primer yapısında aminoasitler

katlanma, bükülme ve kırılmalar sonucu bir araya gelerek aktif merkezi oluşturmaktadır. Aktif merkezde en fazla serin, sistein, histidin, lizin, tirozin, aspartat, glutamat bulunmaktadır. Aktif merkez, bağlanma bölgesi (enzimin substrata bağlandığı bölge) ve katalitik aktivite bölgesi (substratın dönüşüme uğratıldığı bölge) denilen iki bölgeden oluşmaktadır. Enzimde substrat spesifikliğı bağlanma bölgesi; reaksiyon spesifikliğı katalitik aktivite bölgesi kaynaklıdır. Bağlanmada hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları, iyonik kuvvetler, geçici kovalent bağları etkilidir (Seager ve ark. 2018). Enzimler, sadece hücre içinde sentezlenebilmektedir. Hücre içerisindeki kimyasal süreçlere metabolizma denildiğinden, katalitik faaliyetlerini sadece hücre içerisinde gerçekleştiren enzimlere metabolik enzimler (intrasellüler enzimler, endoenzimler) denilmektedir. Ekstrasellüler enzimler (ekzoenzimler) ise sentezlendikten sonra hücreden ayrılarak fonksiyonlarına hücre dışında devam etmektedir (Contesini ve ark. 2018).

Enzimler reaksiyon ve substrat spesifikliğıne sahip olmalarıyla kimyasal katalizörlerden ayrılmaktadır. Reaksiyon özgülüğü, enzimin bir substratın dönüşümünü spesifik bir reaksiyon yolağına göre katalizlemesidir. Substrat özgülüğü ise, enzimin yapıları benzer substratlardan yalnızca birinin dönüşümü katalizlemesidir. Kısacası kimyasal katalizörler farklı reaksiyonları, enzimler ise spesifik reaksiyonları katalizlemektedir. Enzimler, inorganik katalizörlere göre avantajlı moleküllerdir. Çünkü üretimleri tehlikesiz ve ekonomik, kullanımları güvenli, reaksiyon ortamından geri kazanımları kolay, tekrarlı olarak kullanılabilen, biyolojik olarak bozunabilen, yan ürün oluşturmayan, az atık oluşturan organik moleküllerdir (Bashir ve ark. 2018).

Enzimlere benzer şekilde spesifik kimyasal reaksiyonları katalizleyebilen dolayısıyla enzim olarak isimlendirilen başka moleküller de bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak ribozim, DNA enzim, sentetik enzim, nanoenzim ve psödoenzim verilebilir. Ribozimler, belirli kimyasal reaksiyonları kataliz yeteneğine sahip RNA molekülleridir. Katalitik aktiviteye sahip DNA moleküllerine ise DNA enzim (DNAzymes) denilmektedir (Santoro ve Joyce 1997). Laboratuvarlarda üretilen enzimlere kimyasal enzim (chemzymes) veya sentetik enzim (synzymes) denilmektedir (Merrifield 1964). Nanoboyutlara sahip ve spesifik reaksiyonları katalizleyebilen partiküllere ise nanoenzim denilmektedir (Amin ve ark. 2011). Psödoenzimler (pseudoenzymes), katalitik aktivite için gerekli aminoasitlerden yoksun olduğu için katalitik aktivitesi olmayan, ancak temel sinyal yollarında rol oynadıkları için önemli olan moleküllerdir (Murphy ve ark. 2017).

2.3. Enzimlerin Sınıflandırılması ve İsimlendirilmesi

1956 yılında Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB, günümüzdeki ismi IUBMB) Uluslararası Enzim Komisyonu'nu kurmuştur. Uluslararası Enzim Komisyonu, 1961 yılında yayımladıkları ilk raporunda sınıflandırma ve isimlendirmenin birlikte ele alınması gerektiğini vurgulamış ve 3 temel prensip belirlemiştir. Birinci prensip, enzim isimlerinin sonuna –az eki alması ve her ismin tek bir katalitik varlık için kullanılması gerektiğidir. Birden fazla enzim içeren sistemlerde "sistemi" kelimesinin kullanılması ve bunların isimlendirilmesinde ilk reaksiyon adımının esas alınmasıdır. İkinci prensip, enzimin spesifik özelliklerinden katalizlendiği reaksiyonun, enzimlerin sınıflandırılması ve adlandırılmasında kullanımının makul olduğudur. Üçüncü prensip, enzimlerin katalizledikleri reaksiyon tipi ve substratının enzimin isimlendirilmesi, sınıflandırılması ve kod numarasının belirlenmesinde temel oluşturduğudur (Anonim 2020b). Enzimler, geleneksel ve sistematik olmak üzere 2 şekilde isimlendirilebilmektedir. Geleneksel (önerilen) isim, bazen proteaz gibi substrat ve –az ekinin birleşiminden oluşan bazen de pepsin, tripsin gibi substratına göndermede yapmayan isimlerdir. Sistematik isim ise substrat, katalizlenen reaksiyon tipi ve –az ekinin birleşiminden oluşmaktadır.

Uluslararası Enzim Komisyonu, ilk raporunda enzimlerin sınıflandırılmasında kullanılacak olan kod numaralarının atanması için bir sistem geliştirmiştir. Bu kod numaraları EC (Enzyme Commission) ile başlayarak nokta ile ayrılmış olan 4 sayıdan oluşmaktadır. İlk sayı, enzimin sınıfını; ikinci sayı, altsınıfı; üçüncü sayı, alt-alt sınıfı; dördüncü sayı ise enzimin alt-alt sınıfındaki seri numarasını ifade etmektedir. Enzim adlandırılmasında spesifikliği sağlayan sayı, seri numarasıdır.

1961 yılından 2018 yılına kadar enzimler 6 sınıf ayrılmış, fakat 2018 yılında sınıf sayısı 7'ye yükseltilmiştir. Bunlar:

EC 1. Oksidoredüktazlar: Redüksiyon (indirgenme) ve oksidasyon (yükseltgenme) kısacası redoks reaksiyonlarının katalizini gerçekleştirmektedirler.

EC 2. Transferazlar: Bir bileşikten diğerine metil, açıl, glikozil, amino, fosfat gibi fonksiyonel grupların transferinin katalizini gerçekleştirmektedirler.

EC 3. Hidrolazlar: Bu enzimler C-C, C-N, C-S, C-O gibi kimyasal bağların koparılmasının katalizini sağlamaktadırlar. Reaksiyon sırasında su kullanılmaktadır.

EC 4. Liyazlar (Sentazlar): Bu enzimler non-hidrolitik bir yolla C-C, C-N, C-S, C-O gibi kimyasal bağların yıkılması sonrasında bağın yerine çift bağ ve halka oluşumu veya çift bağlara çeşitli grupların eklenmesi gibi reaksiyonları katalizlemektedirler.

EC 5. İzomerazlar: Bu enzimler bir molekülün içindeki geometrik veya yapısal değişikliklerin katalizini gerçekleştirmektedir.

EC 6. Ligazlar (Sentetazlar): ATP gibi bir trifosfattaki fosfat bağının hidrolizinden sağladığı enerjiyle iki molekülün birleşme reaksiyonunu katalizlemektedir. İki molekülün birleşmesi için yeni C-C, C-N, C-S, C-O bağlarının oluşumunu katalizlemektedir.

EC 7. Translokazlar: Bu enzimler iyon ve moleküllerin membranlar arasındaki hareketini sağlamaktadır. Asıl işlevleri olan iyon ve moleküllerin hareketini sağladıkları reaksiyon sırasında ATP hidrolizini gerçekleştirmektedir. Bu sebeple ATPaz (EC 3.6.3) alt-alt sınıfında yer almış olan bu enzimlerin 2018 yılından itibaren "EC 7. Translokazlar" olarak yeni bir sınıfın altında toplanması gerektiğine karar verilmiştir (Tipton 2018).

2.4. Proteazların Tarihçesi

Proteinlerin enzimatik olarak hidrolizinin katalizlendiği reaksiyonlardan antik çağlardan beri faydalanılmıştır. Örneğin, M.Ö. 700-800 civarında yazılan Homeros'un İlyada destanında, süte fisin eklendiğinde, sütün hızla koagüle olarak peynir oluştuğundan bahsedilmektedir (Buxbaum 2007). 1700'lerde etlerin tenderizasyonu ve peynir yapımında genç buzağuların şirdenlerinin, derilerin tabaklanmasında ise feçeslerin kullanıldığı bilinmektedir. 1783 yılında Lazzaro Spallanzani, mide sıvısının protein parçalama özelliğinde olduğunu saptamıştır (Kousoulis ve ark. 2012). Theodor Schwann (1836), mide özsuyunun, test tüpünün içindeyken bile yiyecekleri parçalayabildiğini keşfetmiş ve pepsin adını verdiği bu maddeyi hayvandan izole etmiştir (Miller ve ark. 2002). Proteazlar ile ilgili ilk makale Phoebus Aaron Levene (1905) tarafından yazılmıştır. Midenin aspartik proteazı pepsin, pankreatik serin proteazlar tripsin ve kimotripsin, 1930 yılında kristalize edilmiştir (Northrop 1930, Northrop ve Kunitz 1931). Papaya meyvesinden izole edilen sistein proteaz papain de 1800'lerde keşfedilmiş, 1954'te saflaştırılmıştır (Kimmel ve Smith 1954). Termolizin, kristalize edilen ve yapısı çözülmüş ilk metalloendoproteinazdır (Matthews ve ark. 1972).

2.5. Proteazların Genel Özellikleri

Proteazlar (proteolitik enzimler, peptidazlar, proteinazlar) protein moleküllerindeki peptid (amit) bağlarının hidrolizini katalizleyen enzim alt sınıfıdır (Motyan ve ark. 2013). Proteinlerdeki peptid bağlarını hidroliz ederek, proteinleri parçalayan enzimlerin adlandırılmasında uzun yıllar sadece proteaz terimi kullanılmıştır. Sonraları proteazların iki türünün olduğunu fark edilmiştir. Buna göre bazı proteazlar, sadece bozulmamış proteinlerin hidrolizini; bazı proteazlar ise küçük peptidlerin hidrolizini gerçekleştirmektedir. Spesifik olarak sağlam proteinlerin hidrolizini gerçekleştiren proteazlar için "proteinaz" terimi kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde proteazlar, etki ettikleri peptid bağının yerine göre endopeptidaz (proteinaz) ve ekzopeptidaz olmak üzere 2 grupta incelenmektedir. Endopeptidazlar, protein molekülü içindeki peptid bağlarını parçalayabilen proteazlardır. Endopeptidazlara örnek olarak pepsin, rennin, elastaz, tripsin ve kimotripsin verilebilmektedir. Ekzopeptidazlar ise proteinlerin terminal bölgesinden tek bir aminoasit kopararak etkilerini gösteren proteazlardır. Ekzopeptidazlara örnek olarak karboksipeptidaz ve aminopeptidaz verilebilmektedir. Endopeptidazların kataliz reaksiyonu sonucunda peptid zincirleri oluşurken; ekzopeptidazların reaksiyonu sonucunda tek bir aminoasit ve peptid zinciri meydana gelmektedir. Kısacası ekzopeptidazlar sadece serbest karboksil veya amino uç içeren proteinlerin hidrolizini gerçekleştirebilirken, endopeptidazlarda böyle bir sınırlama yoktur (Bergmann ve Ross 1936, Barrett ve McDonald 1986). Endüstriyel açıdan en fazla endopeptidazlar tercih edilmektedir. Buna ek olarak katepsin gibi bazı enzimler hem endopeptidaz hem de ekzopeptidaz aktivitesi göstermektedir (McKay ve ark. 1983). Bunlar ayrı grup olarak ele alınmak yerine endopeptidazlar içine dahil edilmektedir.

Proteazlar, inhibitör varlığındaki inhibisyon profillerine göre sınıflandırılabilir. Spesifik olarak EDTA'nın metalloproteazları, DIFP ve PMSF'nin serin proteazları, iyodoasetatın sistein proteazları, pepstatin A'nın ise aspartik proteazları inhibe ettiği bilinmektedir (Zambare ve ark. 2011). Bir metal şelatörü olan EDTA, metal iyonları ile altıya kadar bağ yapabildiği için ortamdaki metal iyonlarına özellikle de iki değerlikli katyonlara bağlanmaktadır. EDTA, enzimin aktif merkezindeki metalleri şelatlayarak; enzimin belirli bir aminoasit kalıntısının spesifik olarak bağladığı metalleri şelatlayarak; enzimin kofaktörü olarak ortamda bulunan metalleri şelatlayarak etkisini gösterebilmektedir. EDTA, metalloenzimlerin aktif merkezindeki metal iyonlarını

şelatladığında enzim inhibe olmaktadır. Çünkü enzimin aktif merkezinde bulunan metal iyonları, enzim stabilitesi ve yapısal bütünlüğü açısından çok önemlidir. EDTA'nın inhibitör etkisinin az olması, enzimin kofaktör olarak metal iyonlarına çok az gereksinimi olduğunu göstergesidir. Bu sebeple EDTA'nın enzim aktivitesi üzerindeki zayıf etkisinin olması, enzimin aktivitesinin kofaktörlerden (genellikle iki değerlikli kayton) bağımsız olduğunu ve enzimin metalloproteaz olmadığını düşündürmektedir (Singh ve ark. 2016). EDTA, tarafından etkinliğini inhibe olduğu halde, metal iyonları tarafından uyarılan ve etkinliği artan proteazların metalloproteaz olduğu düşünülmektedir (Rehman ve ark. 2017). Serin proteazların aktif bölgesindeki serin kalıntısını PMSF ve DIFP gibi ajanlar geri dönüşsüz olarak açilleyerek bloke etmekte bu durum enzimin inaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (Beg ve Gupta 2003).

Fe^{2+} , Hg^{2+} , Cr^{2+} metal iyonları; izopropanol, metanol, DMSO, DTT, 2- β -mercaptoetanol çözücüler; SDS, Tween 20, Tween 80, Triton X-100 deterjanları genellikle proteazları inhibe etmekte fakat spesifik olarak inhibe ettikleri bir aile bulunmamaktadır (Briki ve ark. 2016). Ditiotreitol (DTT), disülfid bağlarını indirgeyerek, bu kovalent bağların kopmasına neden olmaktadır, bu sebeple genel bir proteaz inhibitörüdür. Güçlü şekilde anyonik olan SDS ve iyonik olmayan Tween 80 ve Triton X-100 gibi deterjanlar proteaz aktivitesini genellikle düşürmektedir (Annamalai ve ark. 2014). 2- β -merkaptoetanol bazen disülfid bağlarına atak yaparak, proteinlerin tersinmez inhibisyonuna sebep olmakta bazen de enzimin yüzeyindeki aminoasitlerdeki hidrojen bağlarının sayısını değiştirerek, katalitik aktivite ve stabiliteyi düşürmektedir. 2- β -merkaptoetanol ve SDS etkisiyle proteinin yapısal olarak yeniden organizasyonunun gerçekleşebileceği de belirlenmiştir. Örneğin, 2- β -merkaptoetanol'ün, sistein proteazların stabilizasyonunda görev aldığı; bunu proteindeki sülfidril gruplarını oksidasyondan koruyarak gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Uddin ve ark. 2014). SDS'in proteaz aktivitesini arttırdığı; bunun SDS ile bazı elektrostatik etkileşimlerle proteazın yeniden modellenerek daha stabil ve kararlı konformasyona kavuşmasıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (Rehman ve ark. 2017).

Genellikle s-blok metalleri (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Li^{3+}), yüksek sıcaklıklarda enzimin tersiyer yapısını korumasına yardımcı olmakta yani enzimi termal denatürasyondan korumaktadır. Bu metaller enzimlere genellikle tersinir şekilde iyonik olarak bağlanmaktadır. Ca^{2+} iyonu protein içi etkileşimleri kuvvetlendiremekte; proteindeki belirli bölgelere bağlanarak otoliz ve sıcaklıkla etkisiyle meydana gelebilecek

tersiyer yapıdaki açılmaları engellemekte; bazen de katalitik reaksiyonlarda yer almaktadır. Kısacası Ca^{2+} iyonu proteazın aktivitesini ve termal stabilitesini arttırmaktadır (Annamalai ve ark. 2014). Mg^{2+} iyonu da proteazları stabilize etmekte ve aktivitesini arttırmaktadır. Çünkü Mg^{2+} katyonu, çözültideki çözülmüş oksijeni azaltarak, tiyol gruplarını oksidasyona karşı korumaktadır. Bazı çalışmalar Ca^{2+} katyonunda aynı mekanizmayı kullandığı ifade etmektedir (Silva ve ark. 2018). Na^+ ve Mg^{2+} iyonları, enzimin aktif merkezdeki iki bitişik aminoasit arasında tuz köprüsü görevi görerek enzimin tersiyer yapısının stabilizasyonunu sağlamaktadır (Ahmetoglu ve ark. 2015).

Geçiş metalleri genellikle proteazların aktivitesini azaltmakta veya inhibe etmektedir. Çünkü d-blok (geçiş) metalleri (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+}) kararlı kompleksler vermek üzere tercihen kovalent bağlarla enzime tersinmez şekilde bağlanmaktadır (Shah ve ark. 2010). Örneğin, Hg^{2+} iyonu, enzimdeki karboksilik gruplar ve triptofan kalıntılarına bağlanarak enzimi inhibe etmektedir (Sinha ve Khare 2013). Bazı araştırmacılar ise bazı d blok metallerinin spesifik olarak bazı enzimlerin aktivitesini arttırdığını; bunu enzimin konformasyon ve stabilizasyonunu bozabilecek olan güçlere karşı bir koruyucu bariyer gibi davranarak gerçekleştirdikleri düşünülmektedir (Adinarayana ve ark. 2003). Örneğin, özellikle Zn^{2+} iyonu varlığında enzimatik stabilitede artış olması, proteazın Zn^{2+} bağımlı metalloproteaz olduğunu göstermekte ve bu metal iyonlarının substrat hidrolizi sırasında nükleofilik atak için su moleküllerini uyardığı bilinmektedir (Wu ve Chen 2011).

2.6. Proteazların Sınıflandırılması

Proteazlar, hidrolazlar sınıfına dahil olan çok geniş ve kompleks bir enzim grubudur (Çizelge 2.1). Bu sebeple günümüze kadar aktivitelerinin olduğu sıcaklık ve pH değeri, köken aldıkları organizma, substrat spesifikliğı, stabilite profilleri, aktif merkezleri, katalitik mekanizmaları gibi birçok parametre baz alınarak sınıflandırılmışlardır. Örneğin maksimum aktiviteye sahip oldukları pH değerine göre asidik, nötral ve alkalen olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadırlar (Briki ve ark. 2016). Fakat proteazların sınıflandırılmasında gerçekten işlevsel olan 3 sistem bulunmaktadır. Bu sistemlerdeki sınıflandırmada baz alınan kriterler, reaksiyonun çeşidi, reaksiyonun kimyasal mekanizması ve enzimin moleküler yapısı olmak üzere 3'e ayrılmaktadır.

Çizelge 2.1. Hidrolazların isimlendirilmesi (Anonim 2019c).

Hidrolizi Katalizlenen Bağ veya Bileşik	EC no		
Ester Bağı	EC 3.1.x.x		
Glikozilli Bileşik	EC 3.2.x.x		
Eter Bağı	EC 3.3.x.x		
Peptid Bağı	EC 3.4.11.x	Aminopeptidazlar	Ekzopeptidazlar
	EC 3.4.13.x	Dipeptidazlar	
	EC 3.4.14.x	Di ve tripeptidil-peptidazlar	
	EC 3.4.15.x	Peptidil-dipeptidazlar	
	EC 3.4.16.x	Serin karboksipeptidazlar	
	EC 3.4.17.x	Metallo-karboksipeptidazlar	
	EC 3.4.18.x	Sistein karboksipeptidazlar	
	EC 3.4.19.x	Omega peptidazlar	Endopeptidazlar
	EC 3.4.21.x	Serin endopeptidazlar	
	EC 3.4.22.x	Sistein endopeptidazlar	
	EC 3.4.23.x	Aspartik endopeptidazlar	
	EC 3.4.24.x	Metallo-endopeptidazlar	
	EC 3.4.25.x	Treonin endopeptidazlar	
	EC 3.4.99.x	Diğer endopeptidazlar	
Karbon-Azot Bağı	EC 3.5.x		
Anhidrit	EC 3.6.x		
Karbon-Karbon Bağı	EC 3.7.x		
Halojenür Bağı	EC 3.8.x		
Azot-Fosfat Bağı	EC 3.9.x		
Azot-Kükürt Bağı	EC 3.10.x		
Karbon-Fosfat Bağı	EC 3.11.x		
Kükürt-Kükürt Bağı	EC 3.12.x		
Karbon-Kükürt Bağı	EC 3.13.x		

2.6.1. Reaksiyonun çeşidine göre sınıflandırma

Enzimin gerçekleştirdiği reaksiyonun çeşidi baz alınarak proteazlar ekzopeptidaz, endopeptidaz ve omegapeptidaz olmak üzere 3'e ayrılmaktadır. Bütün proteazlar, temelde peptid bağlarının hidrolizini gerçekleştirmektedir. Fakat bu hidrolizi, ilgili peptid bağının substrattaki konumu, peptid bağının yakınındaki aminoasit kalıntıları ve henüz bilinmeyen sebepler etkilemektedir. Modelin eksikliği evrimsel ilişkiyi yansıtmamasıdır.

Endopeptidazlar (Proteinazlar)

Endopeptidazlar (proteinazlar), EC 3.4.21.x ve EC 3.4.99.x aralığında kod almaktadır. Polipeptid zincirinin serbest amino ve karboksil terminalinden uzak bölgelerinde yani polipeptid zincirinin orta (iç) kısımlarında aktivite göstermektedirler (Şekil 2.1). Bu durumun substrattaki serbest amino ve karboksil gruplarının enzim aktivitesini olumsuz etkilemesinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir (Motyan ve ark. 2013).

Endopeptidazlar, serin (S) endopeptidaz (EC 3.4.21.x), sistein (C) endopeptidaz (EC 3.4.22.x), aspartik (A) endopeptidaz (EC 3.4.23.x), metallo (M) endopeptidaz (EC 3.4.24.x), treonin (T) endopeptidaz (EC 3.4.25.x) ve diğerk endopeptidazlar (EC 3.4.99.x) olmak üzere 6 gruba ayrılmaktadır (Çizelge 2.1, Şekil 2.1). Endopeptidazlara örnek olarak kimotripsin, pepsin ve papain verilebilir (Duschak ve Couto 2009). Oligopeptidaz olarak adlandırılan bazı endopeptidazlar ise sadece kısa polipeptid zincirlerinin hidrolizini sağlamakta, uzun polipeptid zincirlerinin ve proteinlerin hidrolizini sağlayamamaktadır. Bunun sebebi oligopeptidazların aktif merkezinin enzimdeki yerleşim yerinin çok dar bir alanda olması ve büyük proteinlerin bu alana erişememesidir. Endopeptidaz aktivitesi sayesinde ekzopeptidazlar için substrat olabilen yeni substratlar yani amino ve karboksil uç içeren yeni substratlar meydana getirmeleri açısından çok önemlidirler fakat hidroliz yetenekleri sınırlıdır (Turner 2004, Monnet 2013).

Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar, EC 3.4.11.x ve EC 3.4.19.x arasında kod almaktadır (Çelik 2018). Ekzopeptidaz aktivitesi için substratlarının, amino terminal (serbest amino grubu), karboksil terminal (serbest karboksil grubu) içermesi gerekmektedir. Hatta bazılarının aktivitesi hem serbest amino hem de serbest karboksil grubu gerekmektedir (Şekil 2.1). Ekzopeptidazlar, temelde aminopeptidazlar (AP) ve karboksipeptidazlar (CP) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Terminal uçtan hidroliz ettikleri aminoasit sayıları değişkendir. Aminopeptidaz ve karboksipeptidaz bir; dipeptidil-peptidaz ve peptidil-dipeptidaz iki; tripeptidil-peptidaz ise üç aminoasit koparmaktadır (Polaina ve MacCabe 2007).

Aminopeptidazlar (EC 3.4.11.x); peptidlerin amino terminalinden bir aminoasit koparılmasının katalizini sağlamaktadır (Şekil 2.1). Substratlarında serbest amino terminali bulunmalıdır (Luan ve Xu 2007).

Dipeptidazlar (EC 3.4.13.x); dipeptidlerin hidrolizini sağlamaktadır. Çünkü substratları hem serbest amino hem de serbest karboksil terminali içermelidir (Şekil 2.2).

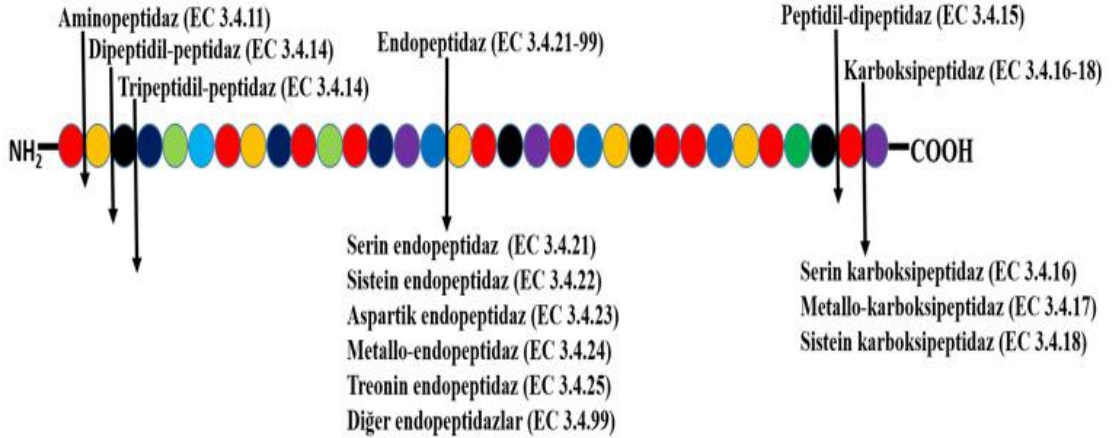
Dipeptidil-peptidazlar (EC 3.4.14.x); peptid zincirinin serbest amino terminalinden bir dipeptidin hidrolizini sağlamaktadır (Şekil 2.1). Kataliz reaksiyonu sonucunda sırasıyla dipeptid ve peptid oluştuğı için bu ismi almaktadır. Genellikle aminopeptidaz veya dipeptidazlar ile karıştırılmakta fakat kesinlikle çok farklıdır (Ruffell ve ark. 2013).

Tripeptidil-peptidazlar (EC 3.4.14.x); peptid zincirinin serbest amino terminalinden bir tripeptidin hidrolizini sağlamaktadır (Şekil 2.1). Kataliz reaksiyonu sonucunda sırasıyla tripeptid ve peptid oluştuğu için bu ismi almaktadır (Rockel ve ark. 2012).

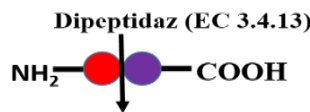
Peptidil-dipeptidazlar (EC 3.4.15.x); peptid zincirinin serbest karboksil terminalinden bir dipeptidin hidrolizini sağlamaktadır (Şekil 2.1). Katalizi sonucunda sırasıyla peptid ve dipeptid oluşmasından dolayı bu ismi almaktadır (Akbulut ve ark. 2004).

Karboksipeptidazlar (EC 3.4.16-18.x); peptid zincirinin serbest karboksil terminalinden bir aminoasitin hidrolizini sağlamaktadır (Şekil 2.1). Karboksipeptidazlar enzimde nükleofil olarak hareket eden gruplar baz alınarak serin karboksipeptidazlar (EC 3.4.16.x), metallo-karboksipeptidazlar (EC 3.4.17.x) ve sistein karboksipeptidazlar (EC 3.4.18.x) olmak üzere 3'e ayrılmaktadır (Makino ve ark. 2019).

Bazı ekzopeptidazlar için bazı başka terimler de kullanılmaktadır. Örneğin, tripeptidaz olarak isimlendirilen peptidazlar yalnızca tripeptidlerin hidrolizini gerçekleştirmektedir. Bilinen tripeptidazlar, peptid zincirine amino terminalinden atak yapmakta ve ürün olarak bir aminoasit ve dipeptid vermektedir. Bu sebeple tripeptidazlara aminotripeptidaz da denilmektedir (Bacon ve ark. 1993).



Şekil 2.1. Endopeptidaz ve ekzopeptidazların aktivite gösterdiği peptid bağlarının konumu (Anonim 2019d).



Şekil 2.2. Dipeptidazların aktivite gösterdiği peptid bağının konumu (Anonim 2019d).

Omega peptidazlar

EC 3.4.19.x kodunu alan omega peptidazlar, substratlarının serbest amino veya karboksil terminal taşımalarına gerek duymamaktadır. Fakat genellikle terminallere yakın bölgelerde aktivite göstermektedir (Şekil 2.3). Omega peptidazlar, endopeptidaz ve ekzopeptidaz arasında geçiş formudur (Anonim 2019d). Çünkü, substratı serbest amino veya karboksil terminali içermemekte (endopeptidaz gibi); karboksil veya amino terminaldeki bir veya birkaç aminoasitin hidrolizini gerçekleştirmektedir (ekzopeptidaz gibi).



Şekil 2.3. Omega peptidazların aktivite gösterdiği peptid bağlarının konumu (Anonim 2019d).

2.6.2. Reaksiyonun kimyasal mekanizmasına göre sınıflandırma

Bu sistemde nükleofil olarak hareket eden gruplar baz alınmaktadır. Nükleofil olarak hareket eden moleküller, proteaz enziminin aktif merkezinde bulunmakta ve elektron vererek peptid bağının parçalanmasını (hidrolizini) sağlamaktadır. Bu molekül aminoasit kalıntısı (serin, treonin, sistein, aspartik asit, asparajin, glutamik asit) veya aktifleştirilmiş su molekülü olabilmektedir. Kısacası bu aminoasit kalıntısının veya aktifleştirilmiş olan su molekülünün katalizlenen reaksiyonun yürütülmesinde bilfiil fonksiyonu vardır (Hartley 1960). Bu sistemde proteazlar serin (S), sistein (C), aspartik (A), metallo (M), treonin (T), mekanizması bilinmeyen (U) olarak 6 gruba ayrılmaktadır. Fakat bazı veri tabanlarında asparajin (N), karışık (P) glutamik (G) gibi gruplar da eklenerek proteazlar toplam 9 gruba ayrılmaktadır (Anonim 2019d). Bilinen proteazların %34 serin (S), %28 metallo (M), %22 sistein (C), %7 aspartik (A), %4 treonin (T), %1 glutamik (G), %1 asparajin (N), %1 karışık (P), %1 bilinmeyen (U) olarak tanımlanmıştır (Anonim 2019e).

Peptid bağının parçalanması bir asit-baz reaksiyonudur. Çünkü yüklü nükleofil proton vericisi; enzimin aktif merkezindeki bazı aminoasit kalıntıları da proton alıcısı olarak görev yapmaktadır. Proteazların aktif merkezinin oluk şeklinde olduğu, bu oluğun enzimin yüzeyinde bulunduğu belirlenmiştir. Aktif merkez, doğru substratın enzime doğru şekilde bağlanmasını ve peptid bağının hidrolizinde görev yapacak aminoasit

kalıntılarından oluşmaktadır. Nükleofilik aminoasitlerin yanı sıra, aktif merkezdeki diğer aminoasit kalıntıları da aktif merkezin yapısında ve katalizde önemlidir (Çelik 2018).

Serin (S) proteazlar; aktif merkezinin katalitik bölgesinde nükleofilik serin kalıntısı taşımaktadır. Katalitik bölgedeki serin amino asitinin hidroksil grubu nükleofil olarak hareket etmektedir. Katalitik bölgelerinde serine ek bazen histidin, lizin, aspartik asit ve glutamik asit bulunabilmektedir. Serin proteazlarda proton alıcısı baz, genellikle histidin bazen de lizindir. Proton alıcı baz histidin olduğunda üçüncü bir aminoasit kalıntısı da histidinin daha iyi bir proton alıcısı dolayısıyla nükleofilin de daha iyi proton vericisi olmasını sağlamak için görev yapmaktadır. Katalitik triad (üçlü) denilen bu durum bütün serin proteazlarda görülmemektedir. Kimotripsin, subtilisin gibi birçok serin proteazda katalitik triad yapısının üçüncü üyesi aspartik asittir. Omptin gibi bazı serin proteazlarda ise serin ve histidin aminoasitlerini içeren katalitik dyad (ikili) yapısı görülmektedir. Serin proteazlarda önemli olan dördüncü bir aminoasit kalıntısı bulunmaktadır. Bu aminoasit kalıntısı substrat ürüne dönüşürken oluşan ara maddenin stabilizasyonunu sağlamaktadır. Dördüncü aminoasit kalıntısı değişkendir, kimotripsin için glisin, subtilisin için asparajindir. Bazı serin proteazlar ise tek bir katalitik aminoasit kalıntısı taşımaktadır. Bu aminoasit kalıntısının enzimin amino terminalinde bulunması sebebi ile bu proteazlara N-terminal nükleofil (Ntn) hidrolazlar denilmektedir (Barrett ve ark. 2012). Çizelge 2.2’de çeşitli özellikleri verilen serin proteinazlara örnek olarak tripsin, kimotripsin, elastaz, trombin, plazmin, subtilisin verilebilir (Polaina ve MacCabe 2007).

Sistein (C) proteazlar; tüm canlı organizmalarda görülmektedir ve tiyol proteazlar olarak da adlandırılmaktadır. Katalitik bölgesinde nükleofilik sistein aminoasiti kalıntısı bulunmaktadır. Sistein proteazlarda katalitik reaksiyon sırasında katalitik bölgedeki sistein amino asitinin sülfidril grubu nükleofil olarak hareket etmektedir (Hartley 1960). Bazıları ise katalitik bölgesinde sisteine ek histidin, glutamik asit, aspartik asit kalıntısı içermektedir. Sistein proteazlarda genellikle proton alıcısı baz histidin bazen de lizindir. Proton alıcı baz histidin olduğu zaman üçüncü bir aminoasit kalıntısı da histidinin daha iyi bir proton alıcısı dolayısıyla nükleofilin de daha iyi proton vericisi olmasını sağlamak için görev yapmaktadır. Katalitik triad (üçlü) denilen bu durum bütün sistein proteazlarda görülmemektedir. Sistein proteazda katalitik triad yapısının üçüncü üyesi değişkendir. Örneğin papain için asparajin, ubiquitin hidrolaz için aspartik asittir. Çoğu sistein proteazda sistein ve histidin aminoasitlerini içeren katalitik dyad (ikili) yapısı

görülmektedir. Sistein proteazlarda önemli olan dördüncü bir aminoasit kalıntısı bulunmaktadır. Bu aminoasit kalıntısı substrat ürüne dönüşürken meydana gelen ara maddenin stabilizasyonunu sağlamaktadır. Dördüncü aminoasit kalıntısı değişkendir. Örneğin papain için glutamik asittir. Bazı sistein proteazlar ise sadece tek bir katalitik aminoasit kalıntısı taşımaktadır. Bu aminoasit kalıntısının enzimin amino terminalinde bulunmasından dolayı bu proteazlara N-terminal nükleofil (Ntn) hidrolazlar denilmektedir. Çizelge 2.2’de çeşitli özellikleri verilen sistein proteazlara örnek olarak kaspaz, papain, bromelain ve fisin verilebilir (Sari 2011).

Aspartik (A) proteazlar; kataliz mekanizmasıyla ilgili aminoasit kalıntısı olarak aspartik asit bulundurmaktadır. Aspartik proteazların hepsinin katalitik bölgelerinde iki aspartik asit kalıntısı bulundurmakta ve aktifleştirilmiş olan bir su molekülü ise nükleofil olarak hareket etmektedir. Aspartik proteazlar aynı zamanda karboksil proteaz ve asidik proteaz olarak da adlandırılmaktadır. Çünkü peptid bağlarını hidrolizinin katalizine enzimin katalitik bölgesinde iki aspartik asit katılmaktadır. Aspartik asitlerden birinin karboksil grubu peptid bağı hidrolizinde rol oynamaktadır. Ortamda bulunan su molekülünün hidrojen iyonunun aspartik asitin karboksil grubu tarafından alınması sonucunda, su molekülü kaynaklı hidroksil iyonu proteindeki peptid bağının hidrolizine katılmaktadır. Aspartik proteazlarda su molekülü direkt olarak enzimin aspartik kalıntısının yan zincirine bağlanmaktadır. En iyi bilinen üyeleri kimozin ve pepsindir (Polaina ve MacCabe 2007). Diğer bazı özellikleri Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Metallo (M) proteazlar; kofaktörü metal iyonu olan proteaz enzimleridir. Metallo proteazlarda genellikle aktifleştirilmiş olan bir su molekülü nükleofil olarak hareket etmektedir. Metallo proteazlar katalitik aktiviteleri için iki değerlikli metal iyonlarına ihtiyaç duymaktadır. Metallo proteazlar, yüklü olan aminoasit yan zincirlerine metal iyonları ile bağlanmaktadır. Kısacası metal iyonları su moleküllerinin kullanabilmesini sağlamaktadır (Cerde-Costa ve Gomis-Ruth 2014). Çoğu metallo proteaz aktivitesi için çinkoya ihtiyaç duymaktadır. Bazıları ise kobalt, manganez, nikel veya bakıra ihtiyaç duymaktadır. Bu metal iyonu enzimin aktif merkezindeki 3 aminoasit ve 1 su molekülü vasıtasıyla çevrelenerek, koordine edilmektedir. Kısacası tek bir metal iyonu genellikle üç aminoasit ve bir aktive olmuş su molekülü ile bağlanmaktadır. Dolayısıyla bu metal iyonu tetrahedral yapıyı oluşturan moleküldür ve önemi çok büyüktür. Bu aminoasitler, glutamik asit, histidin, aspartik asit, lizin, arjinin olabilmektedir. Glutamik asidin çoğu

metallo proteaz aktivitesinde önemli olduğu bilinmektedir. Bazı metallo proteazlarda ise iki metal iyonu birlikte hareket etmektedir. İki katalitik metal iyonuna sahip metallo proteazlarda ise genellikle glutamik asit ve aspartik asit olmak üzere iki aminoasit kalıntısı bulunmaktadır (Reunanen ve Kahari 2013). Neprilysin ve jelatinazın örnek olarak verilebileceği metallo proteazların bazı özelliklerine Çizelge 2.2’de yer verilmiştir.

Treonin (T) proteazlar; aktif merkezinde treonin, metiyonin ve bir amit taşımaktadır. Treonin proteazlarda katalitik bölgedeki treonin amino asitinin hidroksil grubu nükleofil olarak hareket etmektedir. Bütün treonin proteazlar tek katalitik aminoasit kalıntısı taşımaktadır. Bu kalıntı enzimin amino terminalinde bulunduğundan, bu proteazlar N-terminal nükleofil (Ntn) hidrolazlar olarak da bilinmektedir (Barrett ve ark. 2012).

Glutamik (G) proteazlar; katalitik merkezinde bir glutamik asit ve bir glutamin kalıntısı bulunmaktadır. Proteazların %1’lik kısmını oluşturmaktadır. Pepstatin adlı mikrobiyal proteaz inhibitörlerine karşı dayanıklı olan bu enzim grubu, eskiden pepsitasin-duyarsız karboksil peptidazlar olarak tanımlanmaktaydı (Sari 2011).

Çizelge 2.2. Serin, sistein, aspartik ve metallo proteazların bazı özellikleri (Sari 2011).

İsim	Serin	Sistein Tiyol	Aspartik, Karboksil Asidik	Metallo
Aktif Merkezde Katalizden Sorumlu Bileşen	Serin	Sistein	Aspartik Asit	Çinko, Kobalt, Nikel, Manganez, Bakır
Nükleofil Olarak Hareket Eden Bileşen	Serinin hidroksil grubu	Sisteinin sülfidril grubu	Aktifleştirilmiş su molekülü	Aktifleştirilmiş su molekülü
Aktif Olduğu pH Değeri	7.0-9.0	3.0-7.0	2.0-6.0	5.0-9.0
Aktif Olduğu Sıcaklık Değeri (°C)	20-80	25-70	40-70	40-60
Moleküler Ağırlık (kDa)	20-135	20-65	30-60	20-60
İnhibitörleri	PMSF DIFP Leupeptin Aprotinin	Iyodoasetat E64 Leupeptin	Pepsitatin A	EDTA Fosforamidon 1,10-Fenantrolin
Örnek	Tripsin Kimotripsin Elastaz Subtilisin Trombin	Katepsin B ve L Kaspaz Bromelain Fisin Papain	Katepsin D ve E Kimozin Pepsin Renin (Böbrek)	Jelatinaz Neprilysin Matriks metalloproteaz

Her serin proteazın katalitik reaksiyon bölgesinde nükleofil olarak bir serin aminoasiti kalıntısı içermesi ve çoğunun PMSF'den etkilenmesi bu sınıflandırma sistemin iyi çalıştığını göstermektedir. Fakat serin proteazların farklı moleküler yapılarla sahip olması, bazı serin proteazların farklı katalitik mekanizma kullanması bu sistemin sınırlamalarıdır.

2.6.3. Enzimin moleküler yapısına göre sınıflandırma

Proteazların moleküler yapı ve homolojilerine göre sınıflandırılması diğerlerine göre en yenisidir. Çünkü aminoasit sekansı ve 3 boyutlu yapı ile ilgili veriler 1990'ların başında depolanmaya başlanmıştır. Rawlings ve Barrett (1993) tarafından oluşturulan bu sistemde spesifik enzimler aileleri, aileler ise klanları oluşturmaktadır (Anonim 2019d). Bu sistem kullanılarak proteazlar ve onların inhibitörlerinin verildiği MEROPS veritabanı oluşturulmuştur (Rawlings ve ark. 2018). MEROPS veritabanında her proteaz, aminoasit sekansındaki benzerliklere göre bir aileye atanmakta ve ardından daha yüksek homolojiye sahip aileler aynı klana atanmaktadır. Örneğin serin proteazı klanlarından SB klanı üyelerinde katalitik bölgede serin, histidin, asparajin bulunurken; ST klanı üyelerinde serin ve histidin bulunmaktadır. Ayrıca nükleofil olarak hareket eden kalıntılarının konumu da farklıdır. Örneğin, SB klanındakilerde 221. aminoasit; ST klanındakilerde ise 201. aminoasit nükleofil olarak hareket etmektedir (Sari 2011). Proteazların sınıflandırılmasında kullanılan diğer veritabanı Protein Veri Bankası (PDB) ise bütün proteinler ve onların üç boyutlu yapılarının bulunduğu bir kaynaktır (Anonim 2020c).

2.7. Proteaz Kaynakları

Proteazlar, arke, bakteri, maya, küf, bitkisel ve hayvansal doku gibi canlılar ve virüsler tarafından ortak olarak sentezlendiği bilinen en önemli enzim gruplarından (Anandharaj ve ark. 2016). Proteazlar kaynak aldığı organizmaya göre farklı pH değerlerinde aktivite göstermektedir. Örneğin, genellikle pankreas kaynaklılar pH 7.5-8.5; fungal kaynaklılar pH 3.5-5.0, bakteriyel kaynaklılar ise pH 6-11 aralığında aktivite göstermektedir (Afşar ve ark. 2003). Fungal asidik proteazlar ve bitki kaynaklı nötral proteazlara göre bakteriyel alkalin ve nötral proteazlar endüstriyel açıdan daha fazla tercih edilmektedir (Razzaq ve ark. 2019).

2.7.1. Bitkisel kaynaklı proteazlar

Bitkilerden izole edilerek biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmış proteazlardan bazılarına örnek olarak actinidin (kivi, *Actinidia deliciosa*), bromelain (ananas, *Ananas comosus*), cardosin (yabani enginar, *Cynara cardunculus*), cucumisın (kavun, *Cucumis melo*), ficin (incir, *Ficus* sp.), oryzasin (pirinç, *Oryza sativa*), papain (papaya, *Carica papaya*), phytesin (arpa, *Hordeum vulgare*), Zingipain (zencefil, *Zingiber officinale*) verilebilir (Arshad ve Amid 2014, Tavano ve ark. 2018). Bunların içinde en iyi bilinenleri papain, bromelain ve fisindir (Işık 2014).

2.7.2. Hayvansal kaynaklı proteazlar

Günümüze kadar birçok hayvanın mide ve bağırsak ve kas gibi organları proteaz kaynağı olması açısından incelenmiştir. Bunlara örnek olarak, balık, sucul omurgasızlar, geviş getiren hayvanlar verilebilir (Yanar 2015). En iyi bilinen hayvansal proteazlar pankreastan salgılanan tripsin ve kimotripsin, mideden salgılanan pepsin ve rennindir. Daha çok buzağı midesi (genç geviş getiren hayvanların şirdenlerinin iç mukozasından) elde edilen rennin kullanılmaktadır (Işık 2014).

2.7.3. Mikrobiyal kaynaklı proteazlar

Günümüzde kullanılan endüstriyel enzimlerin yaklaşık olarak % 37-40'ı mikroorganizmalardan elde edilmektedir (Giri ve ark. 2011). Mikrobiyal proteazlar için en önemli enzim kaynağı maya, küf ve bakterilerdir. Mikrobiyal proteazlar, dünyadaki toplam enzim satışının yaklaşık % 60-65'ini oluşturduklarından endüstriyel enzim pazarının lideridir (Rai ve Mukherjee 2010).

Birçok enzim gibi proteazlarında daha çok mikroorganizmalardan elde edilmesi hem organizmanın hem de üretilen enzimin cazip karakteristik özellikleri taşımasıdır (Singhal ve ark. 2012, Hosseini ve ark. 2016). Mikroorganizma kullanımının avantajları; mikroorganizmaların daha yüksek biyokimyasal çeşitliliğe sahip olması, hücre yapılarının genetik manipülasyonlara uygun olması (bu sayede ilgili enzim üretiminin kolaylıkla geliştirilebilmesi), yüksek üretim potansiyeline sahip olmaları, ekonomik,

hızlı ve kolay üretilebilmeleri (hatta çok küçük alanlarda bile çok fazla miktarlarda üretilebilmeleri), yenilenebilir kaynakların üretimde kullanılabilmesi, iklim ve mevsim değişimlerinden etkilenmemeleri, ilgili enzim üretimi için mikroorganizmaların kolaylıkla indüklenebilmesi, üretim süresinin kısa olması, genellikle ekstrasellüler enzim üretmeleri dolayısıyla üretim ortamından enzim izolasyonunun kolay olması ayrıca enzimin hücre dışına çıkarılmasının oluşturacağı zahmet ve maliyetin olmamasıdır (Tufvesson ve ark. 2011, Puvanakrishnan ve ark. 2012). Mikrobiyal enzimlerin, tercih edilmesinin sebebi ise; enzimin daha cazip karakteristik özellikleri taşımasıdır. Bu özelliklere örnek olarak ekstrem sıcaklık ve pH değerlerinde stabil olmaları, yüksek katalitik aktivite, substrat spesifikliğı, verim ve biyokimyasal çeşitliliğe sahip olmaları verilebilir (Hosseini ve ark. 2016). Enzim üretiminde bitki ve hayvan kullanımının ise ayrıca bazı dezavantajları vardır. Bunlar; enzim üretim, izolasyon ve saflaştırma işlemlerinin daha fazla komplikasyona açık olması, hayvan kullanımında etik açıdan aşılması gereken sorunların olması kısacası hem işlevsel hem de pratik olmamasıdır (Ormandy ve ark. 2011). Mikroorganizmaların kullanımında dikkat edilmesi gereken tek husus mikroorganizmanın patojen olmaması ve toksin yan ürün üretmemesidir (Demain ve Solomon 1981). Mikrobiyal proteazların moleküler ağırlığı genellikle 40-130 kDa aralığındadır (Bashir ve ark. 2018). Mikrobiyal kaynaklar arasında ise en cazibi bakterilerdir. Çünkü fungal proteazlar genelde intraselülerdir. İzolasyon, saflaştırma, tasarımıda kolaylık sağladığından genelde bakteri tercih edilir (Belmessikh ve ark. 2013).

Asidik proteazlar genellikle fuguslardan, nötral proteazlar ise başta bakteriler olmak üzere bitkilerden izole edilmektedir. Alkalen proteazlar ise daha çok bakterilerden olmakla birlikte fungal kaynaklardan izole edilmektedir (Razzaq ve ark. 2019).

Bakteriyel proteazlar; endüstriyel olarak üretilen proteazların % 70'inden fazlasını oluşturmaktadır. Birçok mikroorganizma proteaz üretebilmektedir. Fakat sadece yeterli miktarda ekstrasellüler proteaz üretebilen mikroorganizmaların endüstriyel açıdan önemi vardır. Bu açıdan bakteriyel proteazların eldesinde *Bacillus* cinsi öne çıkmaktadır (Kim ve ark. 2016, Si ve ark. 2018). Ticari olarak kullanılan proteazların çoğunun *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar tarafından üretilen nötr veya alkali koşullarda aktivitesini sürdürebilen enzimlerdir (Gupta ve ark. 2002, Hakim ve ark. 2018).

Bakteriyel nötral proteazlar pH 5.0-8.0 değerleri aralığında aktiviteye sahiptir ve nispeten termotoleransı düşüktür (Razzaq ve ark. 2019). Orta seviyede bir reaksiyon hızına sahip olması sebebi ile gıdalarda hayvansal kaynaklı proteazlara göre daha fazla kullanılmaktadırlar. Çünkü bakteriyel proteazlar tarafından hidrolizi gerçekleştirilmiş olan gıdalarda hayvansal kaynaklı enzimlere göre daha az acımtırak tad oluşturması sebebi ile gıda endüstrisinde çok rağbet görmektedir (Rao ve ark. 1998).

Bakteriyel alkalen proteazlar ise pH 9.0-11.0 değerleri aralığında aktiviteye sahip iken, optimal pH değerleri genellikle 10.0 civarındadır. Geniş çapta substrat spesifikliğine sahip olmaları ile karakterize edilmektedirler (Razzaq ve ark. 2019, Sharma ve ark. 2019).

Endüstriyel enzimlerin çok büyük bir kısmının orijini *Bacillus* cinsi bakterilerdir. Bu durumun en önemli sebebi, diğerlerine nazaran üretim kapasitesi (Bazı *Bacillus* sp. üyeleri besi ortamına en az 20 g/L ekstrasellüler protein salgılamaktadır.) ve aktivitelerinin yüksek olmasıdır (Razzaq ve ark. 2019). *Bacillus subtilis* suşlarının ise hızlı şekilde çoğalmaları, GRAS statüsünde olmaları, ürettikleri proteazların veriminin yüksek olması ve ölçeklenebilir olması yani kullanım kapasitesindeki artışın performansını etkilememesi özelliğine sahip olması gibi avantajlarından dolayı proteaz üretiminde diğer *Bacillus* üyelerine göre daha fazla kullanılmaktadırlar (Anonim 1999).

Fungal proteazlar; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola*, *Thermoascus*, *Thermomyces* cinslerinin üyelerinin de içinde bulunduğu çok sayıda fungus tarafından sentezlenmektedir (Souza ve ark. 2015). *Aspergillus* cinsinin endüstriyel ölçekte enzim üretiminde tercih edilmesinin sebebi, ucuz tarımsal atıkları kullanarak, büyük ölçekte ekstrasellüler enzim üretebilmesidir. Funguslar bakterilerden daha çok enzim çeşitliliğine sahiptir. Örneğin, *A. oryza* asidik, nötral ve alkalen proteaz sentezleyebilmektedir. Yani bazı funguslar çok geniş pH (3.0-12.0) aralığında proteaz sentezleyebilmekte; geniş aralıkta substrat spesifikliği göstermektedirler. Ancak termotoleransları ve aktiviteleri bakteriler kadar yüksek değildir (Vishwanatha ve ark. 2009, Yadav ve ark. 2019).

Fungal asidik proteazların aktivitelerini pH 3.8-5.6 aralığında koruduğu ve optimal pH değeri 4.0-4.5 olduğu bilinmektedir. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Humicola*, *Phanerochaete*, *Endothia*, *Rhizopus*, *Thermoascus* cinsi üyeleri kullanılarak asidik proteazın üretildiği rapor edilmiştir (Souza ve ark. 2015, Razzaq ve ark. 2019).

Fungal nötral proteazların aktivitelerini pH 6.0-8.0 aralığında koruduğu; optimal pH'larının 7.0 olduğu; genellikle metallo proteaz olduğu bildirilmiştir. *Aspergillus* sp. ve *Penicillium* sp. kullanılarak nötral proteaz üretildiği bildirilmiştir (Wang ve ark. 2007).

Fungal alkalen proteazların aktivitelerini pH 8.0-13.0 aralığında korumaktadır. Başta *Aspergillus* ve *Penicillium* olmak üzere *Beauveria*, *Botrytis*, *Conidiobolus*, *Engyodontium*, *Metarhizium*, *Myceliophthora* cinsi üyeleri kullanılarak alkalen proteazın üretildiği rapor edilmiştir (Sandhya ve ark. 2005, Vranova ve ark. 2013).

Viral proteazlar; virüslerin genetik materyali (DNA veya RNA) tarafından kodlanan intraselüler enzimlerdir (Steinkuhler 2008). Virüsler, konak hücrenin ribozomunu kullanarak protein sentezledikleri için, bütün enzimleri gibi proteazları da intraselülerdir. Bazı virüslerde serin, aspartik, sistein peptidazların bulunduğu belirlenmiştir. Viral proteazların hiçbiri metallopeptidaz değildir (Babe ve Craik 1997).

2.8. Proteazların Kullanım Alanları

Endüstriyel gelişimin yarattığı tek kötü unsur atıkların çoğalmasıdır. Bu durum yeşil kimya ve ekolojik tasarım gibi yaklaşımlara ilgiyi arttırmıştır (Vaccaro 2016). Yeşil kimya, kimyasal ürün ve işlemlerde güvenilirlik ve yenilenebilirliğin artmasını; solvent ve enerji kullanımını, atık ve yan ürün miktarının azalmasını sağlayan ilkelerin benimsenmesidir. Ekolojik tasarım (Eco-Design), çevreye duyarlı malzemelerin üretilip kullanılmasını savunan bir yaklaşımdır; endüstriyel faaliyet kaynaklı kirliliği azaltmak için çevre dostu yöntemleri desteklemektedir. Enzimler de güvenilir ve sürdürülebilir oldukları için yeşil kimyasallardandır (Selamet 2012, Sheldon ve Woodley 2018).

Endüstriyel enzim üretimi daha çok Danimarka (Novo Nordisk), ABD (DuPont Industrial Biosciences, Enzyme Development), Japonya (Nagase Biochemicals, Amano Enzyme, Godo Shusei), Almanya (Henkel, Solvay, AB Enzymes), Çin (Wuxi Syder Bio-Products), Hindistan (Advanced BioChemicals) ülke ve şirketleri tarafından gerçekleştirilmektedir (Kalia ve Saini 2017). Küresel enzim pazarının değerinin 2018'de 7,1 milyar ABD doları olduğu ve bu değerinin yıllık % 5,5'lik büyüme hızıyla 2026'da 11,03 milyar ABD dolarına ulaşacağı tahmin edilmektedir. Kullanımı en fazla olan enzimler proteaz, lipaz, karbohidraz, polimeraz, nükleazdır. Küresel enzim pazarında en

büyük pay sahibi, mikrobiyal enzimlerdir. Mikrobiyal enzimlerin 2018'de pazarın % 37'lik kısmını oluşturduğu ve bu oranın % 5,8'lik büyüme hızı ile 2026'da % 38'e ulaşacağı tahmin edilmektedir. Hidrolazların, 2018'de küresel enzim pazarının % 24'ünü oluşturduğu ve bu oranın yıllık % 6'lık büyüme hızı ile 2026'da %26'ya ulaşacağı tahmin edilmektedir (Anonim 2019a). Hidrolazların endüstriyel enzimlerin yaklaşık olarak % 75-80'ini oluşturduğu buna ek olarak hidrolazların arasında ise endüstriyel açıdan en fazla rağbet gören grubun ise proteazlar ardından karbohidrazlar olduğu rapor edilmiştir (Anonim 2018). Proteazların ise endüstriyel enzimlerin yaklaşık olarak % 60-65'ini oluşturduğu ve yıllık % 6,4'lük büyüme hızı ile 2022'de değerinin 3,29 milyar ABD dolarına ulaşacağı tahmin edilmektedir (Anonim 2019a). Proteazlar gıda, içecek, deri, tekstil, yem, deterjan, ilaç gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır.

2.8.1. Gıda endüstrisi

Gıda endüstrisinde proteazlar daha çok olgunlaştırma ve aroma sağlayıcı olarak kullanılmaktadır. Süt ve süt ürünleri endüstrisinde proteazlar, pıhtı oluşumu, verimin artırılması, olgunlaşmanın hızlanması, raf ömrünün uzatılması; aroma, lezzet ve renk gibi özelliklerin geliştirilmesini sağlamaktadır. Rennet, kimozi (rennin) ve pepsin denilen iki enzimin kombinasyonundan oluşmuş bir enzim karışımıdır; peynir üretiminde sütteki kazeini pıhtılaştırır. Küresel olarak üretilen peynirin yaklaşık % 33'ünde mikrobiyal rennet kullanılmaktadır (Qureshi ve ark. 2015). Buzağı renneti % 95 kimozi ve % 5 pepsinden oluşurken, ticari rennet % 70 kimozi ve % 30 pepsinden oluşmaktadır. Peynir üretiminde baskın olarak bir asidik proteaz olan kimozi kullanılması nedeni kimozi haricindeki asidik proteazların genellikle peyniri acılaştırmasıdır. Kimozindeki artış peynirin geç olgunlaşmasını, lezzetli olmasını sağlarken; pepsindeki artış acılaştırmaya neden olmaktadır (Akın 2003, Çakmakçı ve ark. 2017). Süt kazeinini pıhtılaştırıcı enzimler, geniş getiren genç hayvanların midelerinin şirdeni; incir (*Ficus carica*), teleme otu (*Euphorbia maculata*), altın çilek (*Physalis peruviana*) gibi bitkiler; şirdenki hücrelerin ilgili rennin enzimi genlerinin fungus (*A. niger*) veya bakteride (*E. coli*) klonlanmasıyla üretilen rekombinant organizmalar; fungal kaynaklar (*A. oryzae*, *C. parasitica*, *R. miehei* ve *R. pusillus*) kullanılarak elde edilmektedir. Pıhtılaştırıcı enzim olarak *Bacillus* suşlarının kullanılmamasının en önemli

sebebi bakteriyel pıhtılaştırıcı enzimlerin çok yüksek aktiviteye sahip olması sebebi ile olgunlaşmanın aşırı hızlı olmasıdır. Bu sebeple mikrobiyal kaynak kullanılacak ise asidik fungal proteazlar kullanılmaktadır (Say ve Güzeler 2016, Çakmakçı ve ark. 2017).

Proteinlerin kısmi olarak hidrolizinden oluşan ve kompleksten basite proteoz > pepton > peptid şeklinde sıralanan moleküller oluşmakta ve bunlar peynir kalitesini etkilemektedir. Proteozlar, amonyum sülfat tuzları çökelirken; peptonlar çökelmemektedir. Proteoz ve peptonların yapısında aminoasit, yağ, tuz, metal ve vitamin gibi yan gruplar bulunabilirken; peptidler yalnızca aminoasitlerden oluşmaktadır (Chittenden ve Hartwell 1891). Proteoz, pepton, peptid, aminoasitler süt ürünlerin olgunlaşmasını (karakteristik aroma ve lezzet ve doku özelliklerini kazanmasını) sağlamaktadır (Akın 2003). Ozcan ve Kural (2012), Bursa'nın yöresel Mihaliç peynirinin üretiminde; Fernandez-Garcia ve arkadaşları (1994), Manchego ve Cedar peynirlerinin üretiminde *B. subtilis* proteazı ve *M. miehei* lipazı kullanımının olgunlaşmayı kısalttığını, lezzet, aroma ve dokuyu iyileştirdiğini bildirilmiştir. Bu enzimler kombine kullanılmadığında proteaz ve lipazın birbirini baskılamadığından ya acılaşıma ya da yağlı tad oluştuğu saptanmıştır.

Fırıncılıkta proteazlar, yüksek gluten içeren hamurların yumuşatılarak yoğurma ve işleme kolaylaştırmak; bazı unlu mamüllerin (kraker, bisküvi, gofret, kurabiye ve pizza) üretiminde kabarmayı engellenmek için kullanılmaktadır. Buğday ununun yapısında bulunan gluten proteini su ile karıştığında elastik bir yapı oluşturmaktadır. Bu elastik yapıda hava kabarcıkları hapsediğinde hamur kabarmaktadır. Kabarması istenmeyen mamüllerde proteazlar kullanılarak glutenin yapısının parçalanması sağlanmaktadır. Proteazlar ekmek yapımında da önemlidir. Çünkü glutenin parçalanması hamurun yumuşamasını sağladığından yoğurmayı kolaylaştırmaktadır. Ayrıca glutenin parçalanmasıyla açığa çıkan aminoasitlerin maya tarafından kullanılması ekmeğin lezzet ve kabuk rengini arzulanan düzeye getirmektedir (Kara ve ark. 2005, Buehler 2006).

Et ve et ürünlerinin tenderizasyonu (yumuşatılması) amacıyla bitkisel (papain, bromelain, aktinidin, fisin) ve mikrobiyal (*A. oryzae*, ve *B. subtilis*) proteazlar kullanılmaktadır. Fakat bakteriyel proteazlar elastin ve kollajeni çok iyi parçalarken; miyofibrilleri pek parçalayamaktadır. Kısacası bakteriyel proteazların aktivite sergileyebilmesi için öncelikle bitkisel proteazların miyofibrilleri parçalaması gereklidir. Bu sebeple tenderizasyonda daha çok bitkisel proteazlar kullanılmaktadır (Arshad ve ark. 2016).

2.8.2. İçecek endüstrisi

İçecek endüstrisinde proteazlar, alkollü (bira ve şarap) ve alkolsüz (sebze ve meyve suyu) içeceklerin üretiminde kullanılmaktadır. Proteazlar, sebze ve meyve suyu üretiminde protein kaynaklı bulanıklığın giderilmesi ve berraklığın devamlılığının sağlanması için kullanılmaktadır. Bu sayede berrak sebze ve meyve suyu üretiminin en önemli aşaması olan durultma işleminin verimi artmakta, viskozitenin düşmesine bağlı olarak meyve suyunun parçalama, presleme ve filtrasyonu kolaylaşmakta ve kullanılan enzimler ekstraksiyonu arttırdığı için verim artmaktadır. Kısacası proteaz kullanımı ürünün kalitesini iyileştirirken, üretimi kolaylaştırmaktadır (Uçan ve Akyıldız 2012).

Proteazlar, bira endüstrisinde maltlaşmanın hızlı olmasını, fermentasyonun süresinin kısalmasını sağlayarak fermentasyonun gelişmesini, biranın berraklığının artmasını ve en önemlisi biranın soğutulması ve soğuk olarak depolanması sırasında berraklığını korumasını sağladığı için maltlama, ezme ve depolama işlemlerinde kullanılmaktadırlar. Bira üretiminin ilk aşaması olan buğday ve arpa tanelerinin malt denilen hale dönüştürülmesinde ve maltın ezilmesinde proteazlar kullanılmaktadır. Bira endüstrisinde, biraların donup çözüldükten sonra tadında ve yapısında meydana gelen bozulmaların engellenmesi için kısacası soğuğa karşı dayanıklılığının artırılması için proteazlar kullanılmaktadır (Van Donkelaar ve ark. 2016, Goma 2018).

Şarap üretiminde fermentasyonu gerçekleştiren mikroorganizmalardan kaynaklanan çok sayıda enzimin rol oynamasının yanında ticari enzim preparatları da kullanılmaktadır. Şarap üretiminde proteazlar, protein kaynaklı bulanıklığın giderilmesinde yani berraklaştırma işleminde kullanılmaktadır (Dönmez 1986, Höhn ve ark. 2005).

2.8.3. Antialerjik ürünler, yapay tatlandırıcılar ve enzim takviyeleri

Spesifik bir proteini içeren ürüne (gluten, soya, yer fıstığı, yumurta, süt vb.) alerjisi olan yetişkinler ve inek sütüne alerjisi olan bebekler için antialerjik besinler üretilmektedir. Yeni doğan bebeklerin % 2-3'ünde parçalanmamış proteinlere karşı aşırı duyarlılık vardır ve bu durum yaklaşık olarak 1 yaşına kadar sürmektedir. Bu alerjinin sebebi inek ve koyun sütünde yüksek oranda bulunan β -laktoglobulin proteindir. Bu proteinin tripsin ve kimotripsin ile parçalanması alerjiyi ortadan kaldırmaktadır (Kondo ve ark. 2007).

Kısacası bu bebeklerin beslenmesinde kullanılan antialerjik mamaların üretiminde proteazlar kullanılmaktadır (Mahmoud ve Cordle 2000). Spesifik bir protein türüne olan alerjilerin en bilinen iki örneği soya alerjisi, çölyak hastalarında görülen gluten alerjisidir (Qureshi ve ark. 2015). Yapay tatlandırıcı olarak yaygın olarak kullanılan dipeptid türevi aspartamın üretiminde proteazlar kullanılmaktadır. Aspartam sentezi *B. thermoproteolyticus* tarafından sentezlenen termolisin'in katalizörlüğünde gerçekleşmektedir (Murakami ve ark. 1996). Çeşitli firmaların ürettiği proteaz içeren enzim takviyeleri de bulunmaktadır. Özellikle veganların tercih ettiği, bromelain ve papain içeren bu enzim takviyelerinin proteinlerinin sindirilebilirliğini arttırdığı ve bu yolla kas, eklem ve immün sistemi desteklediği bildirilmiştir (Mahmoud ve Cordle 2000).

2.8.4. Biyoaktif peptid üretimi

Proteinlerin, proteazlarla belirli bir aşamaya kadar hidrolizi sonucunda oluşan peptidlere hidrolizat denilmekte ve bu hidrolizatlar bazen sağlık açısından önemli biyolojik fonksiyonlara sahip olmakta ve biyoaktif peptid olarak adlandırılmaktadır (Bhat ve ark. 2015). Biyoaktif peptitler, insan ve hayvan sağlık ve vücut fonksiyonları üzerinde geleneksel olarak tanımlanmış olan beslenme fonksiyonlarının ötesinde olumlu etkiler yapan proteinlerin spesifik parçalanma ürünleridir. Biyoaktif peptidlerin antioksidan, antimikrobiyal, antihipertansif, opioid (narkotik analjezik, örn. morfin), antitrombotik, hepatoprotektif, immünomodülatör, yorgunluk giderici, osteoprotektif, antikaryojenik ve büyümeyi teşvik edici gibi özelliklere sahip olabildiği bilinmektedir. Antioksidan ve antimikrobiyal özelliklere sahip biyoaktif peptidler sağlık dışında gıda katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır. Buna ek olarak bazen tek bir biyoaktif peptid bu özelliklerden bir kaçına aynı anda sahip olabilir (Mares-Mares ve ark. 2017, Tavano ve ark. 2018).

Biyoaktif peptidler bu özelliklerini aminoasit kompozisyonu ve sekansına borçludur. Biyoaktif peptid üretiminde bazen fermantasyon bazen enzimler (örn. termolisin, alkalaz) kullanılmaktadır. İnsan sağlığı açısından yararlı olabilecek biyoaktif peptidlerin üretiminde farklılık yaratması için insan tarafından sentezlenmeyen termolisin ve alkalaz gibi farklı proteazlar kullanılmaktadır. Biyoaktif peptid üretiminde kullanılan enzim ve ilgili enzimin spesifikliği kadar kullanılan substratın seçimi de önemlidir (Vij ve ark. 2016). Bu peptitlerin üretiminde substrat olarak süt (kazein ve peynir altı suyu), yumurta

(albümin), soya, proteinli atıklar (balık ve et endüstrisi atıkları) kullanılabilir. Örneğin, proteinli katı hayvan atıklarından, yüksek tansiyon ve kan şekerinin dengelenmesinde kullanılan ilaç öncülü peptidler üretilmiştir (Brandelli ve ark. 2015). Kazeinden, antioksidan özellikte, hipertansiyon ve kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan ilaç fonksiyonuna sahip peptid üretilmiştir (Vij ve ark. 2016). Denizati proteinlerinden papain katalizörlüğünde yorgunluk giderici etkiye sahip peptidler üretilmiştir (Guo ve ark. 2017). Somon balığı atıklarından Corolase® PP katalizörlüğünde diyabet, hipertansiyon ve kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan ilaçların fonksiyonuna sahip olan hidrolizatlar üretilmiştir (Neves ve ark. 2017). Alamdari ve Ehsani (2017) ise süt proteinden ürettikleri hidrolizatların antimikrobiyal özellikte olduğunu bildirmiştir.

Biyoaktif peptitlerin, hücrelerin canlılığı, proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozunun gerçekleşmesinde rol oynadığını ve ayrıca kanser hücrelerini inhibe edebildiğini kanıtlamıştır (Stiuso ve ark. 2013, Yu ve ark. 2014). Protein hidrolizatları kanser hastalarının ve AIDS'li bireylerin beslenmesi için tasarlanmış diyet ürünlerinde kullanılmaktadır (Mahmoud ve Cordle 2000). Opioid peptitler ise opioid kimyasallar (narkotik analjezik, örn. morfin) gibi davranmaktadır. Sütten türetilen opioid peptid tirozin-glisin-glisin-fenilalanin birleşiminden oluşmaktadır (Silva ve Malcata 2005).

Crohn hastalığı, kısa bağırsak sendromu, pankreatit hastaları proteinleri özümseyemediğinden aminoasit eksikliği çekmektedir. Bu hastalar diyetlerinde protein hidrolizatları kullanmaktadır. Protein hidrolizatlarını kilo kontrolü sağladığı için sporcular da kullanmaktadır. Hatta lösin içeriği yüksek olanların kas ve bağ dokusu hasarlarının iyileşmesine yardımcı olduğu bildirilmiştir (Bougatef ve ark. 2012).

Gıda endüstrisinde kullanılan biyoaktif peptidler genellikle et endüstrisi atıklarından üretilmektedir. Bu atıklar yağsız etin % 25'i kadar protein içermektedir. Atıkların değerlendirilmemesi çevre kirliliğine sebep olmasının yanında israftır. Bu atıkların proteazlarla hidrolizinden oluşan hidrolizatlar gıdalarda, antioksidan, aroma geliştirici, koyulaştırıcı ve besin değeri artırıcı gibi katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır. Antioksidan peptidler, gıdalarda zamanla meydana gelebilecek acı tad, renk değişimi, aroma ve lezzette bozulma, gıdanın toksikleşmesi gibi durumları engellemektedir. Jelatin hidrolizatları ise et, peynir, konserve, puding, jöle, dondurma gibi gıdalarda koyulaştırıcı katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Aylangan ve Öztan 2008).

2.8.5. Hayvan yem ve mamalarının üretimi

Yem endüstrisinde enzim kullanımı 1980'li yıllarda başlamış olup, yemdeki besinlerin sindirilebilirliğini arttırdığı ve dolayısıyla hayvanın yemden daha yüksek oranda yararlanımını sağlaması açısından önemlidir. Yemlerde kullanılan enzimlerinin değerinin 2016 yılında 842,9 milyon ABD doları olduğu ve yıllık % 9,3'lük büyüme hızı ile 2022 yılında 1 428,6 milyon ABD dolarına ulaşacağı öngörülmektedir (Anonim 2019f).

Proteazlar, ruminant, domuz ve kanatlıların yemdeki proteinden yararlanımını arttırmakta dolayısıyla gelişim ve doğurganlığı desteklemekte; süt ve et verimini arttırmaktadır. Çünkü yemdeki aminoasitleri hayvanın yararlanabileceği şekilde açığa çıkarmaktadırlar (Rodney ve ark. 2016). Buna ek olarak proteazlar, yemde düşük kalitede protein kullanımına olanak sağlamakta, yemlere katılan protein olmayan azot takviyesinin miktarını azaltmakta, bu durum hem yem maliyeti hem de çevreye atılan azot miktarını düşürmektedir (Li ve ark. 2012). Proteazlar, dolaylı olarak nişasta sindirimini de hızlandırarak, yem üreticilerine zamandan tasarruf sağlamaktadır. Bunun sebebi proteazların gıda matrisini parçalaması sonucu yemdeki diğer enzimlerin substratına ulaşabilirlik süresini yaklaşık % 70 kısaltmasıdır (Windle ve ark. 2014).

Büyükbaş, küçükbaş, kanatlı ve balık işlenmesi sırasında meydana gelen boynuz, tırnak, kanatlı derisi, toynak, kemik, tüy, kılçık, pul, bazı organ ve doku parçaları gibi protein yapıdaki katı atıklar başta proteazlar olmak üzere çeşitli enzimlerin katalizörlüğünde ile kullanılabilir yem, mama ve gübreye dönüştürülmektedir. Bu amaçla daha çok keratinazlar kullanılmaktadır. Proteazlar, ham tüy gibi yüksek keratin içeriğinden dolayı yaklaşık % 5 oranında olan sindirilebilirliğe sahip ucuz protein kaynaklarının da monogastrik (domuz, balık, kanatlı, kedi, köpek) ve ruminant yem ve mamalarında kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Csapo ve Albert 2018).

Özellikle kedi ve köpek mamalarında ucuz maliyetli aminoasit kaynağı olması açısından tüyler fazlaca kullanılmaktadır. Proteaz kullanılmadan keratinin yapısının parçalanması ancak yüksek sıcaklık (145°C) ve yüksek basınç (0,5 MPa) altında gerçekleşmektedir. Fakat bu şartlar bazı aminoasitlerin yapısında bozulmaya neden olmaktadır. Dolayısıyla tüyler için fiziksel yöntemler yerine proteazların kullanımı daha uygundur (Pacheco ve ark. 2016).

2.8.6. Deterjan ve kuru temizleme endüstrisi

Proteazlar, protein kaynaklı kir ve lekelerin çıkarılması amacı ile deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır. Bu lekeler örnek olarak süt, yoğurt, bebek maması, çikolata, yumurta, çimen, kan, idrar, kusmuk, dışkı ve ter verilebilir. Ter, bol miktarda antimikrobiyal peptidleri içerdiğinden proteinli kirler arasındadır. Çimen lekeleri ise çimenlerdeki protein-pigment kompleksleri sebebiyle oluşmaktadır. Çünkü protein-pigment kompleksleri kumaş fiberlerine bağlanmaktadır. Çimen lekelerinin temizliği bu komplekslerin proteazlarla parçalanması ile sağlanmaktadır (Schitteck ve ark. 2001).

Proteazların çamaşır deterjanlarında kullanılması fikri ilk olarak 1913'te Otto Röhm tarafından önerilmiştir (Röhm 1913). Röhm, domuz pankreasından izole ettiği tripsini deterjana katmış, fakat deterjanın alkali olduğundan tripsin pek aktivite ve stabilite gösterememiştir. 1963 yılında ise Novo[®] (Novozyme[®]), alkalaz adlı alkali şartlara daha uygun enzimi geliştirmiş ve iki deterjan üreticisi bu enzimi kullanmıştır. Biri BIO-40 ve diğeri Boitex ile adı altında piyasaya sürmüştür. Üreticiler bu deterjanların kan lekelerini çıkardığı için hastane ve mezbahanelerde kullanılabileceğini ifade etmiştir. Kumaştaki birçok leke yüksek sıcaklık ve kuvvetli mekanik hareket birlikte kullanıldığında çıkarılabilmektedir. Fakat suyun ısıtılması maliyetlidir; yüksek sıcaklık ve kuvvetli mekanik hareket birçok kumaşta kaliteyi düşürmektedir. Proteazlar ise bu işlemi düşük sıcaklık ve kısa yıkama süresinde gerçekleştirebilmektedir (Aehle 2006). Deterjanlarda özellikle *Bacillus* cinsi kullanılmaktadır. Çünkü *Bacillus* kaynaklı alkalen proteazlar deterjan, sürfaktan ve oksitleyici bileşiklere karşı daha yüksek stabiliteye sahiptir. *Bacillus* kaynaklı proteazların Alo[®], Ariel[®], OMO[®], Rinso[®], Tide[®], Surf Excel[®] deterjanlarıyla uyumlu olduğu bildirilmiştir (Sinha ve Khare 2013).

Bulaşık makinası deterjanlarında ise sıcak suyla giderilemeyen, çökelmiş proteinli gıdaların giderilmesinde proteazlar kullanılmaktadır. Böylece fosfat kullanımı azalmakta ve düşük sıcaklıkta yıkama yapılarak enerji tasarrufu sağlanmaktadır (Contesini ve ark. 2018). Araştırmalara göre deterjanlarda kullanılan kimyasal maddelerin biyolojik olarak bozunabilirliği çok düşüktür. Bu kimyasal maddeler, alerjik reaksiyon, tahriş, kısırlık gibi sorunlara yol açmaktadır. Buna ek olarak sulardaki fosforun yaklaşık olarak % 20-60'ının deterjan kaynaklı olduğu düşünülmekte ve bu fosforun akarsu ve göllerde yol açtığı ötrofikasyon çevre açısından çok yıkıcıdır (Anonim 1994).

Proteazlar kuru temizleme endüstrisinde de kullanılmaktadır. Kuru temizlemede kullanılan çözücüler kumaşlardan süt, yumurta, kan, çimen gibi protein içeren lekelerini kolayca çıkaramamaktadır. Özellikle bakteriyel proteazlar ise bu lekeleri kumaşa zarar vermeden çıkarabilmektedir (Agasthya ve ark. 2013). Bazı çalışmalarda ise *B. subtilis* ve *B. licheniformis* proteazlarının kumaştaki saç boyasını çıkarmada etkili olduğunu ve bu amaçla kullanılabileceğini bildirmiştir (Prabakaran ve ark. 2015).

2.8.7. Tekstil endüstrisi

Proteazlar, tekstil endüstrisinde keçeleşmenin engellenmesi, ürüne parlaklık ve beyazlık kazandırmak için kullanılmaktadır. Keçeleşme, sıcak su, buhar, yıkama sırasında kullanılan kimyasal maddeler veya yıkama sırasında meydana gelen sert mekanik hareketlerden dolayı yün lifleri birbirine yaklaşması ve sonuç olarak kumaşın çekmesidir. Bu durumun engellenmesi için tekstilde klor gazı, klorlu bileşikler, organik çözücüler, potasyum permanganat, hidrojen peroksit, sodyum peroksit, perborat, reçine gibi kimyasallar kullanılmaktadır. Bunların yerine papain, pepsin ve tripsin gibi proteazlar kullanılarak keçeleşme engellenebilmektedir. Buna ek olarak bu sayede kumaş ipeksi bir parlaklık kazanmakta ve beyazlamaktadır (Anonim 2011). İpeklerde ise papain, pepsin ve tripsin enzimleri kullanılarak ipeklerin hem beyazlaması hem de parlak ve kaygan olan görünümüne kavuşması sağlamaktadır (Gunay 2013). Ham ipek yapısında bulunan sericin proteini ipeği matlaştırmaktadır. Sericin'in giderilmesi ipeğin kaygan ve parlak olmasını sağlamaktadır (Freddi ve ark. 2003, Liu ve ark. 2013).

2.8.8. Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde, makinalardaki kalın biyofilm tabakalarının temizliğinde başta proteazlar olmak üzere lipaz ve glikosidazlar kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların birbirine, canlı, cansız maddelere tutunması, mikroorganizmalar tarafından sentezlenmiş olan ekstraselüler polimerik maddelerle gerçekleşmektedir. Mikroorganizmalar, ekstraselüler polimerik maddeler ve canlı, cansız maddelerin birleşiminden oluşan bu yapıya biyofilm denilmektedir. Ekstraselüler polimerik maddeler daha çok proteinlerden oluştuğundan biyofilm gideriminde en fazla proteazlar

kullanılmaktadır (Nahar ve ark. 2018). Bu balçık şeklindeki yapı üretimi aksatarak saatte 9 000 Euro kayba yol açmaktadır. Kağıt üretiminde ortaya çıkan çamurun arıtımı ve içeriğindeki değerli organik bileşenlerin geri kazanılması için proteaz, lipaz ve amilaz enzimleri kullanılmaktadır (Karn ve Kumar 2019).

2.8.9. Farmasötik teknoloji

Proteazlar, ilaç olarak çok büyük umut vadeden bir enzim grubudur. Proteaz enzimlerinin kullanıldığı ilaçlardan bazıları Çizelge 2.3'te verilmiştir. 1965 yılından beri kullanılan Clostridial kollajenaz merhem, USFDA onayına sahip proteaz içerikli ilk ilaçtır. *Clostridium histolyticum* türünden izole edilmiş bir proteolitik enzim olan kollajenaz, ciddi yanık, yara ve kronik dermal ülserlerin tedavisinde antibiyotiklerle birlikte kullanılmaktadır. Nekrotik dokudaki kollajeni parçalayarak sağlıklı dokuya zarar vermeden kötü dokuyu seçici olarak çıkarmakta ve dokunun iyileşmesini kolaylaştırmaktadır. Bu merhemın diğer avantajları kullanımının kolaylığı, kan kaybını minimuma indirmesi, dokunun proliferasyonunu arttırmasıdır (Gilligan ve ark. 2017). Ölü ve keratinize hücrelerden oluşan nasırların tedavisinde de asitlerin yerine proteazlar kullanılmaktadır (Gupta ve ark. 2013, Singh ve ark. 2016). Proteazların en önemli diğer kullanımı ise fibrinolitik enzimler vasıtasıyla pıhtıların giderilmesidir (Okaför 2007).

Çizelge 2.3. İlaç olarak kullanılan proteaz enzimi örnekleri.

Ticari İsim	Proteaz İsmi	Endikasyonlar	FDA Onay Yılı	Kaynak
Santyle®	Kollejenaz	Yara, yanık, dupuytren, peyronie, kronik dermal ülser.	1965	Gilligan ve ark. 2017
Panafil®	Papain	Yara (diyabetik, nekrotik), varis, dental operasyon sonrası ödemin zaltılması.	Yok	Ramundo ve Gray 2008
Chymodiactin®	Kimopapain	Bel fitiği (kayan diskteki nükleus pulpozus'un giderilmesi).	1982	Köksal 2006
Granulex®	Tripsin	Yara (nekrotik), iyileşmenin hızlanması.	Yok	Bharati ve Chaurasia 2018
NexoBrid®	Bromelain	Yara, yanık.		
Elastase®	Plazmin	Yara (cerrahi, sünnet), yanık, ülser, enfekte lezyon, iyileşmenin hızlanması.		

Çizelge 2.3. İlaç olarak kullanılan proteaz enzimi örnekleri (devam).

Ticari İsim	Proteaz İsmi	Endikasyonlar	FDA Onay Yılı	Kaynak
Activase®	Doku plazminojen aktivatörü	Kan pıhtısının çözülmesi, akut pulmoner embolisi, kalp krizi, inme, kateter temizliği.	2002	Blaney ve ark. 2006
Retavase®			1996	Gelabert ve ark. 2007
BeneFIX®	Faktör-IX	Kanın pıhtılaştırılması (Hemofili B).	1997	Chowdary ve ark. 2001
NovoSeven®	Faktör-VIIa	Kanın pıhtılaştırılması (Hemofili A ve Hemofili B).	1999	Razon ve ark. 2005
Recothrom®	Trombin	Ameliyat sonrası kanamaların durdurulması.	2008	Craik ve ark. 2011
Xigris®	Aktive protein C	Sepsis (kan zehirlenmesi).	2001	
Botox®	Botulinum toxin A	İstemsiz kas spazmları (şaşıklık, tik, göz kapağı seğirmesi).	1989	
Zenpep®	Pankreatik proteaz	Kistik fibrozis (hastada görülen pankreas yetmezliği için takviye).	2009	
Penzyme®	Atlantik morinası	Ölü dokunun soyulması, cildin yenilenmesi ve gençleşmesi.	Yok	

2.8.10. Kişisel bakım ve kozmetik

Bu alanda papain, bromelain, subtilisin içeren ürünler üretilmektedir. Bu ürünler ciltte soyma (peeling) ve temizleme etkisi yapmaktadır. Bu soyma işleminde ölü ve hasarlı olan cilt bölgelerinin soyulması, böylece cildin pürüzsüz bir görünüme kavuşması sağlanmaktadır (Li ve ark. 2012). Kozmetik için kullanılan proteaz enzimlerinin eldesinde kullanılan kaynaklar *B. subtilis*, *A. niger* ve *A. flavus*'tur. Günümüzde kırışıklar için uygulanan Botox® tedavisinde de proteaz enzimi kullanılmaktadır (Çizelge 2.3). Diş macunu ve ağız bakım sularında yaygın olarak kullanılan proteaz ise papain olup, dişlerdeki plak ve birikintilerin giderilmesinde kullanılmaktadır (Singh ve ark. 2016). Proteazlar ayrıca kontakt lens temizleyicilerinde kullanılmakta, lens üzerinde oluşan protein filmlerinin nazıkçe temizlenmesini sağlamaktadır (Alfa ve Jackson 2001).

2.8.11. Sanat eseri restorasyonu

Ortaçağda kitap fasiküllerinin ve ciltlerinin yapıştırılmasında genellikle protein içerikli doğal yapıştırıcı olan kazein kullanıldığı için 1970'li yıllardan beri sanat eserinin temizliği ve restorasyonunda başta proteazlar olmak üzere enzimler kullanılmaktadır (Wendelbo ve Fosse 1970). Proteazlar özellikle önceki restorasyonlardan kalan, kazein,

hayvansal tutkal, albümin ve yumurta gibi yapıştırıcıların kalıntılarının giderilmesinde kullanılmaktadır (Dyke 2004). Hayvansal tutkallar, kıkırdak, deri veya kemikten üretilmektedir. Amilazlar, nişasta tutkallarının ve bitkisel zamların; lipazlar ise sentetik reçine, yağ ve mumların giderilmesinde kullanılmaktadır. Günümüzde restorasyon için üretilmiş enzim kitleri bulunmaktadır (Decoux 2002).

2.8.12. Enantiyoselektif sentez

Proteazlar, enantiyoselektif (asimetrik) sentez yönteminde kullanılmaktadırlar. Enantiyomer moleküller, üst üste çakışmayan ama biri diğerinin aynadaki görüntüsü olan moleküllerdir. Örneğin L-DOPA ve D-DOPA enantiyomerdir. Bu durum genellikle bu moleküllerin farklı özelliklere sahip olmasına sebep olur. Örneğin, L-DOPA, Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılırken, D-DOPA, beyaz kan hücrelerinde azalmaya sebep olduğu için asla kullanılmaması gereken kimyasaldır. Yüksek reaksiyon spesifikliğine sahip olmaları nedeniyle enzimler kullanılarak bu enantiyomerlerden sadece birinin sentezlenmesi sağlanabilmektedir (Chhabra ve ark. 2013). *B. lentus* proteazının kullanıldığı bir çalışmada istenilen enantiyomer, optik açıdan mükemmel derecede saf olarak sentezlenmiştir. Sentezlenen bu bileşik diyabetli hastalarda görülen retinopati ve nöropati tedavisinde kullanılmaktadır (Caille ve ark. 2002). Ticari olarak kullanılan Novozyme 539HPF ve Subtilisin A proteazları da optik açıdan aktif olan amin, alkol, karboksilik asitlerin sentezinde kullanılmaktadır. Organik molekül sentezinde enzim kullanımının, enzimlerin yüksek spesifitesi ve reaksiyon koşullarının ılımlılığı, reaksiyon adımlarının azalması, kimyasal kullanımının azalması, rasemik karışım oluşmadığından ayırıştırma işleminin olmaması gibi avantajları bulunmaktadır (Busto ve ark. 2011).

2.8.13. Fotografik filmlerden gümüşün geri kazanılması

Birçok fotografik film gümüş içermekte fakat sadece fotoğraf ve röntgen filmlerindeki gümüşün geri kazanımı mümkün olmaktadır, çünkü bu filmlerde gümüş jelatin içine yayılmış şekilde bulunmaktadır. Röntgen filmlerinin ağırlığının yaklaşık olarak % 1,5-2'si gümüştür. Bu gümüşün geri kazanılması için filmleri yakmak, elektroliz yöntemi ile gümüşü okside etmek, kimyasal çözeltilerle jelatini parçalanmak ve enzimatik olarak

jelatinin hidrolizi olmak üzere 4 yöntem bulunmaktadır. Geleneksel ve en fazla kullanılan yöntem olan filmlerin yakılması hem kötü kokuya neden olmakta hem de çevresel kirliliğe yol açmaktadır. Kimyasal yöntemde amonyum tiyosülfat, sodyum tiyosülfat, nitrik asit, sodyum hidroksit, sodyum siyanür gibi kimyasallar kullanılmaktadır. Bu kimyasallardan bazıları etkisini çok uzun sürede göstermekte, bazıları pahalı, bazıları ise çalışan sağlığı ve çevre açısından çok büyük tehlike oluşturmaktadır. Enzimatik yöntem olan proteolitik olarak jelatinin parçalanması yöntemi hem güvenli olması, çevreye zarar vermemesi gibi avantajlar sağlamaktadır. Bu yöntemde daha çok bakteriyel alkalen proteazlar kullanılmaktadır (Shankar ve ark. 2010).

Bacillus sp. B21-2, *Bacillus* sp. B189, *B. cereus* IND6, *B. coagulans* PB-77, *B. subtilis* NS, *Conidiobolus coronatus*, *Thermoactinomyces* sp. RS1 kaynaklı alkalen proteazların kullanılarak röntgen filminden gümüşün geri kazanıldığının bildirildiği birçok araştırma mevcuttur (Shankar ve ark. 2010, Verma ve ark. 2014, Nisha ve Divakaran 2014).

2.8.14. Atık yönetimi

Endüstriyel ve evsel atıkların yönetiminde de enzimler (proteaz, lipaz, karbohidraz, oksideredüktaz) kullanılabilir. Bu atıklar canlılar ve ekosistem için tehlikeli ve toksik olan birçok kimyasal madde içermektedir. Özellikle toksik kirleticilerin (örn. fenol, aromatik amin, nitril vb. içeren) parçalanarak zararsız ürünlere dönüşmesi yani detoksifikasyonu için kullanılan ve genellikle mikrobiyal kaynaklı olan bu enzimler uygulamada bazen tek bazen de kombine olarak kullanılmaktadır (Singh ve ark. 2016).

2.8.15. Deri endüstrisi

Enzimler, deri endüstrisinde kılların, epidermis tabakasının, yapısal olmayan artık bileşenlerin, yağlı bileşenlerin giderilmesini; atık miktarında azalmayı sağlamaktadır. Deri işlemede kimyasal maddelerin yerine enzim kullanımına imkan vermeyen tek işlem tabaklamadır. Tabaklama öncesi işlemlerde proteaz enziminin kullanımı öne çıkmaktadır. Çünkü dericilikte enzim kullanımının temelini sama prosesi oluşturmakta; ıslatma ve kıl giderimi gibi iki önemli proseste de proteazlar kullanılmaktadır.

İslatmada nötral proteazlar, kıl gideriminde alkalen proteazlar, samada ise asidik proteazlar kullanılmaktadır (Kallel ve ark. 2017). Proteazlar, kıl ve diğer istenmeyen proteinlerin (kazein, elastin albümin, globülin) hidrolizini; protein yapısındaki kirlerin yapısının parçalanıp giderilmesini; derideki kılların giderilmesini; deri liflerinin açılmasını; derinin daha iyi su çekerek şişmesini ve yumuşamasını (esnemesini); deri endüstrisi kaynaklı hayvan atıklarının bertarafının sağlanmasında kullanılmaktadır (Sanghi ve Singh 2012). Lipazlar ise deriye gömülü haldeki yağları gidererek derinin su geçirmezliğini arttırmaktadır (Puvanakrishnan ve ark. 2015). Pankreas preparatlardaki karbohidrat sindirimini sağlayan amilaz gibi enzimlerin deriye etkisinin olmadığı düşünülmüştür; sonraları bu enzimlerin derinin yumuşak ve esnek olmasını sağladığı; kıl giderimini desteklediği belirlenmiştir (Hammami ve ark. 2017).

Dericilikte en fazla tripsin, kimotripsin, elastaz, papain, katepsin, pepsin, kollejenazlar kullanılmaktadır. Deri işlemede ilk önceleri pankreatik tripsin kullanılmıştır ancak sonraları yerini bakteriyel ve fungal proteazlar almıştır (Thorstensen 1993). Günümüzde derinin işlenmesinde kullanılan ve *Bacillus* sp. kaynaklı olan birçok ticari proteaz bulunmaktadır. Örneğin PrimaTan® (*Bacillus* sp.), NovoBate® WB (*Bacillus* sp.), Proleather® FG-F (*Bacillus subtilis*, optimum pH: 10.0) samada kullanılmaktadır. Kireçleme aşamasında yardımcı olarak Nue® (*Bacillus* sp., optimum pH: 12.0-13.0) kullanılmaktadır. Sama ve kıl gideriminde ise Thermoase® (*Bacillus stearothermophilus*, optimum pH: 7.0-8.5) kullanılmaktadır (Schaechter 2009, Rampelotto 2016). Kıl gideriminde kullanılabileceği kabul görmüş ve en bilinen fungal proteaz enzimi *Aspergillus flavus* kaynaklı Clarizyme® adı ile patentlenmiş alkalen proteazdır. Hatta bu enziminin samada da kullanılabileceği belirlenmiş ve bu sayede aynı anda kıl giderimi ve samanın yapılabileceğinin de mümkün olduğu bildirilmiştir (Anonim 2015a).

2.9. Dericilik

2.9.1. Dericilik tarihi

Hayvan derilerinin esneklik, dayanıklılık ve su geçirmez özelliklerini korunmak ve geliştirmek için işlendiği deri sanayisinde Türkiye bugün dünyanın en büyük 11'inci tedarikçisi konumundadır (Anonim 2020d). Derinin tabaklanması ilk kez M.Ö. 7000-

3300 yılları arasında Güney Asya Mehrgarh yerlileri tarafından yapılmıştır. Yazılı olarak ilk kez M.Ö. 3500 yıllarında yazıldığı düşünülen Sümer tabletlerinde dericilikte feçes, idrar, palamut, nar kabuğu, asma yaprağı, üzüm suyu, yağ, süt, şarap, bira, şap kullanıldığından bahsedilmiştir (Akbulut 2012). İbraniler tarafından günümüze taşınan yöntemde ise kılların giderilmesi için deri, idrar ve feçeste çiğnenmekte ve gevşeyen kıllar kazınarak uzaklaştırılmakta; daha sonra hayvan beyni veya dışkısına (genelde güvercin ve köpek) batırılmakta; son olarak tabaklama ajanı uygulanıp gerdirilmektedir. Gerilen deri, nemini kaybederek, tabaklama ajanını absorbe etmektedir (Anonim 2015b).

Dericilikte enzimin preparat şeklinde kullanımı gerçekte Otto Röhm ile başlamıştır. Ancak 1898 yılında Joseph T. Wood adlı derici, samada asıl etkenin dışkıları değil dışkıların içerisindeki bakteri (aslında enzim) olduğunu düşünmüş ardından Popp ve Becker (1896) tarafından izole edilmiş *Bacillus erodians* kültürünü, odun talaşı ve amonyum klorid ile karıştırarak bir sama preparatı elde etmiştir. Enzim yerine bakteri içeren bu preparatı Erodin ismi ile piyasaya sürmüştür (Wood 1912, Whitaker ve ark. 2002). Daha sonra 1910 yılında Otto Röhm, samada kullanılması için sığır pankreasından izole ettiği enzimin patentini almış ve bu enzimin "Oropon" markası ile ticari olarak satışını gerçekleştirmiştir. Röhm, daha sonra bu enzimlerin kıl gideriminde de kullanılabileceğini düşünmüş ve 1913 yılında deriyi "Aranzyme" olarak adlandırılan enzimle muamele etmiş ve kılların kolayca döküldüğünü saptamıştır (Röhm 1913).

2.9.2. Deri ve bileşenlerinin yapısı

Hayvan derileri, % 60-65 su, % 25-33 protein, % 5-10 yağ ve % 0,1-0,2 mineral maddelerden oluşmaktadır (Arunachalam ve Saritha 2009). Deri, epidermis ve dermis olmak üzere 2 tabakadan oluşmaktadır (Şekil 2.4A). Hayvan derisinde bu tabakalarda daha çok fibrilli yapıya sahip olan proteinler olan keratin, kollajen ve elastin, globüler yapıya sahip olan proteinler albümin ve globülin ayrıca bir polisakkarit olan glikozaminoglikan ve az miktarda yağ bulunmaktadır (Lee 2017).

Epidermis, lifli yapıya sahip olan keratin proteininden oluşmaktadır. Suda çözünmeyen keratin, deriye mekanik etkilere karşı dayanıklılık sağlamaktadır. Epiderminin üst katmanı, kılın deri içindeki kısmının etrafını saran epidermis tabakası ve ayrıca kılın

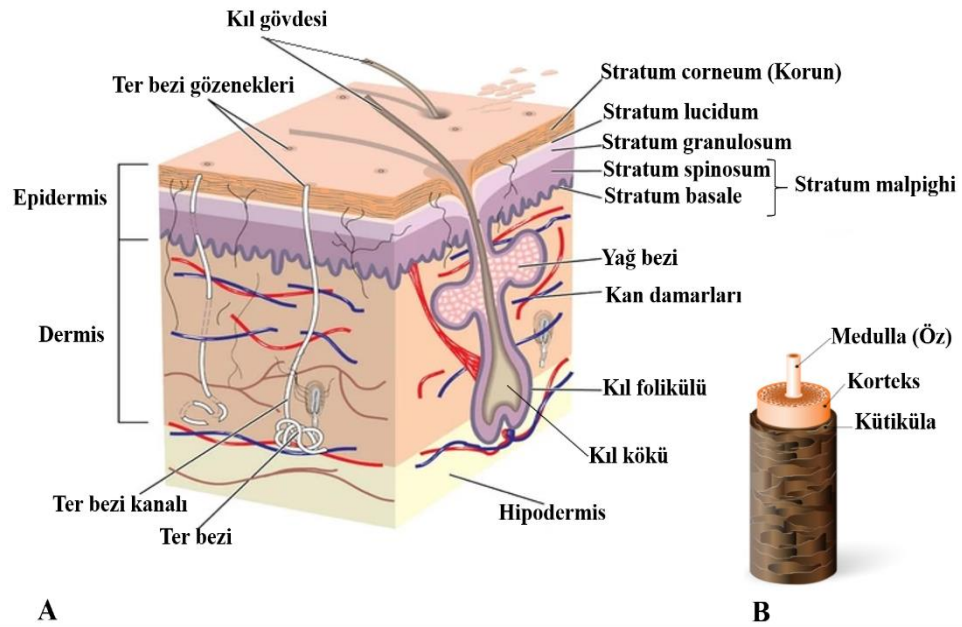
kütikula ve korteks katmanında bulunan hücreler bol miktarda keratin içermektedir. Özetle, kıl ve epidermisin büyük bir bölümü keratin denilen fibriller proteinden oluşmaktadır. Enzimler, kıl kökündeki basal hücrelerini ve derinin epidermis tabakasının malpighi tabakası hücrelerini parçalamaktadır (Şekil 2.4A) (Kamini ve ark. 1999).

Dermiste bulunan bağ dokusu elemanları fibriller (kollajen ve elastin), globüler (albümin, globülin) ve amorf (glikoprotein ve glikozaminglikan) olmak üzere 3'e ayrılmaktadır. Aminoasitler, protein molekülünde bir eksen boyunca dizildiğinde fibrilli (lifli) proteinler, aminoasitler protein molekülünde yumak şeklinde dizildiğinde ise globüler (küresel) proteinler oluşmaktadır. Fibrilli proteinler suda çözünmezken, globüler proteinler genellikle çözünmektedir. Kollajen, her biri yaklaşık olarak 1000 aminoasitten oluşan 3 polipeptid zincirinin birleşmesiyle oluşmaktadır. Sert yapılı kollajen, deriye dayanıklılık, gerginlik, gerilmeye karşı mukavemet sağlamakta ve ana iskeleti oluşturmaktadır. Esnek yapılı elastin ise kollajen lifleri arasında ağ oluşturarak deriye yumuşaklık ve elastikiyet sağlamaktadır. Glikozaminoglikanlar (asit mukopolisakkarit) ise art arda tekrarlayan disakkarit üniteleri içeren düz karbohidrat zincirleridir; su tutarak, elastin ve kollajen liflerinin arasını doldurmaktadırlar (Lee 2017).

Keratin, dimer denilen 2 adet α -heliks yapısındaki alt ünitelerden meydana gelmektedir. Bu 2 alt ünite birbiri etrafında sarılarak sarımlı sarmal (coiled coil) olarak adlandırılan keratinin dördüncül yapısını meydana getirmektedir. Keratinini oluşturan polipeptid zincirinin yapısına katılan aminoasitlerin yaklaşık olarak % 25'i sistein iken, diğer aminoasitlerin çoğu hidrofobiktir. Bu hidrofobik aminoasitler, 2 alt ünitenin birbirine kenetlenmesini sağlamaktadır. Ayrıca 2 alt ünite de bulunan sistein aminoasitleri birbirine disülfid bağları ile bağlanmaktadır (Çolak ve ark. 2008). Keratin yapısını oldukça zayıf olan hidrojen bağlarına, elektrostatik etkileşimler olan güçlü iyonik bağlarına ve kimyasal etkilere karşı çok dirençli olan disülfid bağlarına borçludur (Marmer ve Dudley 2005).

Disülfid bağları, radikal grubunda tiyol (sülfidril, -SH) taşıyan iki sistein arasında kurulan ve bu sisteinlerin yapısındaki tiyol gruplarından hidrojen kaybedilmesiyle oluşan kovalent bağlardır. Bu bağlara aynı zamanda sistin bağları, sistin köprüleri, disülfid köprüleri, disülfür köprüleri, çapraz bağlar denilmektedir (Kvedar ve ark. 1991). Sistin, iki sistein aminoasitinin ya da kalıntısının birbirine disülfid bağıyla bağlanmış halidir. Sülfidril grupları arasında gerçekleşen disülfid bağları, yapının sağlamlığının artmasını

sağlamaktadır. Disülfid bağları keratine su, seyreltik asit ve baz ile erimemek, ekstrem asit ve baz ile şişmeme, mekanik etkilere karşı dayanıklılık sağlamaktadır. Keratinin kuarterner yapısının sabitlenmesini sağlayan güçlerden biri olan disülfid köprülerinin kırılması ile keratin parçalanmakta dolayısıyla kıllar giderilmektedir. Disülfid bağlarının oluşumu oksidasyon reaksiyonu iken, yıkılması indirgenme reaksiyonudur. Bu sebeple kıl gideriminde daha çok indirgen maddeler kullanılmaktadır. (Marshall ve ark. 1991). Kıllar, epidermis gibi keratinden oluşmakta ve dıştan içeriye sırasıyla kütikula, korteks ve öz olmak üzere 3 katmandan oluşmaktadır (Şekil 2.4B). Kütikula ve korteks keratinize hücrelerden oluşurken, özdeki hücrelerde tam bir keratinizasyon görülmemektedir.



Şekil 2.4. Deri kesiti (A) ve kılın yapısı (B) (Anonim 2020e, Anonim 2020f).

2.9.3. Deri işlenmesi

Derilerin sınıflandırılması ve kırılması; ham derilerin cins, ırk, kalite, yöre, cinsiyet ve ağırlık, kıl boyu, konservasyon şekli gibi niteliklerine göre sınıflandırılması ve kullanılmayacak parçaların kesilmesidir.

Konservasyon; ham derinin mikroorganizma faaliyetleri ile bozulmasını engellemek için uygulanan yöntemdir. Bu amaçla tuzlu suya yatırma, tuzlama ve kurutma yöntemleri kullanılarak derideki su miktarı azaltılmaktadır (Dikmelik 2013).

Islatma; işlenecek deriden kan, idrar, dışkı, yağ, toz, çamur, tuz vb. ajanların giderilmesi, derinin yumuşaması için gerçekleştirilmektedir. Ayrıca derideki eriyebilen proteinlerin bir kısmı ıslatmada tuzlu su etkisi ile kendiliğinden uzaklaşmaktadır. Günümüzde bu proteinlerin giderilmesi için ıslatmada nötral ve alkalen proteazlar kullanılmaktadır (Sanghi ve Singh 2012). Proteazlar bu aşamada epidermisin korun tabakasının parçalanmasını sağlamaktadır. Amilazlar ise hidrofil polisakkaritlerin giderilmesi için ıslatmada kullanılmaktadır. Hidrofil polisakkaritler, ıslatmada şişerek deri liflerin açılmasını zorlaştırmakta, açılmayan deri liflerinin arasında hapsolan globüler proteinler deriden uzaklaşmamakta ve ürün sertleşmektedir. Dolayısıyla amilazlar, derinin yumuşatılması için kullanılmaktadır (Souza ve Gutterres 2012). Islatmada yağların giderilmesini sağlayan lipazlar da kullanılabilir.

Kıl giderimi; deriden kılların ve epidermisin giderildiği işlemdir. Pratikte kireç ve sodyum sülfür (Na_2S , zırnık) kullanılmaktadır. Yüksek konsantrasyondaki kireç ve sodyum sülfür aşırı alkali bir ortam yaratarak, kılların hamurlaşmasına ve sonrasında kolaylıkla kökünden ayrılmasına sebep olmaktadır (Sanghi ve Singh 2012). Kıl giderimi işlemine 2.9.4’de ayrıntılarıyla yer verilmiştir.

Kireçlik (kireçleme); alkali etkisi ile derinin yapısını oluşturan kollajen proteininin özelliklerini değiştirerek, kollajenin lifli olan yapısının açılmasını yani derinin sıkı olarak dokunmuş kollajen liflerinin birbirinden ayrışmasının sağlanmasıdır (Choudhary ve ark. 2004). Bu işlemde kıl giderimine de devam edilmekte; baz etkisi ile yağlar sabunlaşarak kireç sabunlarına dönüşmekte yani deriden giderilmektedir. Kollajen fibrilleri arasındaki proteinlerin (globüler vb.) hidrolizi sağlanmakta; parçalanmış bu proteinler bir sonraki aşamada yıkanarak giderilmektedir. (Bienkiewicz 1983, Anonim 2017a). Kireçleme işleminde kireç, zırnık ve sodyum hidrosülfid kullanılmaktadır.

Kireç giderme; deri liflerine bağlanmış ve deri lifleri arasında kalmış kireç uzaklaştırılmaktadır. Çünkü kireç deriye sertlik vermekte; alkaliliğiyle samada direnç oluşturmaktadır. Bu işlemle pH’sı 12.0-13.0 seviyelerine yükselen derinin pH’sı 7.0-8.5 seviyelerine düşürülmektedir (Akyüz ve Bilek 2018). Kısacası pH samadaki enzimlerin çalışmasına uygun (nötrale yakın) değerlere düşürülmektedir. Bu işlemde asitler ve asitleri tamponlamak için tuzlar kullanılmaktadır (Essays 2018).

Sama; enzim kullanımı esastır. Samada enzimatik, kimyasal ve fiziksel olmak üzere 3 işlem gerçekleşmektedir. Enzimatik işlem, derideki kollajen haricindeki bütün proteinlerin (örn. deriyi sertleştiren globüler proteinler) proteazlarla uzaklaştırılmasıdır. Böylece sama sonunda derinin içi boşaltılmış, deri lifleri açılmıştır. Kimyasal işlem, kollajendeki hafif peptizleşmedir. Peptizleşme, kollajen liflerindeki polipeptid zincirleri arasındaki çapraz bağların lifin sağlamlığını etkilemeyecek kadar parçalanmasıdır. Çapraz bağların yıkılması ile açığa çıkan polar gruplar, tabaklama ajanlarının bağlanacağı odaklardır. Fiziksel işlem ise sert ve şişkin kollajen liflerinin samadan sonra yumuşak ve şişliği gitmiş olmasıdır (Wilson 1941). Samada hayvansal (domuz, dana pankreası), bitkisel (Papaya, *Carica papaya*), bakteriyel (*Bacillus* sp.) ve fungal (*Aspergillus* sp.) enzimler kullanılmaktadır. Samada pH değeri, nötr veya hafif alkali olmalıdır. Hayvansal sama preparatının optimal pH'sı 8.0-8.5; bakteriyel sama preparatının 6.0-7.2; fungal sama preparatının ise 3.5-5.0'dır. Hayvansal sama maddesinin optimal pH'sı hafif alkali olduğundan samada genelde pankreas kullanılır. Samanın en önemli bileşeni dana ve domuz pankreasından elde edilen ve optimum pH'sı 7.8-8.7 olan tripsindir. Sama preparatlarında tripsine ek olarak pankreas enzimlerinden optimal pH'sı 7.8-8.0 olan kimotripsin, optimum pH'sı 8.5 olan elastaz (tripsin ve kimotripsinin parçalayamadığı elastini parçalamaktadır) bulunmaktadır (Anonim 2012, Shotton ve Hartley 1973).

Yağ giderme; derilerideki ham yağların giderilmesidir. Bu yağların giderilmemesi derilerin görünümünde bozulmalara sebep olmaktadır. Lipazlar, bakteriyel, fungal ve pankreas kaynaklı olabilmektedir (Cengiz 2002). Pankreas kaynaklı lipazın optimum pH değeri 8.0 olduğundan samada rahatlıkla kullanılabilen ve bu işlemin samada yapılmasına olanak sağlamaktadır. Konvensiyonel yöntemde ise kerosen (gaz yağı), stoddard çözücüsü gibi toksik kimyasallar kullanılmaktadır (Thanikaivelan ve ark. 2004).

Piklaj (pikle, salamura); derinin tuz ve asit çözeltisinde pH'sı 3.0-3.5 olana kadar bekletilmesidir ve tabaklamaya hazırlıktır. Kireç kalıntıları piklede giderilmektedir. Çünkü deride kireç varken ve deri asidik olmadan tabaklamaya geçilirse tabaklama ajanı sadece derinin yüzeyine bağlanır ve deri içten bozulmaya başlar (Öncü 1968).

Tabaklama (sepileme); kollajen fibrilleri arasındaki bağlar güçlendirilerek, derinin yapısının fiksasyonudur. Tabaklamada kollajen fibrilleri arasında kimyasal bağlar

oluşturulmaktadır. Bu sayede deri, çürümeye dayanıklı olup, esnek yapısını korur. En önemli sepi ajanı bitkisel olarak tanen ve mineral olarak kromdur (Akbulut 2012).

Nötralizasyon; derinin alkaliyle pH'sı 5.5 olana kadar muamelesidir. Çünkü nötralize olmamış deri boya ve yağı almamaktadır (Anonim 2017a).

Boyama; tabaklama materyali üzerine çeşitli boyaların sabitlenmesidir (Anonim 2014).

Yağlama; lifli yapıya bağlanan ve lifli yapının birbiri üzerinde hareketini kolaylaştıran yağlarla derinin muamele edilmesidir. İşlem deriyi yumuşatmaktadır (Dikmelik 2013).

Kurutma; deriden su çekilerek, deri lifleri arasında bulunan boya ve yağın, suyla ilişkisinin kesilip liflere bağlanmasının sağlanmasıdır (Öncü 1968).

Finisaj; renk, kusursuzluk vb. kalite kriterlerinin artması için derinin kaplanmasıdır.

2.9.4. Deriden kıl giderimi

Deriden kılın giderilme mekanizması ve kullanılan kimyasallar; kıl çok yüksek oranda keratinden oluştuğundan keratinin parçalayarak kılın giderimini sağlamaktadırlar. Keratinin parçalanması ise disülfid bağlarının parçalanmasıyla gerçekleştirilmektedir. Disülfid bağları, bazik (kireç, kostik soda) ve indirgeyici (örn. sodyum sülfür) ajanlarla parçalanmaktadır. Kıl gidermede iki odaktaki disülfid bağları tahrip edilmektedir. İlk odak, epidermisle kılın birleştiği en zayıf noktanın yani kılın kökünü saran kıl folikülündeki epidermisin keratinindeki disülfid bağlarıdır. Bu epidermisin tahribiyle kıl kökü gevşemektedir. İkinci odak, doğrudan kıldaki keratinin yapısındaki disülfid bağlarıdır. Özellikle kıl kökündeki genç keratinize dokunun tahrip edilmesi ile kıllar gevşemektedir (Essays 2018).

Kıl gidermede çeşitli kimyasallar kullanılmaktadır. Bunlar;

Kalsiyum hidroksit (Ca(OH)_2 , sönmüş kireç); bazik olduğundan kıl keratinindeki disülfid bağlarını parçalamaktadır (Essays 2018).

Sodyum sülfür (Na_2S , zırnık); indirgeyici bir bileşik olduğundan keratindeki disülfür bağlarını koparmaktadır. Suda çözününce sodyum hidroksit (NaOH , kostik soda) ve sodyum hidrosülfid (NaSH) oluşturmaktadır. Sodyum hidroksit, pH'nın yükselmesine, pH

yükselmesi ise deride şişmeye sebep olmaktadır. Zırnığın suda çözünüp, hidrojen iyonları ile birleşmesiyle oluşan sülfidril (-SH) iyonu çok iyi kıl gidermektedir. Çünkü sülfidril iyonu disülfid bağının kırılması için sülfür kaynağıdır (Dikmelik 2013).

Sodyum hidrosülfid (NaSH, sodyum sülfidrat); indirgeyici olduğundan keratindeki disülfür bağlarını koparmaktadır (Ma ve ark. 2017). Az hidroksit iyonu açığa çıkardığından şişmeyi engellemekte; bazik ajan kostik sodayla kılları iyi gidermektedir.

Deriden kılın giderilme yöntemleri; banyo, badana ve enzimatik yöntem olmak üzere 3 şekilde giderilmektedir.

Banyo yöntemi; kılın doğrudan eritildiği bir yöntemdir. Bu yöntemde bazen kireç, sodyum sülfür (Na₂S), sodyum hidrosülfid bazen tek başına bazen de kombine edilerek hazırlanan bir karışım kullanılır. Kireç, epidermisin yapısının bozularak gevşemesini; sodyum sülfür, kılların eriyerek parçalanmasını; sodyum hidrosülfid ise kıl köklerinin parçalanmasını sağlamaktadır (Anonim 2017a). Hazırlanan karışım dolap (banyo) denilen kazanın içinde derilere uygulanmaktadır. Özellikle yünü değerli olmayan büyükbaş hayvanların derilerinde tercih edilmektedir (Dikmelik 2013).

Badana (boyama) yöntemi; kıl folikülündeki epidermal dokunun tahrip edildiği bir yöntemdir. En fazla tercih edilen bu yöntemde su, kireç ve sodyum sülfürden oluşan macun derinin et kısmına sürülmektedir. Deriye nüfuz eden bu macun, kılın folikülündeki epidermisi parçalamaktadır. Daha sonra kıllar çekilerek deriden uzaklaştırılmaktadır. Yünleri değerli küçükbaş hayvanların derilerinde; daha temiz ve yumuşak bir deri sağladığı için büyükbaş hayvanların derilerinde tercih edilmektedir (Dikmelik 2013).

Enzimatik yöntem; en zararsız ve en eski metoddur. Terletme (mezamet), otolitik ve doğrudan enzim olmak üzere 3'e ayrılmaktadır. Bunlar:

-Terletme yöntemi: Kıl gideriminde kullanılmış en eski metottur. Bu yöntemde deriler, karanlık ve nemli odalarda bırakılmaktadır. Çürükçül bakterilerin sentezlediği proteazlar, epidermis ve kılın keratinini parçalanmaktadır. Epidermis yapısında meydana gelen gevşeme ile kıllar çekildiğinde deriden ayrılmaktadır. Terletme odasında fazla tutulan derinin tahrip olması, az tutulan deriden kıllar çekilirken deliklerin oluşması, işlemin kontrol edilememesi gibi sebeplerden dolayı pratikte kullanılmamaktadır (Essays 2018).

-Otolitik yöntem: Hücrenin organellerinden biri olan lizozomlarda bulunan ve hücre canlı iken inaktif formda bulunan katepsin adlı proteolitik enzimin faaliyeti ile gerçekleşen kıl giderimidir. Lizozomal kıl gideriminde proteinler kadar glikozaminoglikanların da parçalanması, dolayısıyla derinin parçalanması yöntemin dezavantajıdır (Zhang 2019).

-Doğrudan enzim yöntemi: Kimyasal maddeler yerine alkalen koşullarda aktivite gösterebilen fungal ve bakteriyel proteazların kullanıldığı bu yöntemde kılların giderilmesi genellikle 12-16 saat (maksimum 24 saat) sürmekte ve süre sonunda ise mekanik yöntemler kullanılarak kıllar çekilmektedir. Diğer enzimatik yöntemlerin aksine burada enzimler kontrol edilebilmektedir. Çünkü aktivitesi, optimal pH ve sıcaklık aralığı bilinen enzimler kullanılmaktadır (Ward 1985). Alkalen proteazlar, kıl köklerinin şişmesini sağlamakta ve sonrasında kıl kökündeki proteinleri parçalayarak, kıl deriden kolaylıkla çıkarılmasını sağlamaktadır (Gupta ve ark. 2002). Kıl gideriminde özellikle alkalen proteazların kullanılmasının sebebi, enzimlerin yardımcı eleman olarak bazik bir kimyasal olan kireçle kullanılmasıdır. Bilinen alkalen proteazların büyük bir kısmı mikroorganizmalardan hatta özellikle de *Bacillus* cinsi suşlarından izole edilmiştir (Wang ve ark. 2006). Enzimatik kıl giderimi aslında proteolitik ve amilolitik enzimlerin etkisi ile gerçekleşmektedir. Fakat amilolitik enzimler sadece mukopolisakkaritlerin parçalanmasına yardımcı olduğundan, etkisi aslında azdır (Puvanakrishnan ve ark. 2012).

Enzimler deriye uygulanırken 3 yöntem kullanılmaktadır. Bunlar banyo (dipping), badana (painting), püskürtme (spraying) olarak adlandırılmaktadır (Puvanakrishnan ve ark. 2012). Banyo yönteminde istenilen pH değerinde enzim çözeltisinin bulunduğu kazanlara deriler daldırılmaktadır. Bu yöntemin dezavantajı enzim çözeltisinin seyrelmesidir. Bu durum uygulama süresinin uzamasına veya gereğinden fazla enzim kullanılmasına sebep olmaktadır. Derinin omurga ve boyun kısmında kıl giderimi daha uzun sürdüğünden, bu yöntemde bu bölgelerde problem çıkma olasılığı yüksektir. Badana yönteminde, enzim çözeltisi kaolin gibi inert bir malzemeyle karıştırılarak macun haline getirilir. Bu macun derinin et tarafına sürülmekte, daha sonra deriler macunlu yüzleri birbirine bakacak şekilde istiflenerek kılların gevşemesi beklenmektedir (Madhavi ve ark. 2011). En yeni teknik olan püskürtme (spraying) yönteminde ise enzim çözeltisinin derinin et tarafına basınçlı bir şekilde püskürtülmektedir. Enzim çözeltisi basınçla püskürtüldüğü için enzimin deriye girişkenliğinin artması, konsantre enzim çözeltilerinin

bile püskürtülebilir olması, kıl gideriminin yavaş olduğu bölgelere (boyun, omurga) daha basınçlı püskürtme yapılabilmesi gibi avantajlara sahiptir (Puvanakrishnan ve ark. 2012).

Enzimatik kıl gideriminde kullanılan ham enzim preparatındaki proteazların keratinaz aktivitesinin olması; kollejenaz aktivitesinden yoksun olması gerekmektedir. Buna ek olarak, ham enzim preparatının kondroitinaz, kitinaz, laminarinaz ve elastaz aktivitesine sahip olan enzimleri içermesi kıl gideriminde avantajdır (Khandelwal ve ark. 2015).

1975'den günümüze kadar pratikte enzim preparatları kireçli ve kireçsiz olmak üzere sülfürle birlikte kullanılmaktadır. Yani enzimler halen daha kıl gideriminde kimyasallara yardımcı eleman (kıl kökleri ve derinin temizliği) olarak kullanılmaktadır. Bu işlem için derinin yaş ağırlığı dikkate alınarak, badana yönteminde %1-2 enzim, %5 kireç, %0,5-2 zırnık, %10-20 su kullanılarak macun elde edilmektedir. Banyo yönteminde ise %2 enzim, %5-10 kireç, %2 zırnık, %100 su kullanılmaktadır (Puvanakrishnan ve ark. 2012).

2.9.5. Deri endüstrisi ve çevre

Endüstriyel olarak en kirletici alanlardan olan deri endüstrisinde üretimin büyük bölümünde toksik kimyasallar kullanılmakta ve sulu ortamda gerçekleşmektedir. Türkiye'nin de "yüksek derecede su sıkıntısı çeken ülkeler" arasında olduğu göz önünde bulundurulduğunda bu kadar fazla su kullanımının olması endişe vericidir (Anonim 2017b). Deri üretimindeki işlemler, tabaklama öncesi, tabaklama ve tabaklama sonrası olmak üzere 3 grupta toplanmaktadır. Toksik kimyasalların çoğu tabaklama öncesi işlemlerde kullanılmakta; enzimler de en fazla tabaklama öncesinde kullanılmaktadır (Dettmer ve ark. 2011). Geleneksel kıl giderimi, deri üretimi kaynaklı kirliliğinin ortalama % 80-90'ına sebep olduğun için üretimin en kirletici aşamasıdır (Alessandro ve ark. 2003).

Dünyada 9 000 tabakhanede deri üretiminin yapıldığı tahmin edilmektedir (Anonim 2019g). 1 ton ham deriden ortalama 0,15 ton işlenmiş deri elde edilmekte ve bunun için tabaklanma öncesi işlemlerde 0,25 ton katı atık, 50 ton sıvı atık oluşmaktadır. Yıllık 1,8 milyar m² işlenmiş deri piyasaya sürülmekte ve bu işlemde 2,4 milyon ton çamurlaşmış atık ve 250 milyon ton sıvı atık oluştuğu tahmin edilmektedir (Basheer ve Umesh 2018). Üretilen her m² deri başına 0,3 ABD doları atık işleme maliyeti bulunmaktadır (Arunachalam ve Saritha 2009).

Deri işlemede atıkları tuz, kireç, sülfürler, asitler, krom tuzları ve boyalardır. Bunlardan en tehlikelileri krom ve kıl giderimininde de kullanılan kireç, sülfür bileşikleridir.

-Sülfür bileşikleri, nötr ve asidik koşullarda hidrojen sülfür (H₂S) açığa çıkarmaktadır. Renksiz ve çok zehirli bir gaz olan hidrojen sülfürün tutuşması, patlaması kolaydır. Dolayısıyla sülfürlü atıklar, arıtım tesisi çalışanları (arıtımı yapılırken) ve kanalizasyon çalışanları (arıtımı yapılmadan kanalizasyona verilmiş ise) için tehlikedir. Ayrıca nötr ve asidik şartlardaki hidrojen sülfür, kanalizasyondaki nemde çözünmekte, daha sonra kanalizasyondaki bakterilerin oksidatif faaliyeti ile sülfürik asite dönüşmektedir. Sülfürik asit ise kanalizasyon duvarlarındaki alüminyum ve demiri aşındırarak parçalanmasına sebep olmaktadır (Anonim 2017a).

-Kireç ise sodyum sülfürün çamurlaşmasına sebep olarak tabakanelerde zaten yüksek olan katı atık miktarının daha da artmasına sebep olmaktadır. Kirecin yarattığı diğer olumsuzluk ise yüksek alkaliliktir. Kireç kullanılmadığında atıkların pH'sı nötrale yakın olacağından, atıkların arıtımlarının daha kolay ve ucuzdur (Dettmer ve ark. 2012a,b).

Enzimatik kıl gideriminin birçok avantajı bulunmaktadır (Sanghi ve Singh 2012). Bunlar;

-Çevre, insan ve çalışan sağlığı açısından tehlike oluşturmamaktadır.

-Sülfür, kireç ve kireç giderme (asit ve tuz) kimyasallarının kullanımını azaltmaktadır.

-Kullanılan su miktarını azaltmaktadır.

-Atık sulardaki kirliliğin karakteristikleri BOD ve COD değerlerini azaltmaktadır. Geleneksel kıl gideriminin tabakhane atıklarındaki Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı (BOD) değerinin %84'ünden, Kimyasal Oksijen İhtiyacı (COD) değerinin %75'inden, oluşan toksisitenin % 100'ünden sorumludur (Puvanakrishnan ve ark. 2012). Enzimatik kıl giderimi ise bu değerleri düşürmektedir. Örneğin, *B. subtilis* proteazının kullanıldığı kıl gideriminde geleneksel yönteme göre BOD %63, COD ise %79 azalmıştır (Senthilvelan ve ark. 2012).

-Proseste oluşan ve deşarj edilmezse ötrofikasyona yol açan tuz miktarını azaltmaktadır.

-Derinin kalite kriterlerinde artış sağlamaktadır. Örneğin, enzimatik olarak kılları giderilmiş deride kimyasal yöntemle kıyasla deri daha temiz, pelt rengi daha beyaz, pürüzsüz, yumuşak ve ipeksi olmaktadır. Çünkü kimyasal yöntem deriyi sertleştirmekte ve rengini ise koyu veya kırık beyaz yapmaktadır. Bu durumun enzimatik yöntemde kılların kırılmak yerine kökten çıktığı yani deride kıl kökü kalıntısı kalmadığı; geleneksel yöntemde ise kıl kökü kalıntısı kaldığı için meydana geldiği bildirilmiştir (Vanitha ve ark. 2014). Buna ek olarak derinin esneklik ve mukavemeti artmaktadır.

-Lekelenme olasılığını düşürmektedir. Geleneksel yöntemde deride sülfür lekeleri ve kireç lekeleri oluşabilmektedir.

-Derinin yüzey alanında daha iyi büyüme ve genişleme sağlamaktadır.

-Deriyi daha porlu bir yapıya kavuşturmaktadır. Bu durum derinin boya alması kolaylaştırmaktadır (Hameed ve ark. 1999).

-Samada da aynı enzimler kullanılabilir. Bu sayede üretim süresi %25 kısaltmakta dolayısıyla üretim maliyeti de azaltmaktadır (Dettmer ve ark. 2012a,b).

-Kireç ve sülfür gibi atık suda zehirli çamur oluşmasına sebep olan kimyasalların azaltılmasını sağlamaktadır. Bu sayede atık arıtımı daha kolay ve ucuz olmaktadır.

-Sülfürlü bileşiklerin çalışanlara verdiği zararları ortadan kaldırmaktadır. Örneğin, dericilik çalışanlarında akciğer, yutak, gırtlak, mesane, böbrek, karaciğer, burun, dudak, lenfoma kanserinin daha fazla görüldüğü ve kıl gideriminde kullanılan sodyum sülfür gibi toksik kimyasallar sebebiyle birçok ölüm vakası rapor edilmiştir (Macedo ve ark. 2005, Nadeem ve ark. 2010).

-Sülfür kaynaklı zehirli gazların çevreye, atık arıtım tesisine ve kanalizasyona verdiği zararları ortadan kaldırmaktadır.

-Kılların geri kazanımını sağlamaktadır. Sülfür kullanımı azot bakımından zengin bir kaynak olan kılların hamurlaşmasına sebep olmaktadır. Enzimatik kıl giderimi bu hamurlaşmayı engellediği için, kaliteli olan yün ve kılların iyi fiyattan satılabilmesine imkan sağlamaktadır. Bu şekilde geri kazanılmış olan kıllar sentetik fiber, biyogaz, yangın söndürücülerde köpürme ajanı, itfaiye personeli giysileri, uçaklarda iç döşeme vb. üretiminde; kıl parçaları ise gübre, yem, aminoasit üretiminde kullanılmaktadır.

Son 60 yılda enzimlerin başarı ile kullanıldığını belirten birçok çalışma yapılmıştır. Fakat dericilikte özellikle de kıl gideriminde endüstriyel açıdan kabul görebilecek bir seviyeye gelinememiştir. Arunachalam ve Saritha (2009), bu durumu enzimatik kıl gideriminin sıkı kontrol gerektirmesi ve enzim maliyetinin teşvik edici olmamasına bağlamaktadır.

2.9.6. Kıl gideriminde bakteriyel proteazlar

Kıl gideriminde kullanılan proteazların çok büyük bir bölümü *Bacillus* sp. ve *Streptomyces* sp. kaynaklıdır (Hosseini ve ark. 2016). Birçok araştırmacı çeşitli bakteriyel suşlardan (örn. *Bacillus subtilis* DM-04, *Bacillus subtilis* MTCC 5333, *Bacillus licheniformis* MTCC 5271, *Bacillus pumilus*, *Alcaligenes* sp., *Lactobacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 5270) izole edilen proteazların termostabilite, yüksek aktivite, çözücülere karşı stabilite gibi özellikleri taşıdığı ve tek başına kıl giderimini sağladığından tabakhanelerde kullanım potansiyelinin yüksek olduğunu rapor etmiştir (Rai ve Mukherjee 2010). Kıl gideriminde önemli olan bir diğer bakteriyel cins ise *Streptomyces* cinsidir. Kıl gideriminde ise Thermoase® (*Bacillus stearothermophilus*, optimum pH: 7.0-8.5) kullanılmaktadır (Schaechter 2009, Rampelotto 2016). Bunun haricinde kıl gideriminde *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus vallismortis*, *Conidiobolus coronatus*, *Lactobacillus* sp., *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces moderatus* kaynaklı proteazlar kullanılmaktadır (Kamini ve ark. 1999, Choudhary ve ark. 2004, Houde ve ark. 2004, Mehta ve ark. 2017, Basheer ve Umesh 2018).

2.9.7. Kıl gideriminde fungal proteazlar

Kıl gideriminde özellikle *Aspergillus* cinsi kaynaklı proteazlar dikkat çekmektedir (Shafique ve ark. 2019). Çünkü kıl gideriminde genellikle alkalen proteazlar kullanılmaktadır. Samada da alkalen proteazların kullanılabilmesi sebebi ile iki işlemin aynı anda yapılabilmesi sağladığı için deri endüstrisi uygulamalarında fungal kaynaklı enzimlerde daha çok *Aspergillus* cinsi tercih edilmektedir. Literatürde kireç ve sülfür kullanılmadan kıl giderimini başarılı şekilde gerçekleştirildiği *A. effusus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. tamari*, *A. terreus*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. viridinutans*,

A. wentii, *Penicillium griseofulvum*, *Rhizopus oryzae* türlerinin proteazlarının kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Souza ve ark. 2015, Cadirci ve ark. 2015, Yadav ve ark. 2019). Kıl gideriminde kullanılabileceği kabul görmüş ve en bilinen fungal proteaz enzimi *Aspergillus flavus* kaynaklı Clarizyme® adı ile patentlenmiş alkalin proteazdır. Hatta bu enziminin samanda da kullanılabileceği belirlenmiş ve bu sayede aynı anda kıl giderimi ve samanın yapılabileceğinin de mümkün olduğu bildirilmiştir (Anonim 2015c).

2.9.8. Kıl gideriminde bitkisel ve hayvansal proteazlar

Hayvan ve bitki kaynaklı proteazlar kullanılarak derilerdeki kılların giderilmesinin sağlandığını ifade eden birçok çalışma mevcuttur. Ham pankreatik elastaz ile dana derisinden kılların giderildiğini rapor edilmiştir (Burton ve Stadtman 1953). Ananas (*Ananas comosus*) meyvesinden izole edilen bromelain kullanılarak derideki kılların giderildiği rapor edilmiştir (Puvanakrishnan ve ark. 2012). Proteazın yardımcı eleman olarak kullanıldığı bir kıl giderimi çalışmasında ise *Adenopus breviflorus* meyvesinden izole edilen proteaz kullanılarak derideki kılların 6 saatte giderildiği bildirilmiştir. Daha sonra aynı meyveden izole edilen nötral proteazla kireç ve sülfür tamamen elimine edilerek kıl giderimi ve samanın tamamlanabileceği rapor edilmiştir (Rose ve ark. 2007).

2.10. *Bacillus* Cinsinin Genel Özellikleri

Bir cins ismi olarak *Bacillus* ilk kez Ferdinand Cohn (1872) tarafından kullanılmıştır. Christian Gottfried Ehrenberg (1835) tarafından *Vibrio subtilis* olarak isimlendirilmiş bakterinin ismi 1872 yılından itibaren *Bacillus subtilis* olarak değişmiştir. 16S ribozomal RNA dizilerinin karşılaştırılmasına dayalı sınıflandırmada *Bacillus* cinsi üyeleri bakteri (eubakteria) domainine dahil edilmiştir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. *Bacillus* cinsinin taksonomik konumu (Dagmar 2004).

Domain	Bacteria (Eubacteria = Gerçek Bakteriler)
Şube	Firmicutes
Sınıf	Bacilli
Takım	Bacillales
Aile	Bacillaceae
Cins	<i>Bacillus</i>

Bacillus, gerçek bakteriler domainindeki en eski ve en fazla türe sahip cinstir. Firmicutes şubesinde bulunduğu için bütün türleri Gr(+) olarak boyanmaktadır. Çubuk (çomak) şeklinde olan bu cinsin üyeleri bazen tek başlarına bazen de çiftler ya da gruplar halinde gelişmektedir (Mounier ve ark. 2017). Genetik açıdan bilinen *Bacillus* cinsi türlerinin guanin ve sitozin bazlarının %mol oranı 32-69 arasında değişmektedir. Genomlarının büyüklüğü ise 3.35-5.5 Mb aralığındadır (Contesini ve ark. 2018).

Bacillus cinsi türlerin hücre boyutları genellikle 3-5 µm × 1 µm aralığındadır. *Bacillus* cinsinin genelinde R tipi denilen kenarları pürtüklü, yüzeyi pürüzlü ve mat görünümde olan koyu beyaz renkli koloniler görülmektedir (Lu ve ark. 2018). Çoğu mezofildir yani gelişimleri için genellikle 35-37°C sıcaklığı tercih etmektedir. Gelişimleri için genellikle en uygun pH değeri nötral değerlerdir. Aerobik veya fakültatif anaerobik solunum yapan türlere sahiptir (Claus ve Berkeley 1986). Üyeleri katalaz (+) olan bu cinsin bazı türleri (örn. *B. subtilis*) hareketli peritrik kamçısı sayesinde hareket edebilirken, bazı türleri (örn. *B. anthracis*) hareketsizdir (Guttenplan ve ark. 2013).

Toprak, deniz ve göl sedimenti, tuz bataklığı, termal su, kanalizasyon, dışkı gibi neredeyse tüm ortamlarda bulunmaktadır. Serbest yaşayan veya patojen olan türleri içermektedir. Genellikle nemi, oksijeni ve organik madde içeriği iyi toprakların ilk 10-15 cm'lik kısımda bulunmaktadır. Toprağın şartlarına göre değişmekle birlikte genellikle 1 g toprakta yaklaşık olarak 10⁶ -10⁹ tane bakteri bulunmaktadır (Yılmaz 2003).

Bacillus cinsinin karakteristik özelliklerinden birisi oldukça dayanıklı yapıya sahip endosporları üretmeleridir. Bu endosporlar elipsoit, oval, yuvarlak, silindirik, böbrek veya muz şeklinde olup, hücre içerisinde sentral, subterminal veya terminal olarak yerleşmektedir. Endospor yapısının bazen vejetatif hücreden geniş olabildiği de görülmektedir (Silva ve ark. 2013). *Bacillus* cinsi, endospor yapısını oluşturmaları sayesinde geniş bir çevreye yayılmaktadır. Genellikle prototrof (örn. *B. subtilis*) oldukları halde, oksotrof (*B. polymyxa*) türleri de vardır. Çoğu saprofit olarak beslenen bu mikroorganizmaların yağ ve protein gibi besinleri parçalama yeteneği çok gelişmiştir. *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. pumilus* türleri hariç neredeyse tamamı insan ve hayvanlar için zararsızdır (Borsa ve ark. 2016).

Çok sayıda endüstriyel enzimi üretmelerine ek olarak antibiyotik de üretmeleri *Bacillus* cinsinin önemli olmasının bir diğer sebebidir. Örneğin, *B. licheniformis* (basitrasin) ve *B.*

subtilis (basitrasin, basilisin, subtilin), *B. polymyxa* (polimiksin) ve *B. brevis* (gramisidin, tirosidin) tarafından üretilen antibiyotikler ilaç olarak kullanılmaktadır (Yang ve Yousef 2018). Ayrıca *B. subtilis* tarafından üretilen itürin bitki patojeni funguslar ile mücadelede kullanılmaktadır (Kim ve ark. 2010). *B. cereus* tarafından üretilen zwittermisin, bitkilerde hastalık oluşturan bazı bakterilere karşı kullanılmaktadır (Shafi ve ark. 2017).

Bazı *Bacillus* türleri logaritmik artış fazında polihidroksi alkanoat sentezlemektedir, bu biyolojik olarak bozunabilir plastik üretiminde kullanılmaktadır (Zaki 2018).

Bacillus cinsinin endüstride bazı alanlarda diğer mikroorganizmalara göre daha fazla kullanılmasının en önemli nedeni güvenilir statüsünde olmalarıdır. Örneğin, *B. subtilis* ve *B. licheniformis* suşlarının güvenilir (GRAS) statüsünde olduğunu USFDA tarafından onaylamıştır. Buna ek olarak *Bacillus* cinsi hızlı üremeleri sebebi ile kısa fermantasyon döngüsüne sahip olmaları, çok yüksek miktarda proteini hücre dışına salgılama kapasitesine sahip olmaları, bu sayede zaman ve maliyetten tasarruf sağlamaları onların daha fazla kullanılmasına yol açmaktadır (Sewalt ve ark. 2016).

2.11. *Bacillus* Cinsi Proteazının Genel Özellikleri

Proteaz enzimlerinin yaklaşık olarak % 70'i *Bacillus* cinsi kullanılarak elde edilmektedir (Johnevelsy ve Naik 2001). *Bacillus* cinsine ait çoğu bakteri, proteaz enzimini logaritmik artış fazı sonrasında yani durağan fazda sentezlemektedir (Ahmetoglu ve ark. 2015).

Bacillus cinsi ekstraselüler proteazların çoğunun serin, sistein ve metallo olduğu rapor edilmiştir. Bu proteazların optimal sıcaklık değerinin 37-60°C; optimal pH değerinin ise genellikle pH 6.0-10.0 arasında olduğu bildirilmiştir (Çizelge 2.5). Baskın olarak alkalen proteaz üreten bu cins nötral proteazlar da üretmektedir (Contesini ve ark. 2018).

Bacillus proteazları 8-90 kDa moleküler ağırlığa sahiptir (Kato ve ark. 1992, Devanadera ve ark. 2016). Fakat bunların çoğunluğu 50 kDa veya daha düşük moleküler ağırlığa sahiptir (Vijayaraghavan ve ark. 2012). *Bacillus* sp. alkalen proteazları genellikle 15-38 kDa moleküler ağırlığa sahiptir (Adinarayana ve ark. 2003, Ali ve ark. 2016). Fakat bazı *Bacillus* sp. alkalen proteazının 8 kDa olduğu saptanmıştır (Devanadera ve ark. 2016).

Bacillus subtilis proteazları genellikle 18-35 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. Fakat *B. subtilis* (natto) proteazının moleküler ağırlığı 90 kDa, *B. subtilis* USTCMS 1011 alkalen proteazının moleküler ağırlığı 8 kDa'dur (Kato ve ark. 1992, Devanadera ve ark. 2016).

Bacillus subtilis metalloproteazları ise 20-30 kDa moleküler ağırlığa sahiptir (Park 2004).

Çizelge 2.5. Bazı *Bacillus* suşlarının proteazlarının karakteristik özellikleri.

Organizma	Optimal pH	Optimal Sıcaklık (°C)	Moleküler Ağırlık (kDa)	Kaynak
<i>Bacillus</i> sp. SM2014	10	60	71	Jain ve ark. 2012
<i>Bacillus</i> sp. HD292	9.5	70	30	Putatunda ve ark. 2018
<i>Bacillus</i> sp. SB12	9	37	41	Briki ve ark. 2016
<i>Bacillus</i> sp. KG5	7	45	48	Ahmetoglu ve ark. 2015
<i>B. subtilis</i> BUU1	11	50	32	Uttatree ve Charoenpanich 2016
<i>B. subtilis</i> USTCMS 1011	11	40	8	Devanadera ve ark. 2016
<i>B. subtilis</i> DM-04	10.5	45	33,1	Rai ve Mukherjee 2009
<i>B. subtilis</i> BLK-1.5	10	50	38	Ali ve ark. 2016
<i>B. subtilis</i> PE-11	10	60	15	Adinarayana ve ark. 2003
<i>B. subtilis</i> (ATCC6633)	10	50	36	Chatterjee ve ark. 2015
<i>B. subtilis</i> W	10	50	38,5	Vijayaraghavan ve ark. 2012
<i>B. subtilis</i> DM-04	10	37	33,1	Rai ve Mukherjee 2009
<i>B. subtilis</i> K-1	10	50	42	Singh ve ark. 2017
<i>B. subtilis</i> AKAL7	9	40	40	Hakim ve ark. 2018
<i>B. subtilis</i> FBL-1	9	45	37,6	Si ve ark. 2018
<i>B. subtilis</i> VSG-4	9	50	24	Giri ve ark. 2011
<i>B. subtilis</i> GACAS8	9	50	41	Sathishkumar ve ark. 2015
<i>B. subtilis</i> DR8806	8	45	37	Farhadian ve ark. 2015
<i>B. subtilis</i>	8	57	15	Hussain ve ark. 2017
<i>B. subtilis</i> USTCMS 1011	8	30	65,4	Devanadera ve ark. 2016
<i>B. subtilis</i> M-11	8	50	32	Sahin ve ark. 2015
<i>B. subtilis</i> (ATCC6633)	7	50	20	Chatterjee ve ark. 2015
<i>B. subtilis</i> KT004404	6	55	28,2	Rehman ve ark. 2017
<i>B. alkalitelluris</i> TWI3	10	60	42,6	Anandharaj ve ark. 2016
<i>B. alveayuensis</i> CAS 5	9	50	33	Annamalai ve ark. 2014
<i>B. amyloliquefaciens</i>	7	50	36,8	Wang ve ark. 2013
<i>B. cereus</i> AT	8	50	46	Vijayaraghavan ve ark. 2014
<i>B. cereus</i> VITSN04	8	30	32	Sundararajan ve ark. 2011
<i>B. koreensis</i> BK-P21A	9	60	48	Anbu 2013
<i>B. megaterium</i> RRM2	10	60	27	Rajkumar ve ark. 2011

Bacillus proteazları gıda, ilaç, deterjan ve deri endüstrilerinde, atık arıtımı, oligopeptit sentezi gibi alanlarda kullanılmaktadır (Briki ve ark. 2016). *Bacillus* cinsi üyeleri endüstride en fazla talep gören proteazlar olan nötral ve alkalin proteazları üretebilmektedir (Contesini ve ark. 2018). Ürettikleri proteazların aktivitesinin, sıcaklık ve pH değerlerine olan tolerans ve stabilitesinin yüksek olması da yine endüstriyel açıdan tercih edilmelerini sağlamaktadır (Briki ve ark. 2016). Buna ek olarak bazı türleri yüksek kapasitede protein sekresyonu yapabilmektedir. Örneğin besiyerine litrede 20 gramdan fazla protein sekresyonu yaptığı rapor edilmiş *Bacillus* türleri bulunmaktadır (Harwood 2008). Kısacası aktivitesi yüksek, pH ve sıcaklık gibi çeşitli fiziksel etkenlere karşı toleransı ve stabilitesi yüksek proteaz enzimi üretmeleri *Bacillus* cinsinin proteaz üreticisi olarak tercih edilmesine neden olmaktadır (Thangam ve Rajkumar 2000).

Bacillus subtilis ise hızlı üremesi, farklı özellikte birçok ekstraselüler proteaz üretmesi ve GRAS mikroorganizmalar grubunda olmasıyla proteaz üretimi için en fazla tercih edilen kaynaklardandır. Ayrıca iyi standardize olmuş biyokimyasal protokollerin varlığı proteaz üretiminde daha fazla kullanılmasına yol açmaktadır (Farhadian ve ark. 2015).

Bacillus kaynaklı bazı ticari proteaz enzimlerine Çizelge 2.6’da yer verilmiştir.

Çizelge 2.6. *Bacillus* kaynaklı bazı ticari proteaz enzimleri (Schaechter 2009, Lassoued ve ark. 2015, Minh 2015, Anonim 2016, Rampelotto 2016, Kalia ve Saini 2017).

Organizma	Ticari Ürün
<i>Bacillus</i> sp.	BakeZyme [®] B500BG, Biotouch [®] ROC, Brewers Compass [®] , Durazym [®] , Enzeco [®] High Alkalen, Fermgen [®] , Nue [®] , NovoBate [®] WB, Novozyme [®] 539HPF, Ovozyme [®] , Protamex [®] , Properase [®] , Proleather [®] , Savinase [®] , Thermoase [®] , Maxacal [®] , Maxatase [®] , Maxapem [®] , Primatan [®] , Protosol [®] , Wuxi [®]
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Neutrase [®] , FNA [®] , Protin [®] SD-NY10
<i>B. alcalophilus</i>	Porperase [®] , Opticlean [®]
<i>B. clausii</i>	Everlase [®] , Kannase [®]
<i>B. halodurans</i>	Esperase [®]
<i>B. lentus</i>	BLAP [®] S, BLAP [®] X, Purafect [®] , PurafectOxP [®] , FN4 [®]

Çizelge 2.6. *Bacillus* kaynaklı bazı ticari proteaz enzimleri (Schaechter 2009, Lassoued ve ark. 2015, Minh 2015, Anonim 2016, Rampelotto 2016, Kalia ve Saini 2017) (devam).

Organizma	Ticari Ürün
<i>B. licheniformis</i>	Alcalase [®] , Biofeed Pro [®] , Enzeco [®] Alkalen, Enzeco [®] Nötral, Godo-Bap [®] , Novozyme [®] 243, Proteinase [®] , Protex [®] 6L, Protin [®] SD-AY10F, Ronozyme [®] , ProAct [®] , Versazyme [®]
<i>B. polymyxa</i>	Dispase I [®] , Dispase II [®]
<i>B. stearothermophilus</i>	Protease S [®]
<i>B. subtilis</i>	Bioprase [®] , Bioprase [®] SP-10, Bioprase [®] conc., Corolase [®] 7089, Enzeco [®] Nötral, Protease N [®] , Protease 899 [®] , Optimase [®] , Protex [®] 30L, Multifect [®] PR 30L

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada Bursa Uludağ Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda bulunan Türkiye'nin farklı illerinden toplanmış toprak örneklerinden daha önceden izole edilmiş ve en iyi proteaz enzimi aktivitesine sahip yeni izolat *Bacillus subtilis* E6-5 suşu kullanılmıştır (Demirkan ve ark. 2020).

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakterinin korunması ve geliştirilmesinde kullanılan besi ortamları

Çalışmada kullanılan *B. subtilis* E6-5 suşunun saklanması (kültür saklama ortamı), geliştirilmesi (ön inkübasyon ortamı) için Çizelge 3.1'de verilen içerikleri farklı olan besi ortamları kullanılmıştır. Kültür saklama ortamı ve bakteri geliştirme ortamının hazırlanmasında kullanılan maddeler miktarına uygun olarak hazırlanmış, besiyelerinin pH'sı 0,1 M HCl ve 0,1 M NaOH kullanılarak pH 7.0'ye ayarlanmış ve sonrasında 121 °C'de 1,5 atm basınç altında 15 dk. otoklavlanarak sterilizasyonu sağlanmıştır. Uzun süreli depolama için *B. subtilis* E6-5 suşu, %80'lik steril gliserol içeren eppendorf içerisinde -20 °C'de muhafaza edilmiş ve stoklar dört ayda bir yenilenmiştir.

3.2.2. Proteaz üretim ortamının belirlenmesi ve bakteri inkübasyon koşulları

Proteaz potent *B. subtilis* E6-5'nin enzim üretim kapasitesinin belirlenmesi amacıyla 3 farklı içerikli besi yeri kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Kültür saklama besi yerindeki stok kültürden steril öze ile alınmış olan bakteri kültürü ve içerisinde 30 mL bakteri geliştirme ortamı (Çizelge 3.1) bulunan 100 mL'lik erlene ekim yapılmış ve 37 °C'de, 150 rpm çalkalama hızında 18 saat inkübe edilmiştir. 18 saatlik bakteri kültürünün OD₆₀₀ (600 nm dalga boyundaki absorbans) değeri spektrofotometrik (Beckman Coulter DU 700) olarak ölçülmüş ve steril % 0,9'luk NaCl çözeltisi kullanılarak 0,3 olarak ayarlanmıştır. Spektrofotometrik ölçümlerde kör olarak % 0,9'luk NaCl çözeltisi kullanılmıştır. 600 nm dalga boyundaki absorbans değerinin 0,3 olması *B. subtilis* türü için $0,3-1,5 \times 10^7$ hücre/mL olarak kabul edilmektedir (Arrieta ve ark. 2006). 600 nm dalga boyundaki

absorbans değeri 0,3 olan kültürden steril koşullar altında içerisinde 150 mL proteaz üretim besi ortamları (Çizelge 3.1) bulunan 500 mL'lik erlenlere % 1 oranında aşılınmış ve 37°C'de 150 rpm'de 72 saat inkübe edilmiştir. Üreme ve enzim aktivite tayinleri 16., 24., 40., 48., 64. ve 72. saatlerde yapılmış ve proteaz üretiminin maksimum gerçekleştiği besi yeri, bakterinin üreme grafiği ve maksimum enzim üretim zamanı belirlenmiştir.

Proteaz üretim ortamları hazırlanırken kullanılan maddeler miktarına uygun olarak tartılmış ve pH'ları 0,1 M HCl ve 0,1 M NaOH kullanılarak ayarlanmış, ardından 121 °C'de 1,5 atm basınç altında 15 dk. otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Otoklav sırasında yüksek sıcaklıkla aminoasit ve şekerler arasında Maillard reaksiyonu gerçekleşebilmektedir. Bu reaksiyonla oluşan karamelizasyonun engellenmesi için glikoz içeren besi yerine glikoz, otoklav sonrasında ve besi yeri soğuduktan sonra por çapı 0,45 µm olan membran filtre kullanılarak eklenmiştir. Skim milk içeren besi yerinde ise skim milk, diğer ortam bileşenlerinden ayrı otoklavlanmış ve otoklav sonrasında 50 °C'ye kadar soğumuş olan skim milk ve diğer bileşenler steril koşullar altında birleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. *Bacillus subtilis* E6-5 suşunun korunması, geliştirilmesi ve proteaz üretiminde kullanılan besi ortamları.

İçerik (g/L)	Kültür Saklama Ortamı	Bakteri Geliştirme Ortamı	Proteaz Üretim Ortamı 1 (Qadar ve ark. 2009)	Proteaz Üretim Ortamı 2 (Sevinc ve Demirkan 2011)	Proteaz Üretim Ortamı 3 (Gököz 2016)
Nutrient Broth	13	13	-	-	-
Glikoz	-	-	1	-	-
Fruktoz	-	-	-	1	-
Gliserol	-	-	-	-	1
Pepton	-	-	10	-	-
Maya Özüdü	-	-	0,2	-	-
Skim Milk	-	-	-	10,2	-
Tripton	-	-	-	-	10,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	-	0,1	0,1	0,1
CaCl ₂ .2H ₂ O	-	-	0,1	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	-	-	0,5	0,5	0,5
NaCl	8	-	-	-	-
Agar	20	-	-	-	-
pH	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0

3.2.3. Bakteri üremesinin ölçülmesi

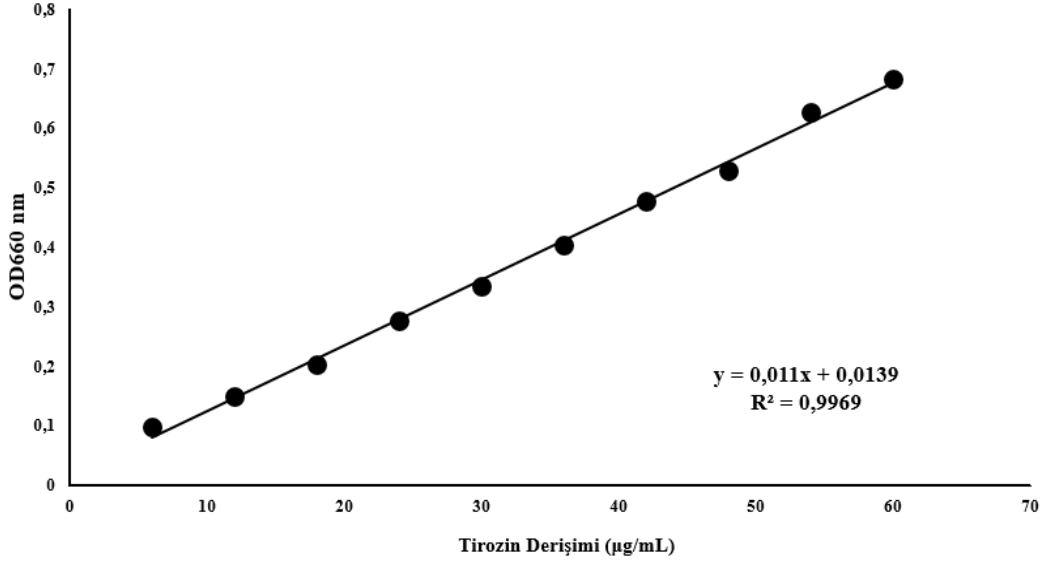
Bakteri üremesinin belirlenmesi amacıyla besi yerinin bulanıklığı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. *B. subtilis* E6-5 suşunun Çizelge 3.1’de verilen besi ortamlarında 3.2.2’de belirtilen şekilde inkübasyona bırakılmasının ardından 16., 24., 40., 48., 64. ve 72. saatlerde besi ortamlarından örnek alınmıştır. Alınan örneklerin 600 nm dalga boyundaki absorbans değeri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ölçümlerde kör olarak içerisinde herhangi bir hücre bulunmayan yani aşılammamış ve steril besi ortamları kullanılmıştır. 600 nm'deki absorbans değerlerinin okunmasıyla bakterinin üreme miktarı belirlenmiştir (Sarıkaya 1995). Elde edilen OD değerlerinin zamana karşı değişimi grafiklendirilerek bakterinin besi yerindeki üreme (gelişme) eğrisi elde edilmiştir.

3.2.4. Tirozin kalibrasyon (standart) eğrisi ve hazırlanması

Standart eğri, derişimi bilinen tirozin çözeltisi kullanılarak, örneklerde proteaz enzimi etkisi ile açığa çıkan tirozin miktarının hesaplanabilmesi için oluşturulmuştur. Bu amaçla 0-60 µg/mL tirozin içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Yönteme göre 2 U/mL enzim aktivitesi ile 1 µg/mL tirozin açığa çıkarılmaktadır (Keay ve Wildi 1970).

Yöntemde 0,2 M HCl, 0,4 M Na₂CO₃, 1/3 oranında seyreltilmiş Folin-Fenol reaktifi ve substrat olarak % 0,006’lık (w/v) tirozin çözeltisi kullanılmıştır. Tirozin çözeltisinin hazırlanmasında çözücü olarak 0,2 M HCl kullanılmıştır. Öncelikle bütün deney tüplerine konulacak olan % 0,006 (w/v) tirozin çözeltisi ve 0,2 M HCl çözeltisi miktarları hesaplanmıştır. Ardından deney tüplerine hesaplanan miktarlarda olacak şekilde % 0,006 (w/v) tirozin çözeltisi ve 0,2 M HCl çözeltisi eklenerek tirozin derişimi 0-60 µg/mL olan çözeltiler elde edilmiştir. Daha sonra hızlı bir biçimde ilk deney tüpüne 5 mL 0,4 M Na₂CO₃ çözeltisinden ardından 1 mL 1/3 oranında seyreltilmiş folin-fenol reaktifi çözeltisi eklenmiş ve sonraki deney tüplerinde de aynı işlem tekrarlanmıştır. Ardından bütün deney tüpleri vortekslenmiş ve 20 dk. karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Süre sonunda spektrofotometrik (Beckman Coulter DU 700) yöntem kullanılarak örneklerin 660 nm dalga boyundaki absorbans değeri, köre karşı okunmuştur.

Tirozin derişimine karşı, 660 nm'deki absorbans değerleri kullanılarak çizilen grafikte lineer regresyon metodu kullanılmış, standart eğri grafiği doğrusunun denklemi ve regresyon katsayısı hesaplanmıştır. Buna göre doğrunun denklemi $y = 0,011x + 0,0139$ iken regresyon katsayısı $R^2 = 0,9969$ 'dur (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Tirozin kalibrasyon (standart) grafiği ve denklemi.

3.2.5. Proteaz aktivitesinin ölçülmesi

B. subtilis E6-5 suşunun proteaz enzimi aktivitesi 1938 yılında Anson tarafından öne sürülmüş olan metodun Keay ve Wildi (1970) tarafında modifiye edilmesi ile oluşturulmuş olan metod ile hesaplanmıştır. Proteaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi amacıyla öncelikle çözeltiler hazırlanmıştır.

Substrat çözeltisi için 2 g kazein 20 mL 0,1 M NaOH çözeltisi içerisinde sürekli karıştırılarak kaynaya kadar ısıtılmış, ardından karışıma 80 mL 0,05M sodyum-fosfat tampon çözeltisi eklenmiştir. pH değerinin 7.0 olarak ayarlanmasında 1/3 oranında seyreltilmiş fosforik asit kullanılmıştır. Substrat çözeltisi taze olarak hazırlanmıştır.

0,1 M sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi için 250 mL distile su içerisinde 1 g NaOH çözülmüştür.

1/3 oranında seyreltilmiş fosforik asit (H₃PO₄) çözeltisi için 2 birim distile su üzerine 1 birim fosforik asit eklenmiştir.

0,4 M trikloroasetik asit (TCA) çözeltisinin hazırlanması için 6,53 g TCA tartılmış ve 100 mL distile su içerisinde çözülmüştür. TCA çözeltisi, günlük (taze) olarak hazırlanmıştır.

0,4 M sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisinin hazırlanması için 4,23 g Na_2CO_3 tartılmış ve 100 mL distile su içerisinde çözülmüştür.

1/3 oranında seyreltilmiş folin-fenol reaktifi çözeltisinin hazırlanması için 2 birim distile su üzerine 1 birim folin-fenol reaktifi eklenmiştir. Günlük olarak taze hazırlanan çözelti, ışıktan etkilenmemesi için folyo ile kaplanmış şişede ve karanlıkta muhafaza edilmiştir.

0,05 M sodyum-fosfat tampon çözeltisinin (pH 7.0) hazırlanması için A ve B çözeltileri hazırlanmıştır. pH değerinin 7.0 olması için A çözeltisinden 75,7 mL, B çözeltisinden ise 48,4 mL alınarak balon jodede karıştırılmış ve son hacim 250 mL olacak şekilde karışıma distile su eklenmiştir.

A) 0,05 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi için 2,01 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tartılmış ve 150 mL distile su içerisinde çözülmüştür.

B) 0,05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi için 0,78 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılmış ve 100 mL distile su içerisinde çözülmüştür.

Proteaz enzimi aktivitesi için *B. subtilis* E6-5 suşunun Çizelge 3.1'de verilen besi ortamlarında 3.2.2'de belirtilen şekilde inkübasyona bırakılmasının ardından 16., 24., 40., 48., 64. ve 72. saatlerde besi ortamlarından 10 mL örnek alınmış, +4 °C'de 10 dk. santrifüj edilerek (6000 devir/dk.) bakteri hücrelerinin bulunduğu alttaki pelet kısmı ile enzim içeren üstteki sıvı kısım (süpernatant) birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Süpernatant ham enzim kaynağı olarak kullanılarak Çizelge 3.2.'de de özet şeklinde verilen proteaz aktivite tayin basamakları uygulanmıştır.

-Aktivite tayini için 1 örnek ve 1 kontrol (kör) olmak üzere 2 adet deney tüpü kullanılmıştır. Örnek tüpüne 1 mL substrat çözeltisi, kör tüpüne 2 mL 0,4 M TCA çözeltisi konulmuş ve tüpler 37 °C'lik su banyosunda 10 dk. bekletilerek reaksiyon sıcaklığına getirilmiştir.

-Örnek tüpüne 1 mL enzim çözeltisi, kör tüpe ise 1 mL 0,05 M sodyum-fosfat tampon çözeltisi ilave edilmiş ve tüpler 37 °C'de 10 dk. inkübe edilmiştir.

-İnkübasyon süresi sonunda örnek tüpüne 2 mL TCA çözeltisi, kör tüpüne ise 1 mL substrat çözeltisi eklenmiş ve vortekslenen tüpler 37°C'de 20 dk. bekletilmiştir. Daha sonra pütürlü yapının giderilmesi için 6000 rpm'de 10 dk. santrifüjlenmiştir.

-Santrifüj sonrasında süpernatant ve pellet kısmın ayrışması sağlanmıştır. Ardından süpernatanttan 1 mL alınmış ve üzerine 1 mL 1/3 oranında seyreltilmiş olan folin-fenol reaktifi çözeltisi ve 5 mL 0,4 M Na₂CO₃ çözeltisi eklenerek vortekslenmiş ve 20 dk. karanlık ortamda bekletilmiştir. Süre sonunda örneğin 660 nm dalga boyundaki absorbands değeri, spektrofotometre (Beckman Coulter DU 700) kullanılarak köre karşı okunmuştur.

Çizelge 3.2. Proteaz aktivite tayini basamakları.

Örnek Tüpü	Kontrol (Kör) Tüpü
1 mL substrat çözeltisi	2 mL 0,4 M TCA çözeltisi
37°C'deki su banyosunda 10 dk. bekletilir.	
1 mL enzim çözeltisi	1 mL 0,05 M Na-P tamponu
Vorteksle karıştırılır ve 37°C'deki su banyosunda 10 dk. bekletilir.	
2 mL 0,4 M TCA çözeltisi	1 mL substrat çözeltisi
Vorteksle karıştırılır ve 37°C'de 20 dk. bekletilir.	
Pütürlü yapının giderilmesi için 6 000 rpm'de 10 dk. santrifüjlenir.	
Süpernatanttan 1 mL alınır.	
Süpernatanta 1 mL 1/3 oranında seyreltilmiş folin-fenol reaktifi çözeltisi ve 5 mL 0,4 M Na ₂ CO ₃ çözeltisi eklenir.	
Vorteksle karıştırılır ve 20 dk. karanlık ortamda bekletilir.	
Örneklerin 660 nm dalga boyundaki absorbands değeri köre karşı okunur.	

Köre karşı okunan absorbands değeri ve standart eğri grafiği denklemi kullanılarak serbestleşen tirozin aminoasiti miktarı hesaplanmıştır. Keay ve Wildi (1970) tarafından öne sürülmüş olan yöntem göre 1 µg/mL tirozin, 2 IU/mL enzim aktivitesine karşılık gelmektedir. Bir ünite (IU, U) enzim, bir dakikada 1 µmol substratın dönüşümünü katalizleyen enzim miktarıdır.

3.2.6. Proteaz üretimi üzerine besinsel faktörler ve metal iyonlarının etkisi

Bakterilerin buldukları besi yerine bağlı olarak gelişim ve enzim üretim kapasiteleri farklı olabilmektedir. Bu çalışmada, besinsel parametrelerin (karbon ve azot kaynakları) ve metal iyonlarının proteaz üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, temel besi yerindeki karbon, azot ve metal kaynakları çıkarılarak yerine aynı oranda olmak üzere farklı karbon, azot ve metal kaynakları denenmiştir.

Karbon kaynakları olarak glikoz, gliserol, fruktoz, sükröz, nişasta, maltoz kullanılmıştır.

Organik azot kaynakları skim milk (yağsız süt tozu), maya özütü, pepton, corn steep liquor (mısır ıslatma şurubu), tripton ve inorganik azot kaynakları olarak $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kullanılmıştır.

Metal iyonları olarak MnSO_4 , LiSO_4 , FeSO_4 , BaCl_2 , CaCl_2 , MgSO_4 , KCl , NaCl ve CuSO_4 kullanılmıştır.

Bakteri aşılama ve üretimi 3.2.2’de belirtilmiştir. Üretimler maksimum enzim üretiminin saptandığı saate kadar yapılmış, örneklerde üreme ve aktivite tayini yapılmıştır. Deneyler 3 kez tekrarlanmış, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler kullanılmıştır.

3.2.7. Proteaz üretimi üzerine fiziksel faktörlerin etkisi

Fiziksel faktörler bakterinin üremesi ve enzim üretimi üzerinde oldukça etkili olduğundan çalışmada sıcaklık, pH, çalkalama hızı, inokülasyon miktarı ve inokülasyon yaşı gibi fiziksel parametrelerin proteaz üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır.

Sıcaklığın etkisini belirlemek için 3.2.2’de belirtilen bakteri inkübasyon koşullarındaki sıcaklık derecesi 37 °C yerine 35, 40, 45, 50, 55, 60 °C değerleri kullanılmıştır.

pH değerinin etkisini belirlemek amacıyla, temel besi yerinin pH değeri 7.0 yerine 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 gibi farklı değerler kullanılmıştır.

Havalandırmanın (çalkalama hızının) araştırılması için 3.2.2’de belirtilen inkübasyon koşullarındaki inhübatörün çalkalama hızı olan 150 rpm yerine durgun ve 50, 100, 200, 250 rpm hızları kullanılmıştır.

İnokülasyon miktarının etkisinin araştırılması için 3.2.2’de belirtilen inokülasyon miktarı olan % 1 yerine % 2, 3, 4 ve 5 kullanılmıştır.

İnokülasyon yaşının etkisinin araştırılması için 3.2.2’de belirtilen inokülasyon yaşı olan 18. saat yerine 24., 48. ve 72. saat kullanılmıştır.

Çalışmalarda temel besi yeri kullanılmış, üretimler maksimum enzim üretiminin saptandığı saate kadar yapılmış, bu saatte alınan örneklerde bakteri üremesi ve aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Böylece proteaz üretimi için optimal koşullar saptanmıştır. Her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler kullanılmıştır.

3.2.8. Maksimum proteaz üretimi için modifiye ortamın hazırlanması

Maksimum proteaz üretiminin saptandığı besinsel ve fiziksel faktörler kombine edilmiş, oluşturulan bu yeni modifiye ortam ve koşullarda proteaz veriminin artırılması amaçlanmıştır. Üretim maksimum enzim üretiminin saptandığı saate kadar yapılmış, bu saatte alınan örnekte bakteri üremesi ve enzim aktivite tayini yapılmıştır. Deney 3 kez tekrarlanmış ve çizelgede ortalama değer verilmiştir.

3.2.9. Proteaz enziminin kısmi saflaştırılması

B. subtilis E6-5 suşu proteazının kısmi olarak saflaştırılması için modifiye besi yerinde maksimum enzim üretim zamanına kadar üretilen kültür ortamı +4 °C ve 6000 rpm’de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant yani ham enzim 4 adımda (amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi) kısmi olarak saflaştırılmıştır. Her bir saflaştırma adımında elektroforez, aktivite tayini ve protein tayini için örnek alınmıştır. Kısmi saflaştırma işlemleri +4 °C’de gerçekleştirilmiştir.

Amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) çöktürmesi;

Ham enzim % 80’lik amonyum sülfat ile çöktürülmüştür. Bu amaçla 100 mL ham enzim için 52,3 g amonyum sülfat havanda ezilerek toz haline getirilmiştir. Ham enzim içerisinde manyetik balık olan bir behere, beher ise buz dolu bir kap içerisinde olacak şekilde manyetik karıştırıcı üzerine konulmuştur. Yavaş hızda çalıştırılan manyetik

karıştırıcı üzerindeki ham enzime azar azar amonyum sülfat eklenmiştir. İşlem sonunda beher parafilm ile sarılarak +4 °C’de manyetik karıştırıcı ile karıştırılır vaziyette 1 gece bekletilmiştir. Daha sonra çözelti, +4 °C’de, 10000 rpm’de 30 dk. santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen pellet üzerine 15 mL 0,05 M sodyum-fosfat tampon çözeltisi eklenmiş ve nazikçe pipetaj edilerek pelletin çözünmesi sağlanmıştır.

Diyaliz;

Protein çözeltisindeki tuzların uzaklaştırılması için yarı geçirgen selüloz membran (Sigma-Aldrich D9652, MW cut-off 14 kDa, 33 mm) kullanılarak diyaliz gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 15 cm diyaliz tüpü kesilmiş ve kullanımdan 2 gün öncesinde yumuşaması için 0,05 M sodyum-fosfat tampon çözeltisine konulmuştur. Tek tip gözenek büyüklüğünün sağlanması ve ağır metallerin giderilmesi için kullanımın hemen öncesinde diyaliz tüpü distile su ile yıkanmıştır. Bir ucu sıkıca bağlanmış olan diyaliz tüpüne protein çözeltisi konulmuş ve sodyum-fosfat tampon çözeltisi içerisinde yüzebilmesi için biraz hava boşluğu bırakılarak diğer ucu da bağlanmıştır. Diyaliz tüpü, içerisinde 750 mL 0,05 M sodyum-fosfat tampon çözeltisi ve manyetik balık olan beherin içerisine, beher ise manyetik karıştırıcı üzerine konulmuştur. Diyaliz prosesi +4°C’de ve yavaş hızda gerçekleştirilmiştir. Tampon çözeltisi 4 saatte bir değiştirilmiştir. Diyalize tamponda tuz tespit edilmeyene kadar devam edilmiştir. Tamponda amonyum sülfatın tespiti için tampon çözeltisinden 15-20 mL alınmış ve üzerine sırasıyla 1-2 damla 0,1 N HCl ve 1-2 damla doygun BaCl₂ çözeltisi eklenmiş, karışımda bulanıklık (BaSO₄ katısı) görülmeyene kadar diyaliz işlemi devam ettirilmiştir (Trautwein ve Kuhlmann 1982).

Ultrafiltrasyon ile diyalizatın konsantre edilmesi;

Diyalizat ultrafiltrasyon (Merck™ Centriprep™ Centrifugal Filter Units, MW cut-off 10 kDa) tüpüne aktarılmış ve ultrafiltrasyon +4°C ve 5 000 rpm’de 15 dk. olmak üzere protein çözeltisinin hacmi 5 mL olana kadar sürdürülmüştür.

Jel filtrasyon kromatografisi;

Enzimin daha ileri derecede saflaştırılması için proteinleri moleküler büyüklüğüne göre ayrılmasını sağlayan jel filtrasyon kromatografisi yöntemi kullanılmıştır. *Bacillus* cinsi proteazların moleküler ağırlığı 8–71 kDa arasında fakat daha çok 30-40 kDa arasında olduğundan kolon dolgu materyali olarak molekül kütlesi 3-80 kDa arasında olan

proteinleri ayırabilen Sephadex® G-75 kullanılmıştır. Çapı 3 cm, uzunluğu 20 cm olan kolonun hacmi 141 cm³ olarak hesaplanmıştır. 1 g Sephadex® G-75 maddesi yaklaşık olarak 12-15 mL su tuttuğu için 11 g Sephadex® G-75 maddesi tartılmış, içerisinde 250 mL 0,05 M sodyum-fosfat tamponu bulunan behere konulmuş ve nazikçe karıştırılmıştır. Ardından +4 °C'de 1 gece boyunca bekletilerek jelin şişmesi sağlanmış ve şişen jel, kolona doldurulmuş ve sodyum-fosfat tampon çözeltisi ile kolon dengelenmiş yani kolondan çıkan tampon çözeltisi pH değeri 7.0 olana kadar kolon, tamponla yıkanmış ve ardından kolon 1 gece +4 °C'de bekletilmiştir. Kolona dikkatlice enzim örneği konulmuş ve örnek jel içine girdikten sonra aynı tamponla jel elüe edilmiştir. Kolondan tamponunun akış hızı 2 mL/dk. olarak ayarlanmış ve fraksiyonlar manuel olarak elle toplanmıştır.

3.2.10. Protein miktarı tayini

Ham enzim ve her bir saflaştırma basamağında elde edilen örneklerde Lowry Metodu kullanılarak protein miktarları tayin edilmiştir (Lowry ve ark. 1951). Bunun amaçla stok BSA (Bovine Serum Albumin) ve farklı ayıraçlar (A, B, C, D, E) hazırlanmıştır.

Stok sığır serum albümini çözeltisinin hazırlanması için 0,15 g BSA tartılmış ve 10 mL distile suda çözülmüştür. BSA içeriği 15 mg/mL olan bu çözeltilerden 1 mL alınarak 100 mL'ye distile suyla tamamlanmıştır. Bu sayede BSA içeriği 150 µg/mL olan stok çözelti elde edilmiştir.

Ayıraç A; % 3'lük Na₂CO₃ çözeltisidir. Bu amaçla 3 g Na₂CO₃ tartılmış ve 100 mL 0,1M NaOH çözeltisinde çözülmüştür.

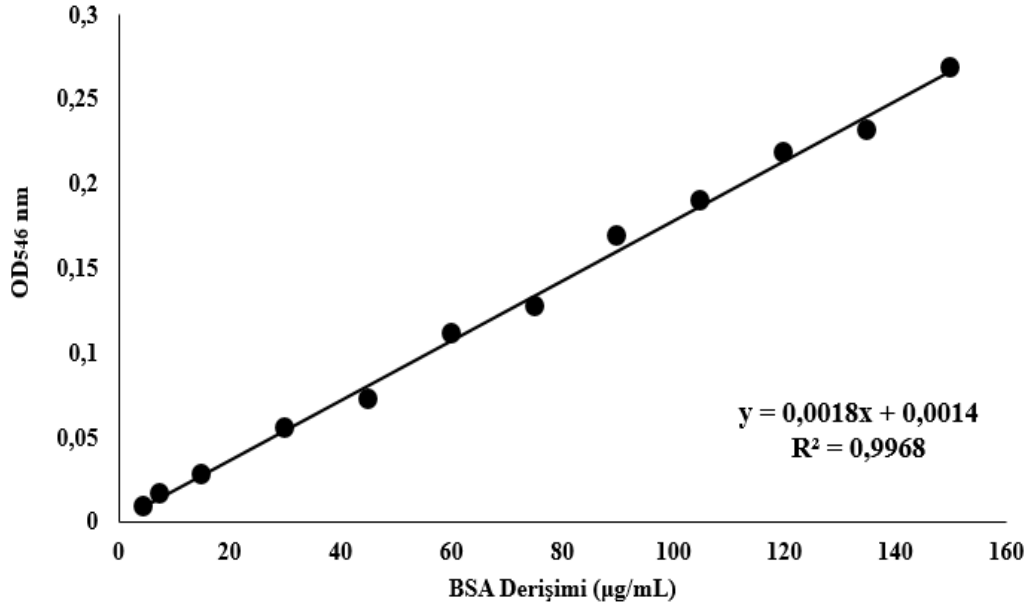
Ayıraç B; % 1'lik CuSO₄.5H₂O çözeltisidir. Bu amaçla 0,1 g CuSO₄.5H₂O tartılmış ve 10 mL distile su içerisinde çözülmüştür.

Ayıraç C; % 2'lik K-Na-Tartarat çözeltisidir. Bu amaçla 0,2 g K-Na-Tartarat tartılmış ve 10 mL distile su içerisinde çözülmüştür.

Ayıraç D; A, B ve C ayıraçları kullanılarak hazırlanmaktadır. Günlük olarak taze hazırlanan D ayıracı için A:B:C ayıraçlarının oranı 50:1:1'dir.

Ayıraç E; 1/2 oranında seyreltilmiş folin-fenol reaktifi çözeltisidir. 1 birim distile su ve 1 birim folin-fenol reaktifiyle taze olarak hazırlanmış ve karanlıkta muhafaza edilmiştir.

Örneklerdeki protein miktarının hesaplanabilmesi için derişimi bilinen (0-150 µg/mL) sığır serum albümin proteini (BSA, Bovine Serum Albumin) çözeltileri kullanılarak standart eğri oluşturulmuştur. BSA çözeltilerinin hazırlanmasında stok BSA ve distile su kullanılmıştır. Deney tüplerine ilk olarak 0-150 µg/mL BSA içeren çözeltiler konulmuştur. Daha sonra D ayırıcından 5'er mL konulmuş ve vortekslenen tüpler 10 dk. karanlıkta bekletilmiştir. Süre sonunda hızlı bir biçimde deney tüplerine 0,5 mL E ayırıcından eklenmiş ve vortekslenen deney tüpleri 20 dk. karanlıkta bekletilmiştir. Ardından spektrofotometrik (Beckman Coulter DU 700) yöntem kullanılarak örneklerin 546 nm dalga boyundaki absorbans değerleri, köre karşı okunmuştur. BSA derişimine karşı, 546 nm'deki absorbans değerleri kullanılarak çizilen grafikte lineer regresyon metodu kullanılmış, standart eğri grafiğinin doğrusunun denklemi ve regresyon katsayısı hesaplanmıştır. Buna göre doğrunun denklemi $y = 0,0018x + 0,0014$ iken regresyon katsayısı $R^2 = 0,9968$ 'dir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. BSA kalibrasyon (standart) grafiği ve denklemi.

Ham enzim ve saflaştırma basamakları sırasında toplanan enzim örneklerindeki protein miktarının tayin edilmesi için 1 adet kör ve 5 adet enzim örneği (amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi) olmak üzere toplam 6 adet deney tüpü kullanılmıştır. Spektrofotometrenin okuma aralığının dışında absorbans

veren enzim örneklerinin dilüe edilmesinde distile su kullanılmıştır. Deney protokolü gereği kör tüpüne 1 mL distile su, örnek tüplerine ise 1 mL enzim örneği konulmuştur. Daha sonra bütün deney tüplerine D ayırıcından 5'er mL konulmuş ve vortekslenen tüpler 10 dk. karanlıkta bekletilmiştir. Süre sonunda hızlı bir biçimde bütün deney tüplerine 0,5 mL E ayırıcından eklenmiş ve vortekslenen deney tüpleri 20 dk. karanlıkta bekletilmiştir. Ardından spektrofotometrik (Beckman Coulter DU 700) yöntem kullanılarak örneklerin 546 nm dalga boyundaki absorbans değerleri, köre karşı okunmuştur. Köre karşı okunan absorbans değeri ve standart eğri grafiği denklemi kullanılarak örneklerdeki protein miktarı hesaplanmıştır. Deney 3 kez tekrarlanmış ve değerlerin ortalaması kullanılmıştır.

3.2.11. Saf proteaz enziminin karakterize edilmesi

Saflaştırılan proteaz enziminin karakterize edilmesi amacı ile enzim aktivitesi üzerine sıcaklık ve stabilitesinin, pH ve stabilitesinin ve potansiyel bileşiklerin etkisi araştırılmıştır. Enzimin kinetik özellikleri olan V_{max} ve K_m değerleri saptanmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı tespit edilmiş ve zimogram analizi de yapılmıştır.

3.2.12. Saf enzimin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Saf proteaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Enzimin optimum sıcaklık değerinin tespiti için 3.2.5'te belirtilmiş olan proteaz enzimi aktivitesinin ölçülmesi protokolü uygulanmış fakat inkübasyon sıcaklığı olarak 37°C yerine 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80 °C kullanılmıştır.

Enzimin optimum sıcaklık değerindeki stabilitesinin tespiti için 3.2.5'te belirtilmiş olan proteaz enzimi aktivitesinin ölçülmesi protokolü uygulanmış fakat inkübasyon sıcaklığı olarak optimum sıcaklık değeri, inkübasyon süresi olarak ise 10 dk. yerine 20 dk., 30 dk., 60 dk., 90 dk., 2 sa., 2,5 sa., 3 sa., 4 sa., 5 sa. ve 6 sa. kullanılmıştır. Optimal sıcaklık değerinde inkübasyon süresi 10 dk. olan enzimin aktivite değeri % 100 olarak kabul edilerek % bağıl aktivite değerleri hesaplanmıştır (Pant ve ark. 2015).

Her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

3.2.13. Saf enzimin aktivitesi üzerine pH değerinin etkisi

Saf proteaz enzimin aktivitesi üzerine pH değerinin etkisi araştırılmıştır. Enzimin optimum pH değerinin tespiti için 3.2.5'te belirtilmiş olan proteaz enzimi aktivitesinin ölçülmesi protokolü uygulanmış fakat protokolde kullanılan pH değeri 7.0 olan sodyum fosfat tampon çözeltisi yerine tampon olarak pH 2.0 ve 3.0 için glisin-HCl; pH 4.0, 5.0 ve 6.0 için sodyum asetat; pH 8.0 için sodyum fosfat; pH 9.0 ve 10.0 için glisin-NaOH kullanılmış ve enzimin optimum pH değeri belirlenmiştir (Stoll ve Blanchard 1990).

Enzimin optimum pH değerindeki stabilitesinin tespiti için 3.2.5'te belirtilmiş olan proteaz enzimi aktivitesinin ölçülmesi protokolü uygulanmış fakat tampon olarak optimum aktivite görülen pH değerinde kullanılan tampon kullanılmıştır. Ayrıca inkübasyon süresi olarak ise 10 dk. yerine 20 dk., 30 dk., 60 dk., 90 dk., 2 sa., 2,5 sa., 3 sa., 4 sa., 5 sa. ve 6 sa. kullanılmıştır. Optimal pH değerinde ve inkübasyon süresi 10 dk. olan enzimin aktivite değeri % 100 olarak kabul edilerek bütün örneklerin % bağlı aktivitesi hesaplanmıştır (Pant ve ark. 2015).

Her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

3.2.14. Saf enzimin aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi

Saf proteaz enziminin aktivitesi üzerine farklı metal iyonu, tuz, yüzey aktif madde ve redükleyici bileşiklerin etkisi araştırılmıştır. Proteaz enzimi aktivitesinin ölçülmesi protokolü uygulanmış fakat protokolde kullanılan sodyum fosfat tampon çözeltisine deşişimi 1 ve 5 mM olacak şekilde MnSO₄, MgSO₄, FeSO₄, ZnSO₄, CuSO₄, CaCl₂, LiSO₄, BaCl₂, NaCl, KCl, SDS, EDTA, 2-β-merkaptolanol eklenmiştir. Dolayısıyla substrat çözeltisinde potansiyel bileşiklere maruz kalarak inkübe edilen enzimin aktivite tayini yapılmıştır. Potansiyel bileşiklere maruz kalmamış enzimin aktivitesi % 100 olarak kabul edilmiş ve buna göre % bağlı aktivite değerleri hesaplanmış ve grafiklendirilmiştir.

Deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

3.2.15. Saf enzimin kinetik parametreleri

Saf proteaz enziminin V_{max} ve K_m değerleri farklı konsantrasyonlarda hazırlanan substrat çözeltileri kullanılarak çizilen Lineweaver–Burk grafiği ile tespit edilmiştir. Substrat olarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kazein çözeltileri kullanılmıştır.

Deney 3 kez tekrarlanmış, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

3.2.16. Moleküler ağırlığın tespiti

SDS-PAGE yöntemi; proteaz enziminin moleküler ağırlığının belirlenmesinde kullanılmıştır (Laemmli 1970).

Kullanılan çözeltiler ve jellerin hazırlanması;

a) Tris-HCl (0,5 M, pH: 6.8) tamponu

Yükleme (yığıma, stacking) jelinin ve örnek tamponunun hazırlanmasında kullanılmıştır. Bu amaçla 6,05 g Tris Base tartılmış, 80 mL distile su içerisinde çözülmüş daha sonra saf HCl kullanılarak pH 6.8 olarak ayarlanmış ve hacim 100 mL olacak şekilde distile su eklenmiştir. pH'sı kontrol edilmiş ve koyu şişede +4°C'de muhafaza edilmiştir.

b) Tris-HCl (1,5 M, pH: 8.8) tamponu

Ayırma (separating, running) jelinin hazırlanmasının kullanılmıştır. Çözeltinin hazırlanması için 18,17 g Tris Base tartılmış, 80 mL distile su içerisinde çözülmüş daha sonra saf HCl kullanılarak pH 8.8 olarak ayarlanmış ve hacim 100 mL olacak şekilde distile su eklenmiştir. pH'sı kontrol edilmiş ve koyu şişede +4°C'de muhafaza edilmiştir.

c) % 30'luk (w/v) akrilamid çözeltisi

28,8 g akrilamid ve 1,2 g metilenbisakrilamid tartılmış ve bir miktar distile su ile çözdürülmüştür. Toplam hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmış ve Whatman® Grade 1 (11 µm) filtre kağıdı ile süzölmüştür. Koyu şişede +4°C'de muhafaza edilmiştir.

d) % 20'lik (w/v) SDS çözeltisi

2 g SDS tartılmış ve bir miktar distile su ile çözdürülmüştür. Daha sonra toplam hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

e) % 10'luk (w/v) Amonyum Persulfat (APS) çözeltisi

1 g APS bir distile miktar su ile çözdürülmüştür. Daha sonra toplam hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti kullanılmadan hemen önce hazırlanmıştır.

f) Yürütme (running, elektrot) tamponu

1,21 g Tris Base ve 5,76 g glisin tartılmış, 1000 mL distile su içerisinde çözülmüştür. Daha sonra çözelti içerisinde 1 g SDS konulmuş ve çok kısa bir süre karıştırılmıştır.

g) Örnek tamponu

Örneklerin jele yüklenmesi için hazırlanan bu tampon, 4 mL distile su, 1 mL Tris HCl (0,5M, pH 6.8), 0,8 mL gliserol, 1,6 mL % 10'luk SDS çözeltisi, 0,2 mL % 0,05'lik Bromfenol Blue çözeltisi ve 0,4 mL 2- β -merkaptotanol içermektedir. Örnek tamponu folyoya sarılı olarak +4 °C'de muhafaza edilmiştir. % 10'luk (w/v) SDS çözeltisi için 1 g SDS tartılmış, bir miktar distile su ile çözdürülmüştür. Daha sonra toplam hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. % 0,05'lik (w/v) Bromfenol Blue çözeltisi için 0,05 g Bromfenol Blue tartılmış, bir miktar distile su ile çözdürülmüştür. Daha sonra toplam hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

h) Boyama çözeltisi

Jelin boyanması için hazırlanan bu çözelti, alkol içerdiği ve bu alkolün uçması ihtimaline karşı taze hazırlanmıştır. Bu amaçla 0,75 g Coomassie Brilliant Blue R, 125 mL izopropanolde çözülmüştür. Daha sonra karışıma 325 mL distile su ve 50 mL asetik asit eklenmiş ve manyetik karıştırıcı yardımıyla iyi şekilde karışması sağlanmıştır. Çözeltide boya bulunduğu için ışık görmeyecek şekilde muhafaza edilmiştir.

i) Yıkama çözeltisi

Boyanın jelden uzaklaştırılması için hazırlanan bu çözelti, alkol içerdiği ve bu alkolün uçması ihtimaline olarak taze hazırlanmıştır. Yıkama çözeltisi, 500 mL distile su, 100 mL asetik asit ve 400 mL izopropanol ile hazırlanmıştır.

j) Yükleme (yığma, stacking) ve ayırma (separating, running) jeli olmak üzere 2 farklı jel hazırlanmıştır (Çizelge 3.3). Akrilamid oranı yükleme jelinde %3, ayırma jeli ise %10'dur. APS ve TEMED polimerleşmeyi sağladığı için jellere en son eklenmiştir.

Çizelge 3.3. SDS-PAGE yöntemi için hazırlanan jellerin içerikleri.

İçerik	Yükleme (Yığıma, Stacking) Jeli (%3)	Ayrırma (Running, Separating) Jeli (%10)
Tris HCl (0,5M, pH 6.8)	2,5 mL	-
Tris HCl (1,5M, pH 8.8)	-	5 mL
%30'luk (w/v) Akrilamid	1,1 mL	6,8 mL
dH ₂ O	6,1 mL	8 mL
%20'lik (w/v) SDS	50 µL	100 µL
APS (100 mg/mL)	50 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL

SDS-PAGE işlemi; Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad, USA) dikey elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cam plakalar % 70'lik etanol çözeltisi ile temizlenmiş ve daha sonra distile sudan geçirilmiş ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Jel dökme standına silikon yastıklar yerleştirilmiştir. Uzun olan ve spacer denilen çıkıntıyı içeren uzun cam plaka ve kısa cam plaka, çerçeveye yerleştirilmiş ve düz bir zeminde camlar çerçeveye sıkıştırılmıştır. Bu çerçeve, jel dökme standına mandallar kullanılarak sıkıştırılmıştır. Daha sonra bu yapıya tarak oturtulmuş ve tarak dişinin 1 cm altı kalemle işaretlenmiştir ve tarak çıkartılmıştır.

Çizelge 3.3'te belirtilmiş olan ayırma jeli hazırlanmıştır. En son içerisine sırasıyla APS ve TEMED eklenmiş olan jel çözeltileri hafifçe karıştırılmış ve hiç zaman kaybetmeden cam plakalar arasına kalemle işaretlenen yere kadar dökülmüştür. Jelin üzerine izopropil alkol dökülerek, üst yüzeyin düzgün bir şekilde donması için yaklaşık olarak 1 saat beklenmiştir. Donan jeldeki izopropil alkolün giderilmesi için üzerine distile su dökülerek iyice yıkanmış; ardından kurutma kağıdıyla jelin üzerindeki fazla su da giderilmiştir. Ardından Çizelge 3.3'te belirtilmiş olan yükleme jeli hazırlanmış, son olarak içerisine sırasıyla APS ve TEMED eklenmiş ve hafifçe karıştırılmış olan jel hiç zaman kaybetmeden cam plakalar arasına aynı yöntemle dökülmüş, donması beklenmeden tarak cam plakalar arasına yerleştirilmiştir. Donma tamamlandıktan sonra tarak dikkatlice çıkarılmış ve bu şekilde örneklerin yükleneceği kuyucuklar oluşturulmuştur. 2 mL'lik ependorf tüpüne saflaştırılmış enzim örneklerinden 75 µL konulmuş ve üzerlerine 175 µL örnek tamponu eklenmiştir. Hafifçe pipetaj edilerek karışması sağlanan örnekler 5 dk. boyunca kaynar suda kaynatılmıştır. Kaynayan örnekler, jeli eritme riskine karşı 5 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Kaset olarak adlandırılan 2 cam plaka ve jelden oluşan yapı, tank içerisine özenle yerleştirilmiştir. Tank, yürütme (running, elektrot) tamponu ile doldurulmuştur. Moleküler ağırlığın tespit edilebilmesi için birinci kuyucuğa 5 µL marker (Prestained Protein Marker 11-190 kDa, Cell Signaling Technology, USA), diğer kuyucuklara ise 10 µL örnek yüklenmiştir. Tanka 80 V akım verilerek elektroforeze başlanmıştır. Örnekler, ayırma jeline geçtiği zaman akım 150 V olarak ayarlanmış ve izleme boyası jelin 1 cm altına ulaştığında elektroforez işlemi sonlandırılmıştır. Elektroforez sonrasında kasetten çıkarılan jel, boyama çözeltisinde 1 gece 50 rpm'de çalkalanmıştır. Boyanmış olan jelin yıkanması işlemine geçilmiştir. Bu amaçla yıkama çözeltisi içerisine alınan jelden boyanın giderilmesi sağlanmıştır. Bu işlem 50 rpm'de 3 saat sürmüş olup her saat jelin bulunduğu yıkama çözeltisi değiştirilmiştir. Ardından jel yıkama çözeltisinden çıkarılmış ve örneklerin molekül ağırlıkları, standartlar baz alınarak belirlenmiştir.

3.2.17. Zimogram analizi

Zimografi, enzimin substratına dayalı olarak hidrolitik enzimlerin tespiti için kullanılan elektroforetik bir tekniktir. Bu çalışmada da jelde proteazların aktivitesini saptamak için gerçekleştirilmiş olan zimogram analizi Vijayaraghavan ve arkadaşları (2014) tarafından gerçekleştirilmiş yöntemle göre yapılmıştır. Ancak yöntemde substrat olarak kullanılan kazein yerine çalışmada jelatin kullanılmıştır (Çizelge 3.4). Buna ek olarak yöntemde denatüre edici ajan (2-β-merkaptetanol) ve koşullar (kaynatma) kullanılmamıştır. Zimografide elektroforez işlemi sonuna kadar bütün basamaklar SDS-PAGE yönteminde verilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Farklı olarak örnekler kaynatılmamış ve ayırma jeline sisteme 100 V akım verilmiştir. Elektroforezden sonra SDS'in jelden uzaklaştırılması işlemine geçilmiştir. Bu amaçla kasetten çıkarılan jel, 200 mL 0,05 M sodyum-fosfat tamponu (pH 7.0) bulunan kapta 5 dk. 50 rpm'de çalkalanmış ve en distile sudan geçirilmiştir. SDS giderme tamponu (% 1'lik Triton X-100 çözeltisi) bulunan kapta 90 dk. 50 rpm'de çalkalanmış ve Triton X-100'ün giderilmesi için distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra jelin boyanması için jel, boyama çözeltisi içerisinde 50 rpm'de 2 saat çalkalanmıştır. Boyanmış jelin yıkanması için yıkama çözeltisi içerisine alınan jel, 10 dk. 50 rpm'de çalkalanmış ve aralıklı olarak jelin bulunduğu yıkama çözeltisi yenisi ile değiştirilmiştir. Jelde açık zonlar belirginleşene kadar 50 rpm'de çalkalamaya devam

edilmiş ve bu sayede jel üzerinde aktif bantların görünür hale gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra jel, yıkama çözeltisinden çıkarılmış ve şeffaflaşan zonların molekül ağırlığı, standart proteinler baz alınarak belirlenmiştir.

Zimografide, jelin içine substrat olarak hazırlanan jelatin çözeltisi (5 mg/mL) için 10 mL distile suya 0,05 g jelatin konulmuş, jelatin eriyene kadar alevde ısıtılmıştır. Örnek tamponu 2- β -merkaptotanol içermemekte; boyama ve yıkama çözeltilerinin hazırlanmasında metanol kullanılmaktadır. SDS giderme tamponu ise SDS denatüre edici ajanının jelden uzaklaştırılıp, enzimin tekrar fonksiyonel hale gelmesini sağlamaktadır. Bu amaçla kullanılan %1'lik (v/v) Triton X-100 noniyonik deterjanının hazırlanması için 2 mL Triton X-100 üzerine Na-P tamponu (0,05M) eklenerek 200 mL'ye tamamlanmıştır.

Çizelge 3.4. Zimogram analizi için hazırlanan jellerin içerikleri.

İçerik	Yükleme (Yığıma, Stacking) Jeli (% 3)	Ayırma (Running, Separating) Jeli (% 10)
Tris HCl (0,5M, pH 6.8)	2,5 mL	-
Tris HCl (1,5M, pH 8.8)	-	5 mL
% 30'luk (w/v) Akrilamid	1,1 mL	6,8 mL
dH₂O	6,1 mL	6 mL
Jelatin (5 mg/mL)	-	2 mL
% 20'lik (w/v) SDS	50 μ L	100 μ L
APS (100 mg/mL)	50 μ L	100 μ L
TEMED	10 μ L	10 μ L

3.2.18. Ham enzimin depolanma stabilitesinin belirlenmesi

Ham enzimin depolanma sıcaklığına bağlı olarak stabilitesini saptamak amacıyla modifiye ortamda inkübe edilmiş olan kültür, +4 °C ve 6 000 rpm 10 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant, ham enzim olarak kullanılmıştır. Ham enzimin ilk aktivitesi tayin edildikten sonra 50 mL oda sıcaklığında (20 °C), 50 mL +4 °C'de, 50 mL -20°C' de olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Her 15 günde bir enzim örneklerinin aktiviteleri ölçülmüştür. Proteaz aktivitelerindeki değişim, başlangıç aktivitelerine (%100) göre hesaplanarak bağıl aktivite (%) olarak verilmiştir.

3.2.19. Deriden kıl giderimi (dehairing)'nde proteaz uygulaması

Yeni izolat *B. subtilis* E6-5 suşundan izole edilen ham ve konsantre proteaz enziminin keçi, koyun ve dana deri örneklerindeki kılları giderme potansiyeli araştırılmıştır. Buna ek olarak kimyasal madde kullanılarak da kıl giderimi gerçekleştirilmiş ve sonuçlar enzimatik işlem ile karşılaştırılmıştır. Bu amaçla Bursa'da bulunan Kum Gıda Akçalar Mezbahası'ndan koyun, keçi ve dana derileri temin edilmiştir. Deriler kıl yükünün fazla olduğu sırt kısmından alınmıştır. Derilerden kıl giderme işleminde Zambare ve arkadaşları (2007) tarafından uygulanan yöntem kullanılmıştır. Buna göre tuzlanmış deriler öncelikle musluk suyu ile yıkanmış ve derilerden 3x5cm² parçalar kesilmiştir. Tüm işlemler ağzı açık petride ve oda sıcaklığında (20 °C) gerçekleştirilmiştir.

Konsantre enzim uygulanan deri örnekleri, içerisinde 10 mL konsantre enzim bulunan petrilere derilerin, kıllı yüzü petri tabanına bakar vaziyette konulmuştur. Ham enzim uygulanan deri örnekleri ise içerisinde 50 mL ham enzim bulunan petrilere batırılmıştır. Kimyasal madde uygulanan deri örnekleri içerisinde 50 mL kimyasal karışım bulunan petrilere batırılmıştır. Bu 3 deney grubundaki deriler kıllar tamamen giderilene kadar oda sıcaklığında (20 °C), ağzı açık şekilde inkübe edilmiş ve belirli aralıklarla derilerdeki kıllar çekilerek kılların dökülüp dökülmediği kontrol edilmiştir. Tamamen kılları giderilmiş olan deri örneği zaman kaybetmeden sırasıyla çeşme suyu ve distile su ile yıkanmış ve histolojik analiz için hazırlanmıştır. Kontrol olarak hazırlanmış olan deri örneklerindeki kıllar ise jilet yardımıyla traşlanmış ardından zaman kaybetmeden sırasıyla çeşme suyu ve distile su ile yıkanmış ve histolojik analiz için hazırlanmıştır.

Kimyasal yöntem ile kıl giderimi için karışım hazırlanmıştır. Bu amaçla 100 mL çeşme suyu, 10 g kireç ve 2 g zırnık (sodyum sülfür, Na₂S.7H₂O) karıştırılmıştır. Zırnık ciltte tahrişe sebep olabileceği için eldiven ile çalışılmıştır.

3.2.20. Derilerin histolojik analizi

Enzimatik ve kimyasal yolla kılları giderilmiş olan deri örnekleri ve kontrollerinin histolojik analizi yapılmıştır. Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiş olan incelemede derinin kıl gözeneklerinde kıl kalıntısının, kollajen yapısında hasarın olup olmadığı tespit edilmiştir.

Bu amaçla kılları enzim (6809 U/mL), kimyasal madde (kireç ve zırnık), jilet (kontrol) ile giderilmiş olan deri örneklerinden 1cm²'lik parçalar kesilmiş, yıkanmış ve %10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonunda 24 saat fikse edilmiş (Sivasubramanian ve ark. 2008). Fiksasyon sonrasında artan oranda etanol serilerinden geçilerek dehidratasyonu (suyunu kaybetmesi) sağlanmış, ardından parafilm bloklara gömülmüş, parafilm bloklardan mikrotomla 5 µm kalınlığında seri kesitler alınmış ve kesitler lamlara yerleştirilip 1 gece bekletilmiştir. Sırasıyla deparafinizasyonu (parafilminden arındırma) ve azalan oranda etanol serilerinden geçirilerek rehidratasyonu sağlanan kesitler, Crossman'ın (1977) üçlü boya tekniği ile boyanarak incelenmiş ve kesitlerin fotomikrografları çekilmiştir. Crossman'ın (1977) üçlü boya tekniğinde anilin mavisi, fosfotungustik asit ve Haris'in hematoksileni kullanılmıştır. Anilin mavisi, bağ dokusunu mavi; fosfotungustik asit, sitoplazmayı pembe; Haris'in hematoksileni ise nükleusu koyu mavi veya siyah boyamıştır.

% 10'luk tamponlu nötral formalin için 20 mL % 37-40'luk formalin, 180 mL distile su, 0,8 g NaH₂PO₄ ve 1,3 g Na₂HPO₄ karıştırılmış ve +4°C'de muhafaza edilmiştir.

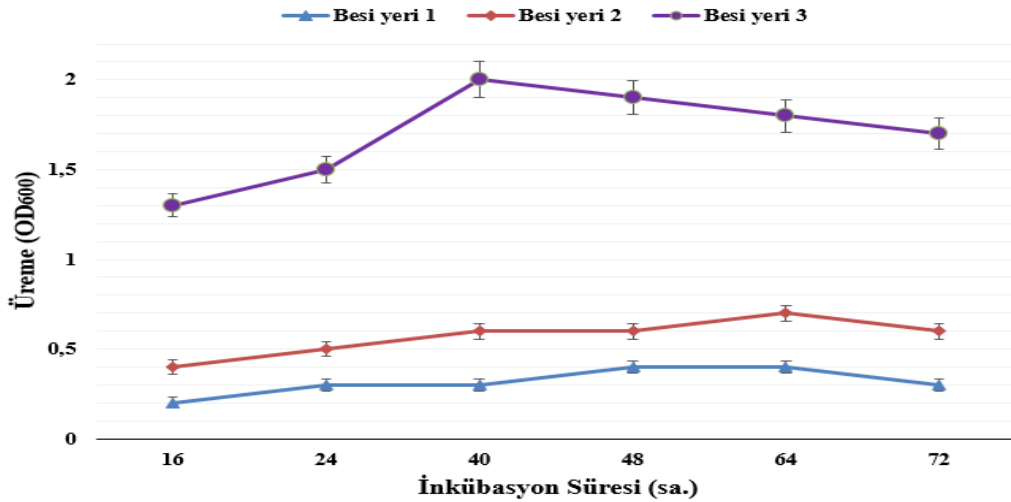
4. BULGULAR

4.1. Proteaz Üretim Ortamının Belirlenmesi

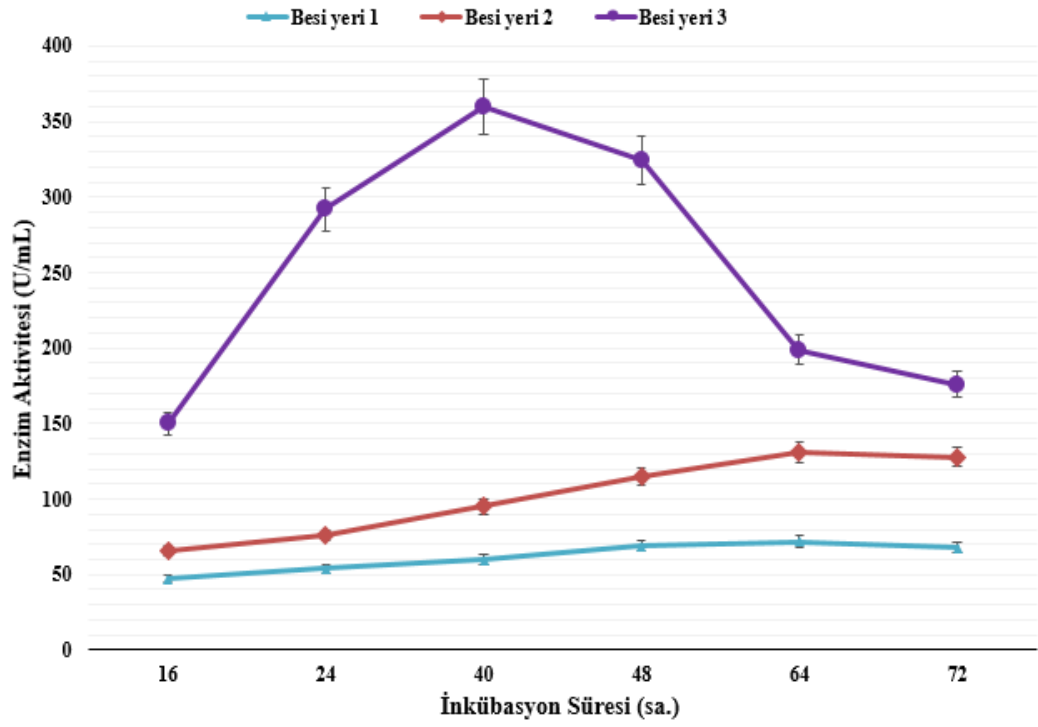
Bacillus subtilis E6-5 suşunun proteaz üretim ortamını belirlemek üzere denemeye alınan 3 farklı içerikli besi yerlerinde 16., 24., 40., 48., 64. ve 72. saatlerde üreme ve enzim aktivite tayinleri yapılmıştır. Enzim üretimini maksimum gerçekleştirdiği besi ortamı belirlenmiş ve en iyi besi yeri, 3 numaralı besi yeri olarak saptanmıştır (Çizelge 4.1). Bu besi yerinde maksimum enzim aktivitesi 360 U/mL olarak 40 saatte elde edilirken, maksimum üreme OD₆₀₀ 2,0 olarak 40 saatte elde edilmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.1, Şekil 4.2). Daha sonraki çalışmalara seçilen bu temel besi yeri ile devam edilmiştir.

Çizelge 4.1. *Bacillus subtilis* E6-5'in 3 farklı besi yerindeki üreme ve proteaz üretimlerinin karşılaştırılması.

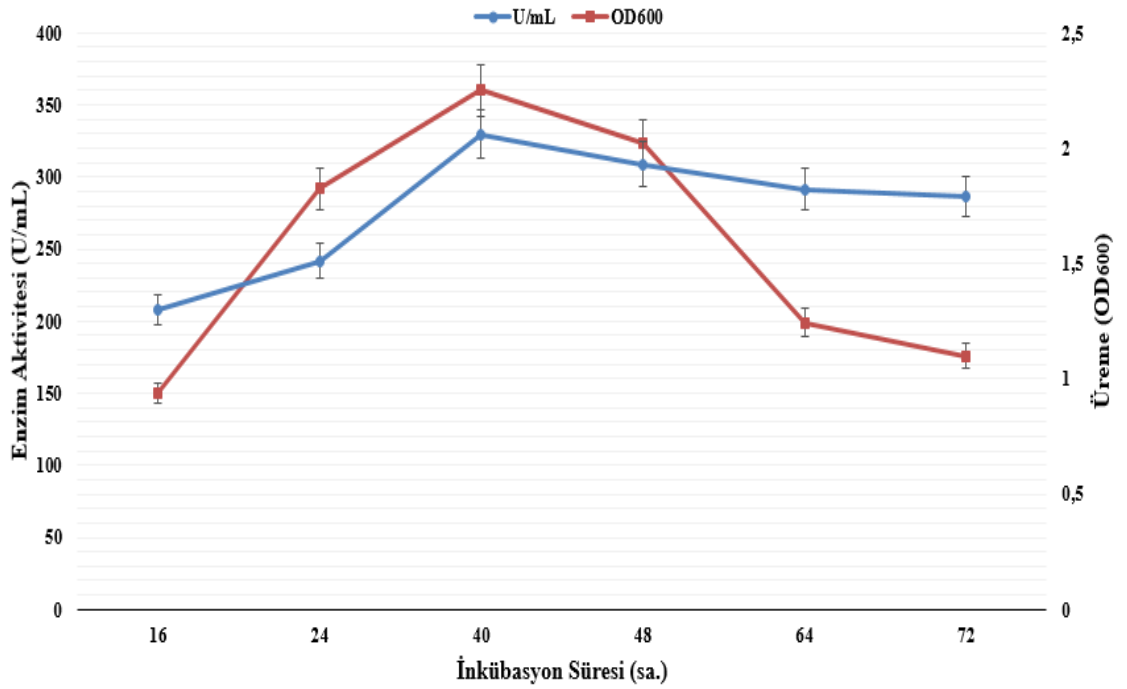
İnkübasyon Süresi (sa.)	Besi yeri 1 (Qadar ve ark. 2009)		Besi yeri 2 (Sevinc ve Demirkan 2011)		Besi yeri 3 (Gököz 2016)	
	OD ₆₀₀	U/mL	OD ₆₀₀	U/mL	OD ₆₀₀	U/mL
16	0,2	47	0,4	66	1,3	150
24	0,3	54	0,5	76	1,5	292
40	0,3	60	0,6	95	2,0	360
48	0,4	69	0,6	115	1,9	324
64	0,4	72	0,7	131	1,8	199
72	0,3	68	0,6	128	1,7	176



Şekil 4.1. *Bacillus subtilis* E6-5'in farklı içerikli besi yerindeki üremelerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.2. *Bacillus subtilis* E6-5'in farklı içerikli besi yerindeki proteaz üretim kapasitelerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.3. *Bacillus subtilis* E6-5'in Besi yeri 3 (Çizelge 3.1)'de proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimi.

4.2. Proteaz Üretimi Üzerine Besinsel Faktörler ve Metal İyonlarının Etkisi

Enzim üretimi ortamda bulunan besinsel faktörlere bağlı olduğundan dolayı, temel besi yerindeki karbon (C), azot (N) ve metal iyonu kaynakları yerine farklı karbon, azot ve metal iyon kaynakları denenmiştir.

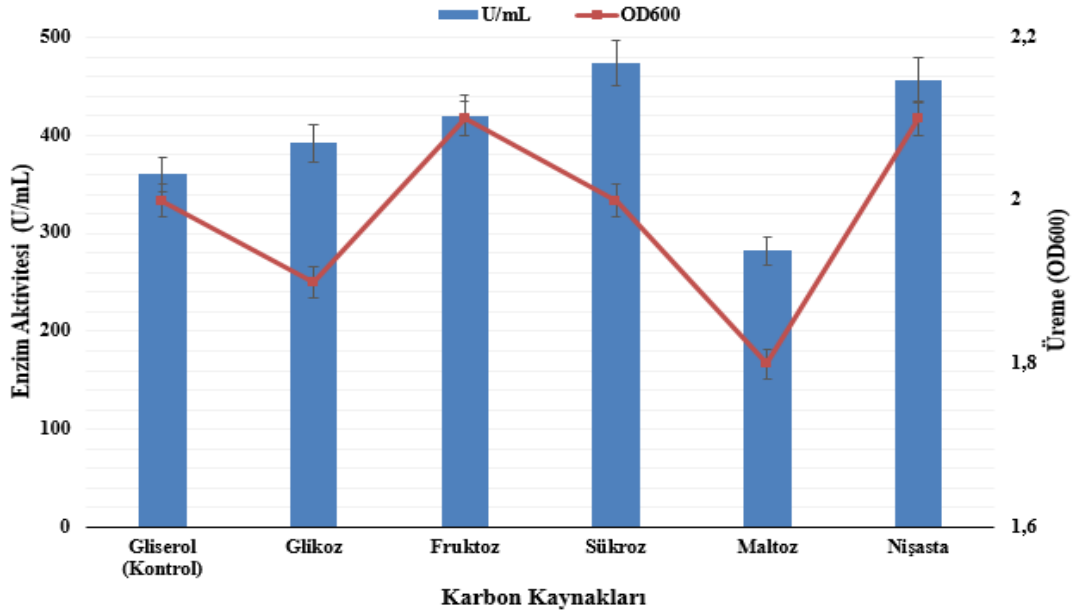
Karbon kaynaklarının bakteri üreme ve proteaz enzim üretimi üzerine etkilerini araştırmak amacıyla 5 farklı karbon kaynağı kullanılmıştır. Çizelge 3.1’de içeriği verilen temel enzim üretim ortamında karbon kaynağı olarak kullanılan Gliserol yerine, aynı oranda (%0,1) karbon kaynağı olarak Glikoz, Fruktoz, Sükroz, Nişasta ve Maltoz kullanılmıştır. Bakteri üretimi 3.2.2’de belirtildiği gibi yapılmış olup, bakteri maksimum enzim üretiminin elde edildiği 40 saat süresince inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda alınan örneklerde üreme ve proteaz aktivite tayinleri yapılmıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.4).

Bacillus subtilis E6-5’in proteaz enzim üretimi açısından karbon kaynağı tercih sıralaması sırayla Sükroz > Nişasta > Fruktoz > Glikoz > Gliserol (Kontrol) > Maltoz olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmada maksimum enzim üretiminin elde edildiği Sükroz içeren ortamdaki enzim üretimi (474 U/mL), kontrol ortamına göre (360 U/mL) %32 oranında artmıştır. Karbon kaynağı olarak Nişasta kullanımının enzim üretimini %27 arttırdığı, Maltoz kullanımının ise %22 oranında azalttığı saptanmıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.4).

Bakteri üremesi açısından ise karbon kaynağı tercih sırası Nişasta = Fruktoz > Sükroz = Gliserol (Kontrol) > Glikoz > Maltoz olarak saptanmıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.4).

Çizelge 4.2. Farklı karbon kaynaklarının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi.

Karbon Kaynakları	OD ₆₀₀	U/mL	Bağlı Aktivite (%)
Gliserol (Kontrol)	2,0	360	100
Glikoz	1,9	392	109
Fruktoz	2,1	420	117
Sükroz	2,0	474	132
Maltoz	1,8	282	78
Nişasta	2,1	456	127



Şekil 4.4. Farklı karbon kaynaklarının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi.

Azot kaynaklarının *Bacillus subtilis* E6-5 suşunun üremesi ve proteaz enzim üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla Çizelge 3.1’de içeriği verilen temel enzim üretim ortamında organik azot kaynağı olarak kullanılan Tripton çıkarılarak yerine, aynı oranda (% 1,02) organik azot kaynakları olan Skim milk (yağsız süt tozu), Maya özütü, Pepton, Corn steep liquor (mısır ıslatma şurubu); inorganik azot kaynakları olan $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 kullanılmıştır.

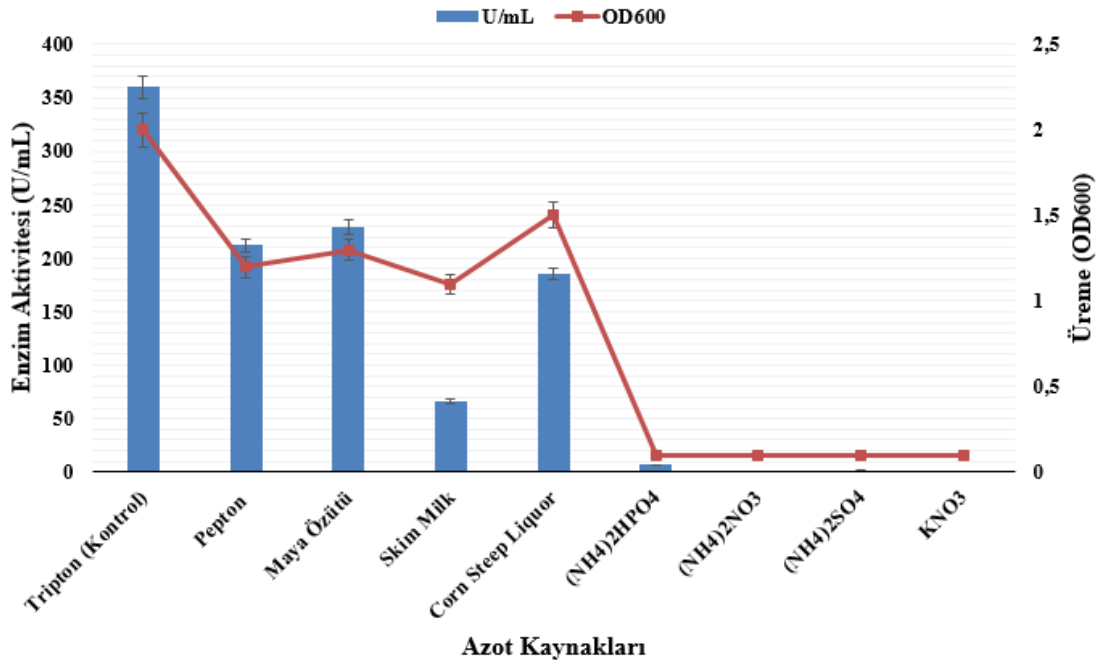
Bakteri üretimi 3.2.2’de belirtildiği gibi yapılmış olup, bakteri maksimum enzim üretiminin elde edildiği 40 saat süresince inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda alınan örneklerde üreme ve proteaz aktivite tayinleri yapılmıştır. Denemeye alınan organik azot kaynakları varlığında enzim üretiminde bir artış gözlenmezken, inorganik azot kaynakları varlığında dramatik düşüşler saptanmıştır (Çizelge 4.3, Şekil 4.5).

Bacillus subtilis E6-5 suşunun enzim üretimi açısından azot kaynağı tercihi sırasıyla Tripton (Kontrol) > Maya özütü > Pepton > Corn steep liquor > Skim milk olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.5).

Bakteri üremesi açısından ise azot kaynağı tercih sırası Tripton (Kontrol) > Corn steep liquor > Maya özütü > Pepton > Skim milk olarak saptanmıştır (Çizelge 4.3, Şekil 4.5).

Çizelge 4.3. Farklı azot kaynaklarının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi.

Azot Kaynakları	OD ₆₀₀	U/mL	Bağlı Aktivite (%)
Tripton (Kontrol)	2,0	360	100
Pepton	1,2	212	59
Maya Özütü	1,3	229	64
Skim Milk	1,1	66	18
Corn Steep Liquor	1,5	185	51
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,1	7	2
(NH ₄) ₂ NO ₃	0,1	1	0,3
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1	2	0,5
KNO ₃	0,1	1	0,3



Şekil 4.5. Farklı azot kaynaklarının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi.

Metal iyonlarının *B. subtilis* E6-5 suşunun gelişimi ve proteaz üretimi üzerine etkisini araştırmak üzere yapılan çalışmalarda temel besi yeri olan kontrol ortamındaki %0,01 CaCl₂ + %0,01 MgSO₄ yerine toplam %0,02 oranında MnSO₄, LiSO₄, FeSO₄, BaCl₂, KCl, NaCl, CaCl₂, MgSO₄ ve CuSO₄ gibi farklı metal iyonları kullanılmıştır. Ayrıca aynı metal iyonları %0,01 oranında da denemeye alınmıştır.

Bakteri üretimi 3.2.2’de belirtildiği gibi yapılmış olup, bakteri maksimum enzim üretiminin elde edildiği 40 saat süresince inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda alınan örneklerde üreme ve proteaz aktivite tayinleri yapılmıştır (Çizelge 4.4, Şekil 4.6).

Elde edilen sonuçlara göre en yüksek enzim üretimi %0,01 oranında CaCl₂ varlığında %13 oranında bir artışla elde edilmiştir. *Bacillus subtilis* E6-5 suşunun enzim üretimi açısından metal kaynağı tercihi sırasıyla %0,01 CaCl₂ > %0,01 CaCl₂ + %0,01 MgSO₄ (Kontrol) > %0,01 BaCl₂ > %0,02 CaCl₂ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.6). Denemeye alınan metal iyonlarının enzim üretimi üzerine inhibitör etki yarattığı özellikle CuSO₄’ın güçlü bir inhibitör etkisinin olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.4).

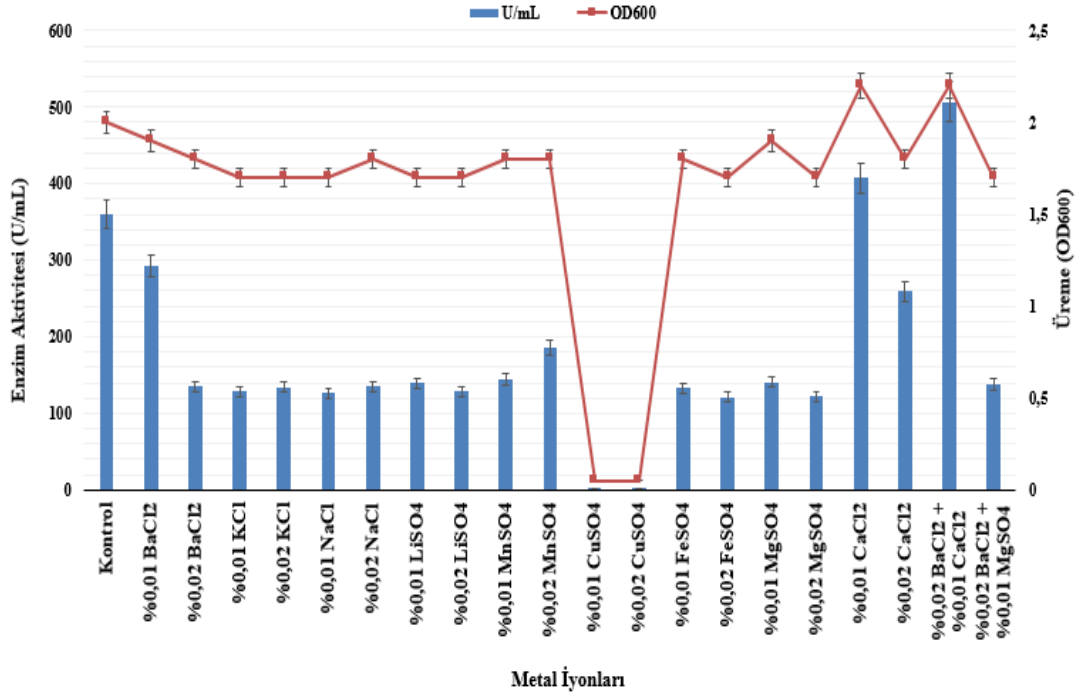
Kontrol temel besi yerinde birlikte bulunan CaCl₂ ve MgSO₄ ayrı ayrı denemeye alındığında, MgSO₄ varlığında enzim üretiminin düştüğü saptanmıştır (Çizelge 4.4).

Bakteri tarafından ikinci tercih edilen %0,01 BaCl₂, %0,01 CaCl₂ ve %0,01 MgSO₄ ile ayrı ayrı tekrar kombine edildiğinde (Çizelge 4.5), %0,01 BaCl₂ + %0,01 CaCl₂ varlığında enzim aktivitesi 507 U/mL olarak saptanmış ve enzim üretiminde %41’lik bir artış saptanmıştır.

Çizelge 4.4. Metal iyonlarının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi.

Metal Kaynakları	% 0,01 Metal İyonu			% 0,02 Metal İyonu		
	OD ₆₀₀	U/mL	Bağlı Aktivite (%)	OD ₆₀₀	U/mL	Bağlı Aktivite (%)
CaCl ₂ + MgSO ₄ *	2,0	360	100	-	-	-
BaCl ₂	1,9	292	81	1,8	135	38
KCl	1,7	129	36	1,7	134	37
NaCl	1,7	126	35	1,8	135	38
LiSO ₄	1,7	139	39	1,7	129	36
MnSO ₄	1,8	144	40	1,8	186	52
CuSO ₄	0,1	1	0,3	0,1	1	0,3
FeSO ₄	1,8	133	37	1,7	121	34
MgSO ₄	1,9	141	39	1,7	122	34
CaCl₂	2,2	407	113	1,8	259	72

*Kontrol ortamı % 0,01 CaCl₂ ve % 0,01 MgSO₄ içermektedir.



Şekil 4.6. Farklı metal iyonlarının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi.

Çizelge 4.5. Kombine metal iyonlarının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi.

Metal İyonları	OD ₆₀₀	U/mL	Bağlı Aktivite (%)
%0,01 CaCl ₂ + %0,01 MgSO ₄ (Kontrol)	2,0	360	100
%0,01 CaCl ₂ + %0,01 CaCl ₂	2,1	259	72
%0,01 BaCl ₂ + %0,01 MgSO ₄	1,8	138	39
%0,01 BaCl₂ + %0,01 CaCl₂	2,2	507	141

4.3. Proteaz Üretimi Üzerine Fiziksel Faktörlerin Etkisi

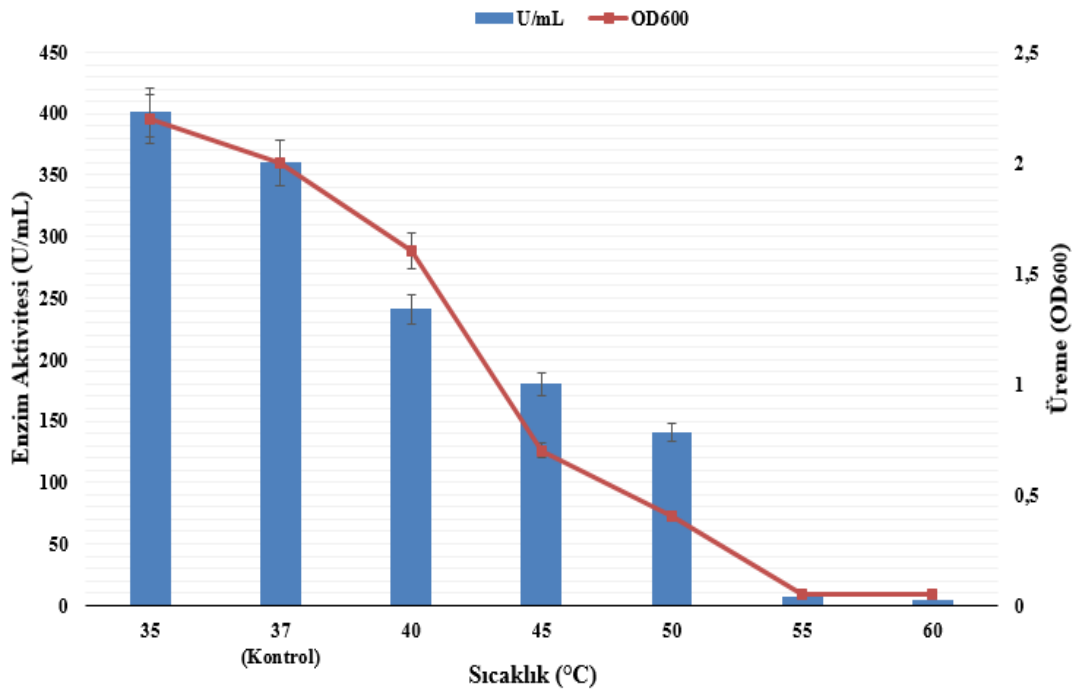
Fiziksel faktörler bakterinin üremesi ve enzim üretimi üzerinde oldukça etkili olduğundan bazı fiziksel parametreler araştırılmıştır.

Sıcaklığın *B. subtilis* E6-5'in üremesi ve proteaz enzim üretimi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla 35, 37 (Kontrol) 40, 45, 50, 55 ve 60 °C sıcaklık değerleri kullanılarak optimum sıcaklık değeri saptanmıştır. Bakteri üretimi 3.2.2'de belirtildiği gibi yapılmış olup, bakteri maksimum enzim üretimin elde edildiği 40 saat süresince inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda alınan örneklerde üreme ve proteaz aktivite

tainleri yapılmıştır (Çizelge 4.6, Şekil 4.7). Yapılan çalışmada maksimum enzim üretiminin 35°C’de olduğu ve bu sıcaklıkta enzim aktivitesinin 401 U/mL olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Kontrol (37°C’de 360 U/mL) ile kıyaslandığında %11’lik bir artışla enzim üretimi elde edilmiştir. Sıcaklığın her 5 derece artması ile bakteri üremesinin orantılı olarak azaldığı ve buna bağlı olarak enzim üretiminin de azaldığı saptanmıştır. Özellikle yüksek sıcaklıklarda gerek üremede gerekse enzim üretiminde dramatik düşüşler görülmüştür (Çizelge 4.6, Şekil 4.7).

Çizelge 4.6. Sıcaklık değerinin üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi.

Sıcaklık Değeri (°C)	OD ₆₀₀	U/mL	Bağlı Aktivite (%)
35	2,2	401	111
37 (Kontrol)	2,0	360	100
40	1,6	241	67
45	0,7	180	50
50	0,4	141	39
55	0,1	7	2
60	0,1	5	1

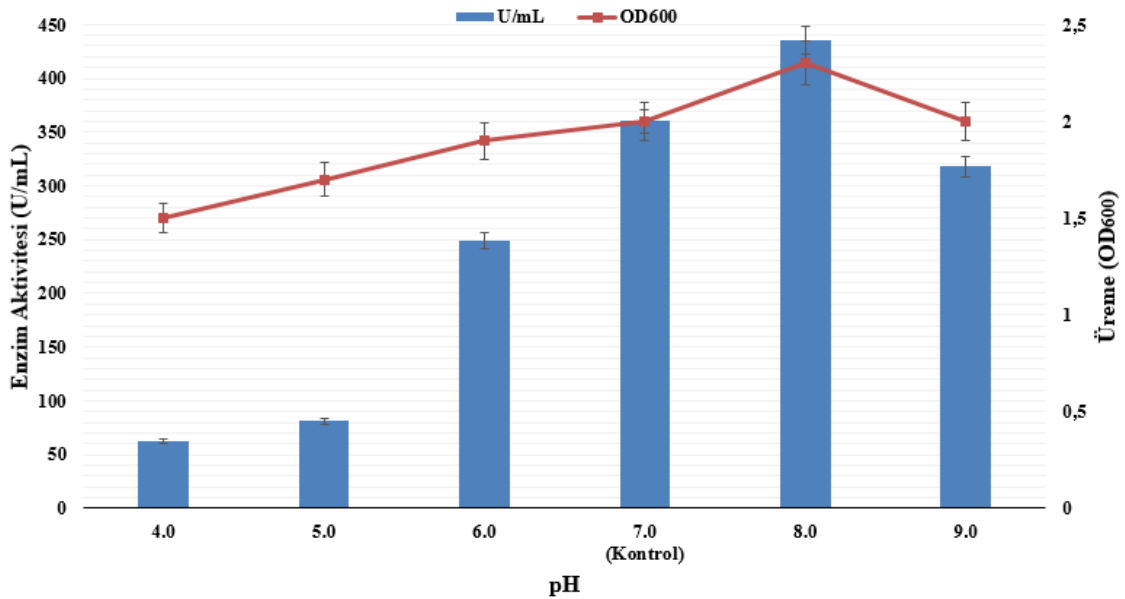


Şekil 4.7. Sıcaklık değerinin üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi.

pH'nın bakteri üremesi ve enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 (Kontrol), 8.0 ve 9.0 pH değerleri kullanılarak optimum pH değeri saptanmıştır. Bakteri üretimi 3.2.2'de belirtildiği gibi yapılmış olup, bakteri maksimum enzim üretimin elde edildiği 40 saat süresince inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda alınan örneklerde üreme ve proteaz aktivite tayinleri yapılmıştır (Çizelge 4.7, Şekil 4.8). Yapılan çalışmada maksimum bakteri üremesi ve enzim üretiminin pH 8.0'de elde edildiği ve bu pH'da enzim üretiminin kontrole göre %21 oranında arttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.7). Düşük pH'larda ise üreme saptanmış, ancak enzim üretiminde oldukça fazla düşüşler gözlenmiştir.

Çizelge 4.7. pH değerinin üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi.

pH Değeri	OD ₆₀₀	U/mL	Bağlı Aktivite (%)
4.0	1,5	62	17
5.0	1,7	81	23
6.0	1,9	249	69
7.0 (Kontrol)	2,0	360	100
8.0	2,3	435	121
9.0	2,0	318	88

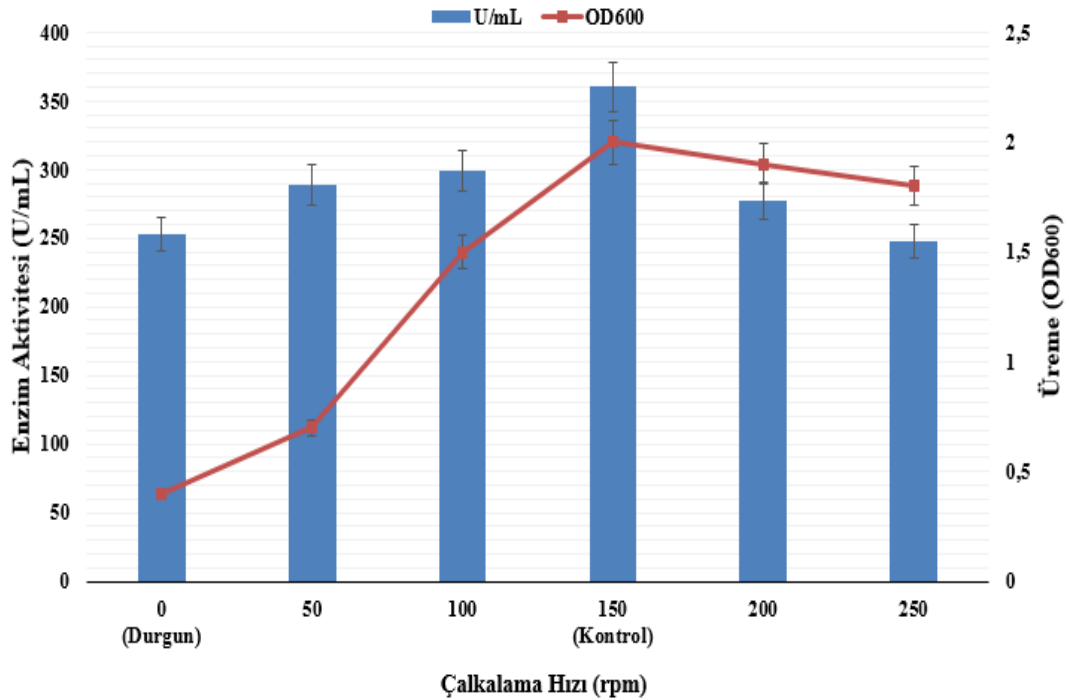


Şekil 4.8. pH değerlerinin üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi.

Havalandırmanın bakteri üremesi ve enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla inkübatörün çalkalama hızı 0, 50, 100, 150 (Kontrol), 200 ve 250 rpm şeklinde değiştirilmesi ile optimum rpm değeri saptanmıştır. Bakteri üretimi 3.2.2’de belirtildiği gibi yapılmış olup, bakteri maksimum enzim üretimin elde edildiği 40 saat süresince inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda alınan örneklerde üreme ve proteaz aktivite tayinleri yapılmıştır (Çizelge 4.8, Şekil 4.9). Yapılan çalışmada en yüksek enzim üretimi için gerekli çalkalama hızı kontrol olarak kullanılan 150 rpm olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.9). Bu değer altında ve üstündeki rpm’lerde enzim üretimleri gözlenmiş ancak yüksek miktarda bir artış olmamıştır. Düşük rpm’lerde enzim üretimi ile bakteri üremesinin paralel olmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.8. Çalkalama hızının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi.

Çalkalama Hızı (rpm)	OD ₆₀₀	U/mL	Bağlı Aktivite (%)
0 (Durgun)	0,4	253	70
50	0,7	289	80
100	1,5	299	83
150 (Kontrol)	2,0	360	100
200	1,9	277	77
250	1,8	248	69

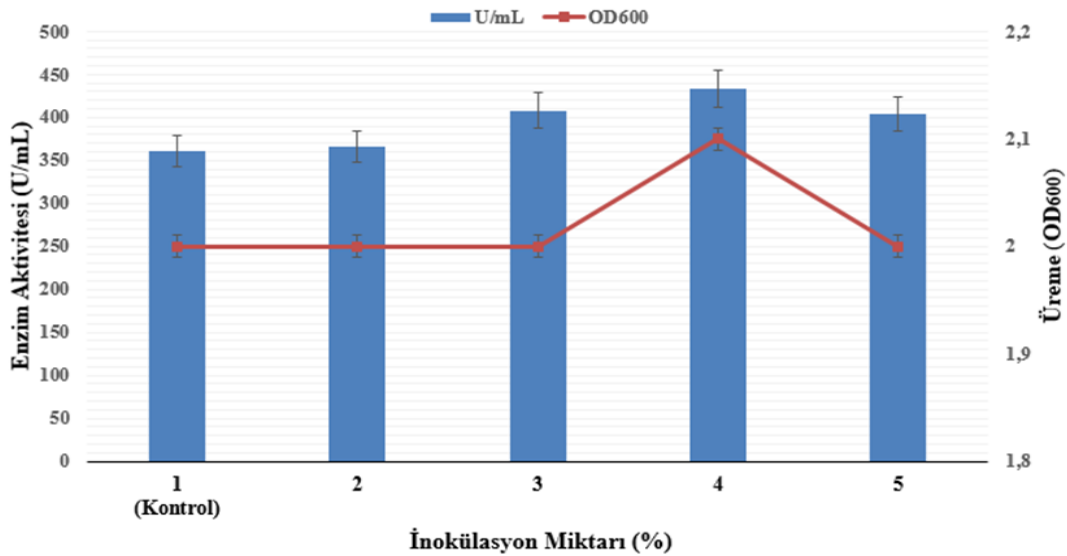


Şekil 4.9. Çalkalama hızının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi.

İnokülasyon miktarının bakteri üremesi ve proteaz üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, bakterinin optik yoğunluğu OD₆₀₀ 0,3 olan ön inkübasyon kültüründen % 1 (Kontrol), 2, 3, 4 ve 5 kullanılarak optimum inokülasyon miktarı saptanmıştır. Bakteri üretimi 3.2.2’de belirtildiği gibi yapılmış olup, bakteri maksimum enzim üretimin elde edildiği 40 saat süresince inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda alınan örneklerde üreme ve proteaz aktivite tayinleri yapılmıştır (Çizelge 4.9, Şekil 4.10). Yapılan çalışmada maksimum enzim üretiminin elde edildiği inokülasyon miktarı %4 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.9, Şekil 4.10). Enzim üretimi kontrole göre %20 oranında bir artış göstermiştir. Ayrıca %3 inokülasyonda % 13’lük ve % 5 inokülasyonda ise %12’lik bir enzim üretim artışı saptanmıştır (Çizelge 4.9). Yüksek inokülasyon miktarının enzim üretimde etkili olduğu, ancak bakteri üretimde fazla bir etkisinin olmadığı ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4.9. İnokülasyon miktarının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi.

İnokülasyon Miktarı (%)	OD ₆₀₀	U/mL	Bağıl Aktivite (%)
1 (Kontrol)	2,0	360	100
2	2,0	366	102
3	2,0	408	113
4	2,1	433	120
5	2,0	404	112

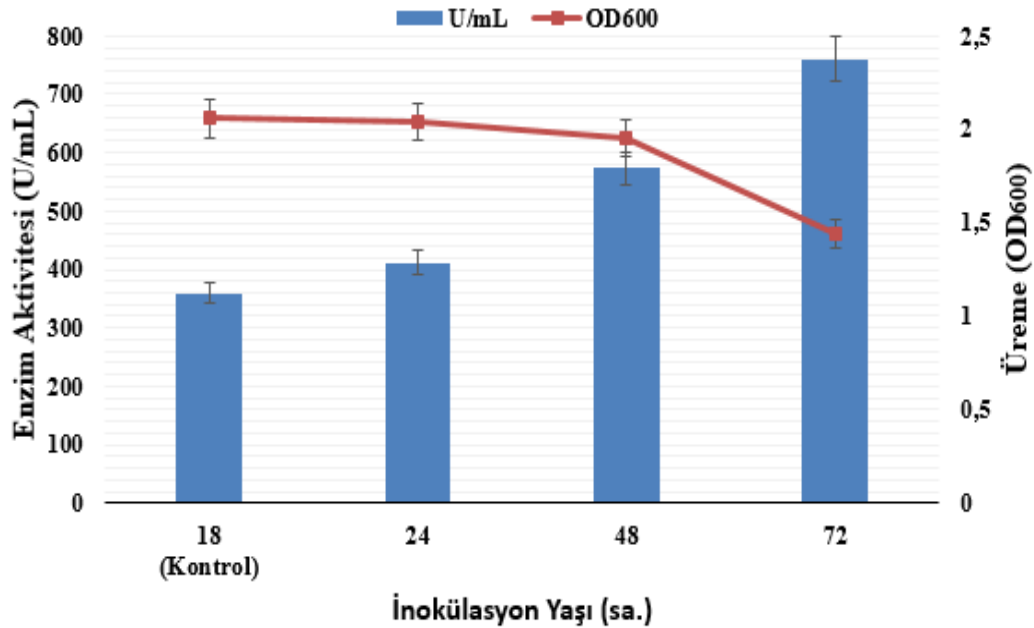


Şekil 4.10. İnokülasyon miktarının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi.

İnokülasyon yaşının bakteri üremesi ve enzim üretimi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla bakterilerin 18 (Kontrol), 24, 48 ve 72 saat şeklindeki inokülüm yaşları kullanılarak optimum inokülasyon yaşı saptanmıştır. Bakteri üretimi 3.2.2’de belirtildiği gibi yapılmış olup, bakteri maksimum enzim üretimin elde edildiği 40 saat süresince inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda alınan örneklerde üreme ve proteaz aktivite tayinleri yapılmıştır (Çizelge 4.10, Şekil 4.11). Yapılan çalışmada maksimum enzim üretiminin elde edildiği inokülasyon süresi 72. saat olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.10, Şekil 4.11). Bu inokülasyon süresinde enzim üretimi kontrolün 2,1 katına çıkmıştır (Çizelge 4.10). Denemeye alınan tüm inokülasyon yaşlarında yüksek enzim üretimi saptanırken, bakteri üremesi ile paralel olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. İnokülasyon yaşının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi.

İnokülasyon Yaşı (Saat)	OD ₆₀₀	U/mL	Bağıl Aktivite (%)
18 (Kontrol)	2,0	360	100
24	2,0	411	114
48	1,9	573	159
72	1,4	760	211



Şekil 4.11. İnokülasyon yaşının üreme ve proteaz üretimi üzerine etkisi.

4.4. Modifiye Ortamda Bakteri Üremesi ve Enzim Üretimi

En yüksek proteaz üretiminin saptandığı besinsel (karbon ve azot kaynakları, metal iyonları) ve fiziksel faktörler (pH, sıcaklık, çalkalama hızı, inokülasyon yaşı, inokülasyon miktarı) bir araya getirilerek yeni bir modifiye ortam oluşturulmuştur. Bu ortamda enzim veriminin artırılması yoluna gidilmiştir.

Karbon kaynağı olarak %0,1 Sükroz, azot kaynağı olarak %1,02 Tripton ve metal iyonu olarak %0,01 BaCl₂ ve %0,01 CaCl₂ kullanılarak, inokülasyon yaşı 72 saat olan kültürden %4 oranında aşılama yapılmış ve üretim 35°C, pH 8.0, 150 rpm'de 40 saat boyunca yapılmıştır (Çizelge 4.11). Yapılan çalışma sonucunda modifiye ortamda enzim aktivitesi 1810 U/mL olarak saptanmıştır. Bu ortamdan elde edilen değer kontrol (360 U/mL) ile kıyaslandığında 5 kat enzim üretimi elde edilmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Bazal ve modifiye ortamın kapasitesinin karşılaştırılması.

Bazal Ortam (Gököz 2016)	U/mL	OD ₆₀₀	Modifiye Ortam	U/mL	OD ₆₀₀
%0,1 Gliserol	360	2,0	%0,1 Sükroz	1810	1,2
%1,02 Tripton			%1,02 Tripton		
% 0,01 CaCl ₂			%0,01 CaCl ₂		
% 0,01 MgSO ₄			% 0,01 BaCl ₂		
%0,05 K ₂ HPO ₄			%0,05 K ₂ HPO ₄		
pH 7.0			pH 8.0		
37°C			35°C		
150 rpm			150 rpm		
%1 Aşılama			%4 Aşılama		
Ön İnkübasyon 18 sa.			Ön İnkübasyon 72 sa.		

4.5. *Bacillus subtilis* E6-5 Proteaz Enziminin Saflaştırılması

Proteaz enziminin saflaştırılması amacıyla bakteri modifiye ortamda üretilmiştir. Bakteri üretimi 3.2.2’de belirtildiği gibi yapılmış olup, bakteri maksimum enzim üretimin elde edildiği 40 saat süresince üretilmiştir. Üretim sonunda kültür ortamı +4 °C’de soğutmalı santrifüjde 6000 rpm’de 15 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant ham enzim çözeltisi olarak kullanılmıştır. Ham enzim çözeltisi sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi olmak üzere 4 adımda saflaştırılmıştır. Saflaştırma adımlarında elde edilen fraksiyonlarda enzim aktivite ve protein tayini yapılmıştır. Saflık ise SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir.

%80’lik amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda elde edilen solüsyon 10 000 rpm’de ve +4 °C’de 30 dk. boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet 0,05 M sodyum-fosfat (pH 7.0) tamponunda çözülmüş ve diyaliz tüpüne konularak 1 gece boyunca aynı tampona karşı +4°C’de diyaliz edilmiştir. Amonyum sülfat tuzlarının tamamen uzaklaşıp uzaklaşmadığının tespiti ise 3.2.9’da belirtilen şekilde yapılmıştır. Diyalizat ultrafiltrasyon tüpü ile santrifüj edilerek konsantre edilmiştir. Elde edilen konsantre örnek, proteinlerin moleküler büyüklüğüne göre ayrılmasını sağlayan jel filtrasyonuna uygulanmıştır. Jel aynı tamponla elüe edilerek ve 2 mL’lik fraksiyonlar halinde toplanmış ve fraksiyonların hem SDS-PAGE elektroforezi gerçekleştirilerek saflıkları kontrol edilmiş hem de enzim aktivite tayini yapılmıştır. Saflık ve enzim aktivitesi gösteren fraksiyonlar bir araya toplanmıştır. Proteaz enziminin saflaştırma basamakları çizelge 4.12’de verilmiştir. Enzim 6,1 kez saflaştırılmıştır.

Çizelge 4.12. Proteaz enziminin saflaştırma basamakları.

Saflaştırma Basamağı	Hacim (mL)	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim ¹ (%)	Saflık ² (Kez)
Ham enzim	100	181 000	353	512	100	1
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	15	56 475	53	1 059	31,2	2,1
Diyaliz	14	48 874	32	1 507	27	2,9
Ultrafiltrasyon	5	36 825	16	2 271	20,3	4,4
Jel Filtrasyon Kromatografisi Sephadex® G-75	6	29 168	9	3 122	16,1	6,1

¹Verim, toplam aktivite üzerinden hesaplanmıştır.

²Saflık, spesifik aktivite üzerinden hesaplanmıştır.

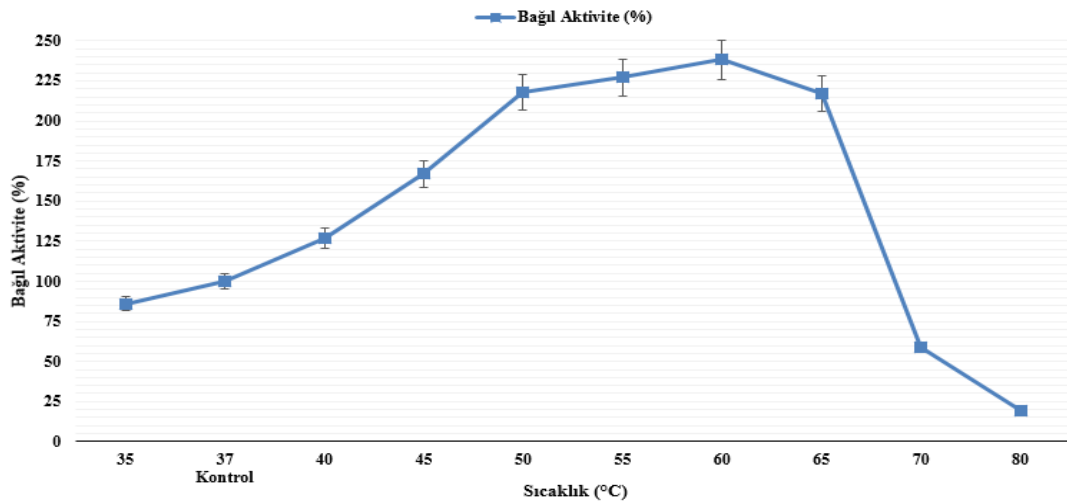
4.6. Saf Enzimin Karakterizasyonu

4.6.1. Saf enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi ve sıcaklık stabilitesi

Saf proteaz üzerine sıcaklık derecelerinin etkilerini belirlemek için 35, 37 (Kontrol), 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80 °C’lerde aktivite tayini yapılmış ve enzimin optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan 37°C sıcaklık derecesindeki sonuç %100 kabul edilerek, farklı sıcaklıklardaki aktivite değerleri % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır. Enzimin optimum sıcaklığı 60°C olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.13, Şekil 4.12). Bu sıcaklık değerinde saf enzimin aktivitesi ham enzimin aktivitesinin 2,38 katına çıkmıştır. 40-65 °C arası yüksek sıcaklıklarda enzim aktivite değerlerinde artış görülmüştür. 70 ve 80 °C’de ise enzimin denatüre olmuştur.

Çizelge 4.13. Sıcaklığın proteaz aktivitesi üzerine etkisi.

Sıcaklık Değeri (°C)	Bağıl Aktivite (%)
35	86
37 (Kontrol)	100
40	127
45	167
50	218
55	227
60	238
65	217
70	59
80	19

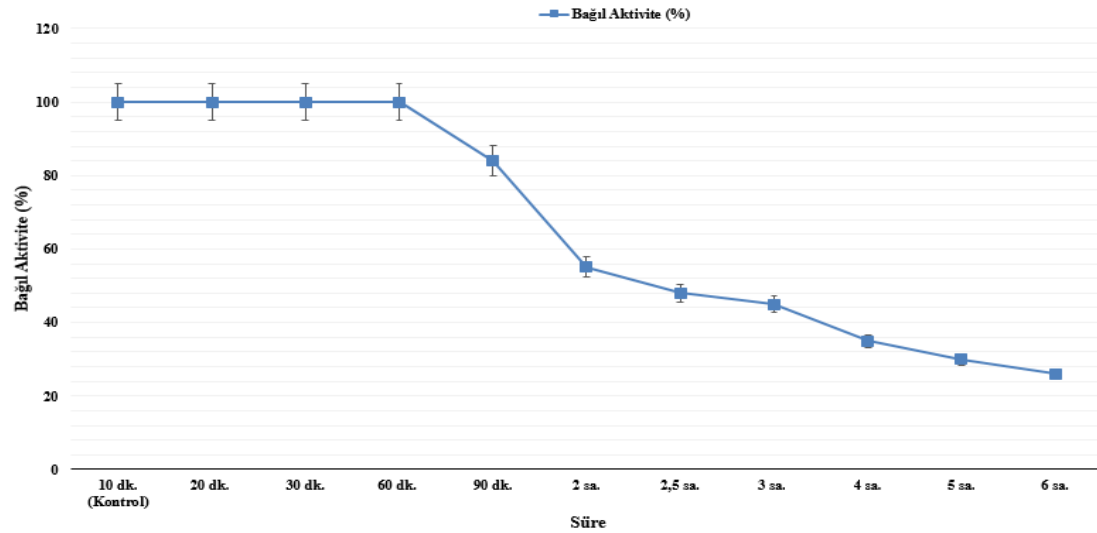


Şekil 4.12. Sıcaklığın proteaz aktivitesi üzerine etkisi.

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği 60°C’de stabilitesine bakılmış ve enzim çözeltisi su banyosunda 10 dk. (Kontrol), 20 dk., 30 dk., 60 dk., 90 dk., 2 sa., 2,5 sa., 3 sa., 4 sa., 5 sa. ve 6 sa. süre ile tutulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre saf enzimin 60. dakikaya kadar aktivitesini koruduğu saptanmıştır. Sürenin artması ile enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Ayrıca enzimin 90. dakika sonunda aktivitesinin %84’ünü koruduğu saptanmıştır (Çizelge 4.14, Şekil 4.13). Sürenin artması ile enzim aktivitesini kademeli olarak kaybetmiştir.

Çizelge 4.14. Proteaz enziminin sıcaklık stabilitesi.

İnkübasyon Süresi (dk. - sa.)	Bağlı Aktivite (%)
10 dk. (Kontrol)	100
20 dk.	100
30 dk.	100
60 dk.	100
90 dk.	84
2 sa.	55
2,5 sa.	48
3 sa.	45
4 sa.	35
5 sa.	30
6 sa.	26



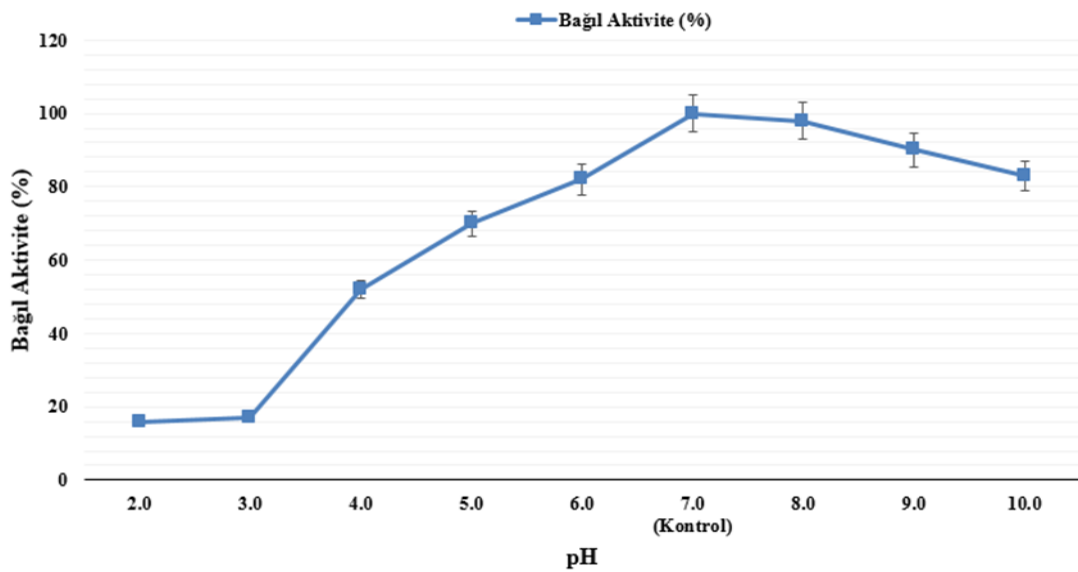
Şekil 4.13. Proteaz enziminin sıcaklık stabilitesi.

4.6.2. Saf enzim aktivitesi üzerine pH değerinin etkisi ve pH stabilitesi

Saf proteaz enziminin aktivitesi üzerine pH değerinin etkisinin araştırılması için pH'sı 2.0-10.0 olan substrat çözeltileri kullanılarak aktivite tayin edilmiştir. Yapılan çalışmalar sırasında pH 7.0'de elde edilen sonuçlar kontrol olarak kabul edilmiş ve diğer sonuçlar buna göre % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.15 ve Şekil 4.14'te görüldüğü gibi enzimin optimum pH değerinin 7.0 olduğu belirlenmiştir. Enzimin pH 8.0 ve 9.0 değerlerinde de aktivitesini yüksek oranda koruduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.15. pH'nın proteaz aktivitesi üzerine etkisi.

pH Değeri	Bağıl Aktivite (%)
2.0	16
3.0	17
4.0	52
5.0	70
6.0	82
7.0 (Kontrol)	100
8.0	98
9.0	90
10.0	83

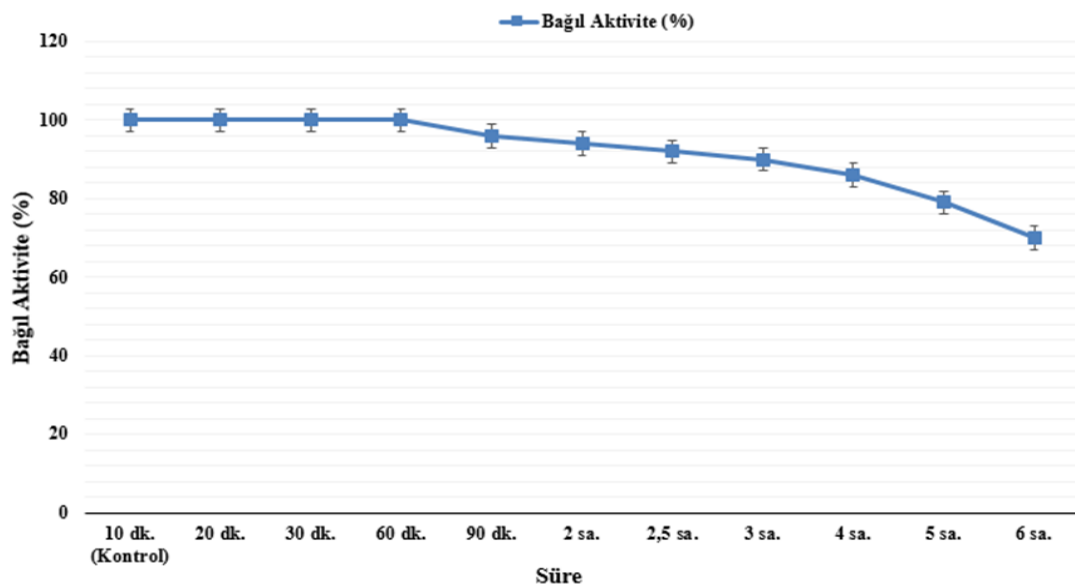


Şekil 4.14. pH'nın proteaz aktivitesi üzerine etkisi.

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH 7.0’de stabilitesine bakılmış ve enzim çözeltisi su banyosunda 10 dk. (Kontrol), 20 dk., 30 dk., 60 dk., 90 dk., 2 sa., 2,5 sa., 3 sa., 4 sa., 5 sa. ve 6 sa. süre ile inkübe edilmiştir. Enzim 60 dk. boyunca aktivitesini korurken, sürenin artması ile enzim aktivitesinde oransal bir düşüş gözlenmiştir. Buna ek olarak 4 saat sonunda ise aktivitesinin %85’ini, 6 saat sonunda ise %70’ini koruduğu saptanmıştır (Çizelge 4.16, Şekil 4.15).

Çizelge 4.16. Proteaz enziminin pH stabilitesi.

İnkübasyon Süresi (dk.- sa.)	Bağlı Aktivite (%)
10 dk. (Kontrol)	100
20 dk.	100
30 dk.	100
60 dk.	100
90 dk.	96
2 sa.	94
2,5 sa.	92
3 sa.	90
4 sa.	86
5 sa.	79
6 sa.	70



Şekil 4.15. Proteaz enziminin pH stabilitesi.

4.6.3. Saf enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi

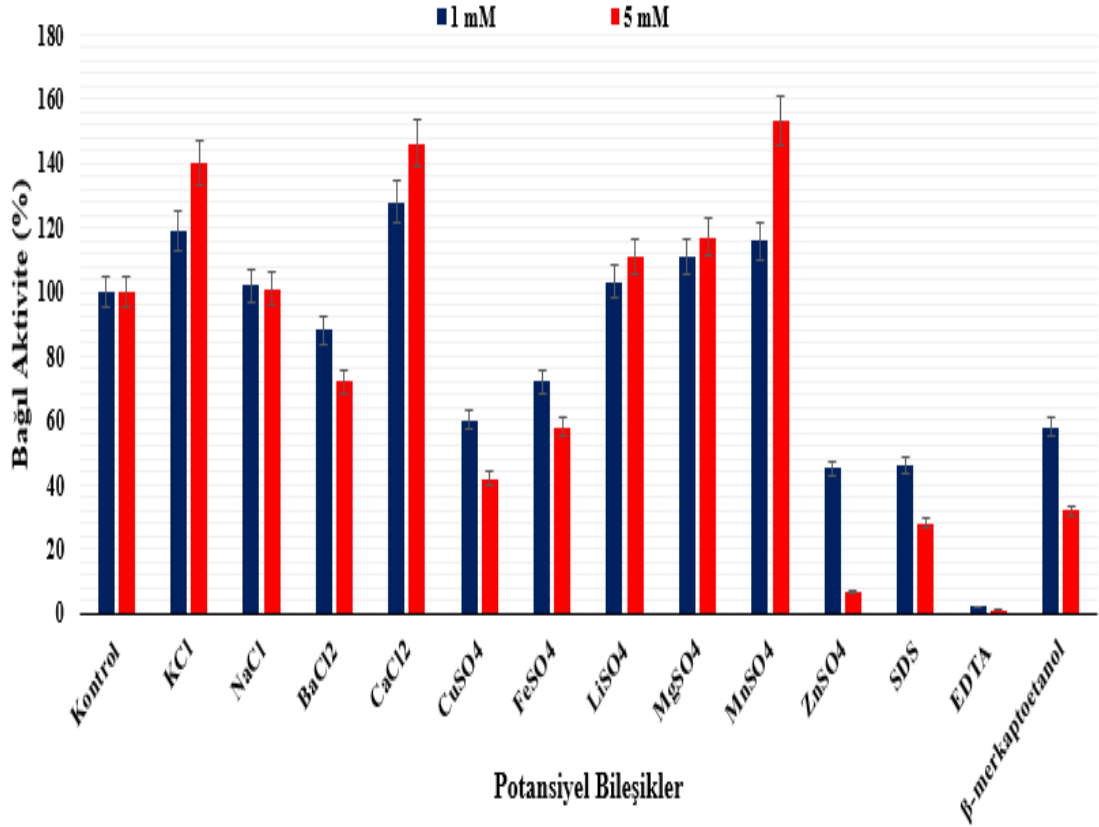
Saf proteaz enziminin aktivitesi üzerine metal iyonu, tuz ve redükleyici bileşiklerin etkisini saptamak amacıyla enzimin 1 ve 5 mM olacak şekilde $MnSO_4$, $MgSO_4$, $FeSO_4$, $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $CaCl_2$, $LiSO_4$, $BaCl_2$, $NaCl$, KCl , SDS , $EDTA$, 2- β -merkaptoetanol ile inkübe edilerek aktivite tayini yapılmıştır. Aktiviteleri % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır.

5 mM konsantrasyonundaki potansiyel bileşikleri varlığında enzim aktivitesinin 1 mM'a göre daha fazla arttığı saptanmıştır. $MnSO_4$, $CaCl_2$, ve KCl bileşiklerinin enzim aktivitesi üzerine etkili bir şekilde aktivatör etki yaptığı ve enzim aktivitesini sırasıyla, %53, %46 ve %40 oranında arttırdığı belirlenmiştir. $ZnSO_4$ ve anyonik bir deterjan olan SDS ve şelatlayıcı ajan $EDTA$ ise enzim aktivitesini inhibe etmiştir (Çizelge 4.17, Şekil 4.16).

Çizelge 4.17. Enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi.

Potansiyel Bileşik	Bağıl Aktivite (%)	
	1 mM	5 mM
Kontrol*	100	100
KCl	119	140
NaCl	102	101
$BaCl_2$	88	72
$CaCl_2$	128	146
$CuSO_4$	60	42
$FeSO_4$	72	58
$LiSO_4$	103	111
$MgSO_4$	111	117
$MnSO_4$	116	153
$ZnSO_4$	45	7
SDS	46	28
EDTA	2	1
2- β -merkaptoetanol	58	32

* Kontrol potansiyel bileşik içermemektedir.



Şekil 4.16. Enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi.

4.6.4. Kinetik parametreler

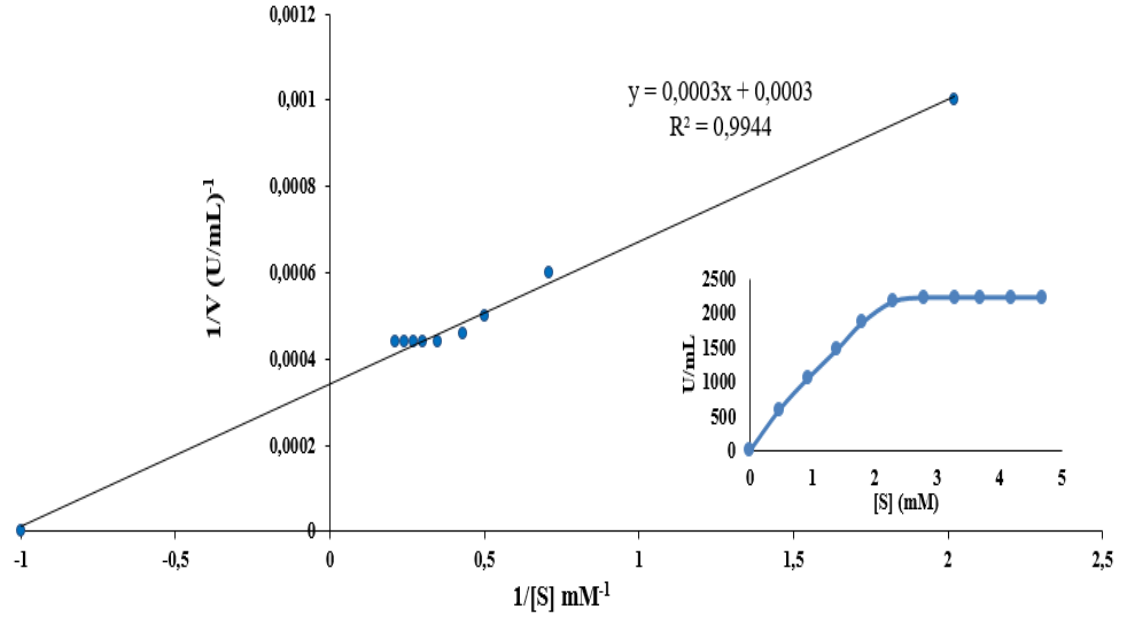
Saf proteaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kazein çözeltileri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk denklemi grafiği ile tespit edilmiştir. Enzim aktivitesi standart deney koşullarında ölçülmüştür (Çizelge 4.18).

Proteazın maksimum hızını (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitesini (K_m) saptamak için, $1/[S]$ 'e karşı $1/V$ olacak şekilde Lineweaver-Burk $y = ax + b$ doğrusu grafiğinden yararlanıldı (Şekil 4.17). Bu grafikten elde edilen doğrunun denklemi ise $y = 0,0003 x + 0,0003$ olarak, tamamlayıcılık katsayısı (R^2) ise $R^2 = 0,9944$ olarak saptanmıştır.

Denkleminde doğrunun dikey eksenini kestiği nokta $1/V_{max}$ değerini verdiğinden, $1/V_{max}$ değeri 0,0003 olarak bulunmuş dolayısıyla V_{max} değeri 3333 U/mL olarak hesaplanmıştır. Denkleminde doğrunun yatay eksenini kestiği nokta $-1/K_m$ değerini verdiğinden, $-1/K_m$ değeri -1 olarak bulunmuş dolayısıyla K_m değeri 1 mM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.17).

Çizelge 4.18. Enzimin aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi.

Substrat Derişimi (mM)	Enzim Aktivitesi (U/mL)
0	0
0,47	590
0,94	1059
1,4	1468
1,8	1855
2,3	2166
2,8	2226
3,3	2226
3,7	2226
4,2	2226
4,7	2226



Şekil 4.17. Proteaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk ve Michaelis-Menten Grafığı).

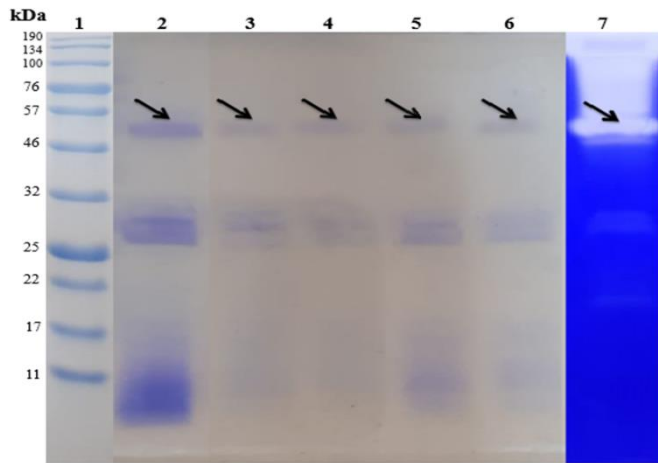
4.6.5. Moleküler ağırlığın tespiti

Saf proteaz enziminin moleküler ağırlığını belirlemek amacıyla, elektroforez jeline enzim örneği yanında moleküler ağırlıkları bilinen standart protein çözeltisi de uygulanmış ve elektroforez işlemi sonucunda oluşan bantların (Şekil 4.18) göreceli hareketlilik değerleri (Rf) hesaplanmıştır. Standart protein çözeltisi olarak Prestained Protein Marker (11-190 kDa, Cell Signaling Technology, USA) kullanılmıştır.

$$Rf = \frac{\text{Proteinin aldığı yol (cm)}}{\text{İzleme boyasının aldığı yol (cm)}}$$

Standart proteinlerin göreceli hareketlilik değerleri ve molekül ağırlıkları ile standart bir eğri grafiği elde edilmiştir (Şekil 4.18). Elde edilen grafiğin analizi yapılarak, örneğin moleküler ağırlığı saptanmıştır. Ham enzim, Amonyum sülfat çöktürmesi, Diyalizat, Ultrafiltrasyon ve Jel filtrasyon kromatografisi sonucunda adım adım saflaştırılan enzim örneğinin molekül ağırlığının aynı olduğu, Şekil 4.18'de görüldüğü gibi tek bir bant halinde bir sırada yerleştiği saptanmıştır. Koyu bant halinde görülen enzimin moleküler ağırlığının ise yaklaşık 51.5 kDa olduğu tespit edilmiştir.

Diğer yandan enzimin zimogram analizi substrat (jelatin) içeren SDS-PAGE ile gerçekleştirilmiştir. Proteolitik hidrolizin olduğu bantlar, zimogram jellerinde boyanmamış bölgeler olarak görüntülenmiştir. Zimogram analizi güçlü proteolitik aktivitenin 51.5 kDa ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Ancak zimogram üzerinde silik olarak çoklu bantlar da tespit edilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. SDS-PAGE ve zimogram analizi jellerinin profili.

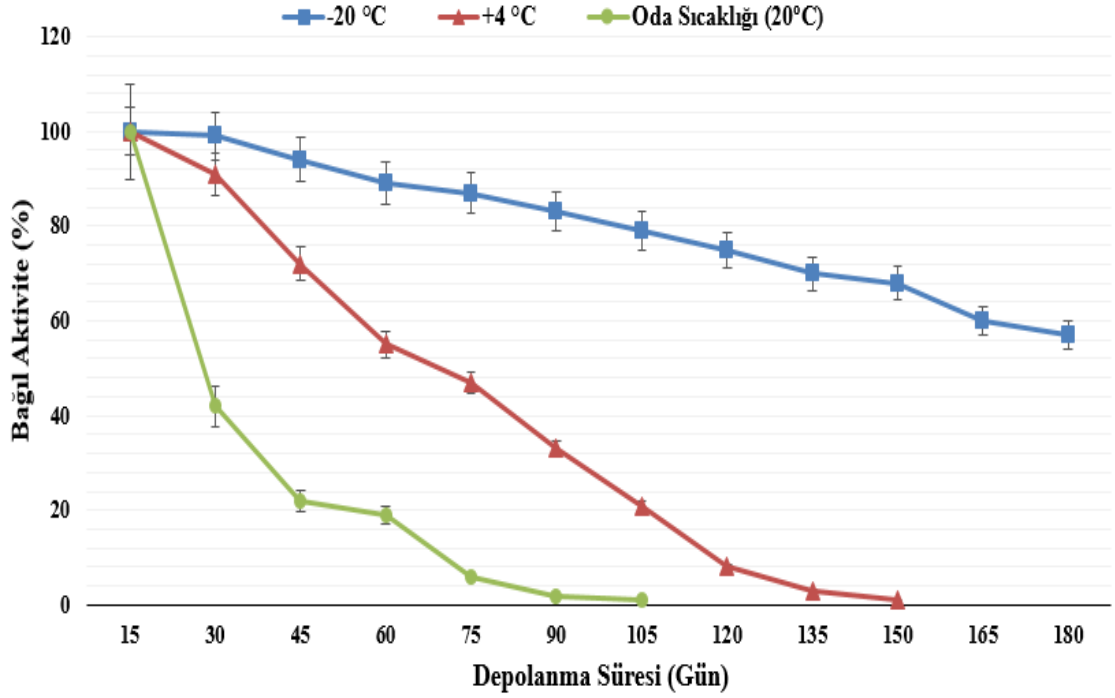
1. Standart proteinler (Marker), **2.** Ham enzim, **3.** Amonyum sülfat çöktürmesi pelleti, **4.** Diyalizat, **5.** Ultrafiltrasyon, **6.** Jel filtrasyon kromatografisi, **7.** Zimogram analizi.

4.7. Ham Enzimin Depolanma Stabilitesinin Belirlenmesi

Ham enzimin depolanma sıcaklığını saptamak üzere bakteriden üretilen ham enzimin aktivitesi tayin edildikten sonra enzim örnekleri 50 mL olacak şekilde oda sıcaklığında (RT) , +4 °C’de ve -20 °C’de olmak üzere 3 gruba ayrılmış ve her 15 günde bir aktivitelere bakılarak depolanma stabilitesi belirlenmiştir. Ham enzimin ilk aktivitesi % 100 olarak kabul edilerek % bağıl aktiviteler hesaplanmıştır (Çizelge 4.19, Şekil 4.19). Yapılan çalışmada -20 °C’de depolanan enzimin aktivitesinin 3. ay sonunda % 83’ünü, 6. ay sonunda ise % 57’sini koruduğu tespit edilmiştir. +4 °C’de depolanan enzimin aktivitesinin 2. ay sonunda % 55’ini, 3. ay sonunda ise % 33’ünü koruduğu belirlenmiştir. Oda sıcaklığında depolanan enzimin ise aktivitesinin 1. ay sonunda % 42’sini korunduğu saptanmıştır. Ayrıca oda sıcaklığında 3 ay 15 günde; +4°C’de ise 5. ayda enzimin inhibe olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.19, Şekil 4.19).

Çizelge 4.19. Ham enzim depolanma stabilitesi.

Zaman (Gün)	-20 °C	+4 °C	Oda Sıcaklığı (RT)
	Bağıl Aktivite (%)	Bağıl Aktivite (%)	Bağıl Aktivite (%)
15	100	100	100
30	99	91	42
45	94	72	22
60	89	55	19
75	87	47	6
90	83	33	2
105	79	21	-
120	75	8	-
135	70	3	-
150	68	-	-
165	60	-	-
180	57	-	-



Şekil 4.19. Ham enzim depolanma stabilitesi.

4.8. Deriden Kıl Giderimi (Dehairing)'nde Proteaz Potansiyelinin Araştırılması

Yeni izolat *B. subtilis* E6-5 suşundan üretilen ham ve konsantre edilen proteaz enziminin keçi, koyun ve dana deri örneklerindeki kılları giderme potansiyeli araştırılmıştır. Diğer yandan kimyasal madde kullanılarak da kıl giderme işlemi yapılmış ve sonuçlar enzimatik işlem ile karşılaştırılmıştır.

Bu amaçla dana, koyun ve keçi derileri kullanılmıştır. 3.2.19'da belirtilen enzimatik ve kimyasal işlemler gerçekleştirilmiştir. Enzimatik kıl gideriminde, aktivitesi 1810 U/mL olan ham enzim ve aktivitesi 6809 U/mL olan konsantre enzim kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.20'de verilmiştir.

Yapılan çalışmalarda dana, koyun ve keçi deri örneklerinin hepsinde ortak bir durum gözlenmiştir. Enzim uygulaması ile kılları giderilmiş olan derilerin hepsinin kimyasal uygulaması ile kılları giderilmiş olan derilere göre daha yumuşak, ipeksi, esnek, beyaz ve lekesiz olduğu saptanmıştır. Kimyasal madde ile muamele edilmiş derilerin ise çok sert, sıkı ve kılları çekilirken tam olarak kökten gelmediği için koyu renkli ve pek temiz olmayan bir yüzeye sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.20, Şekil 4.21 ve 4.22).

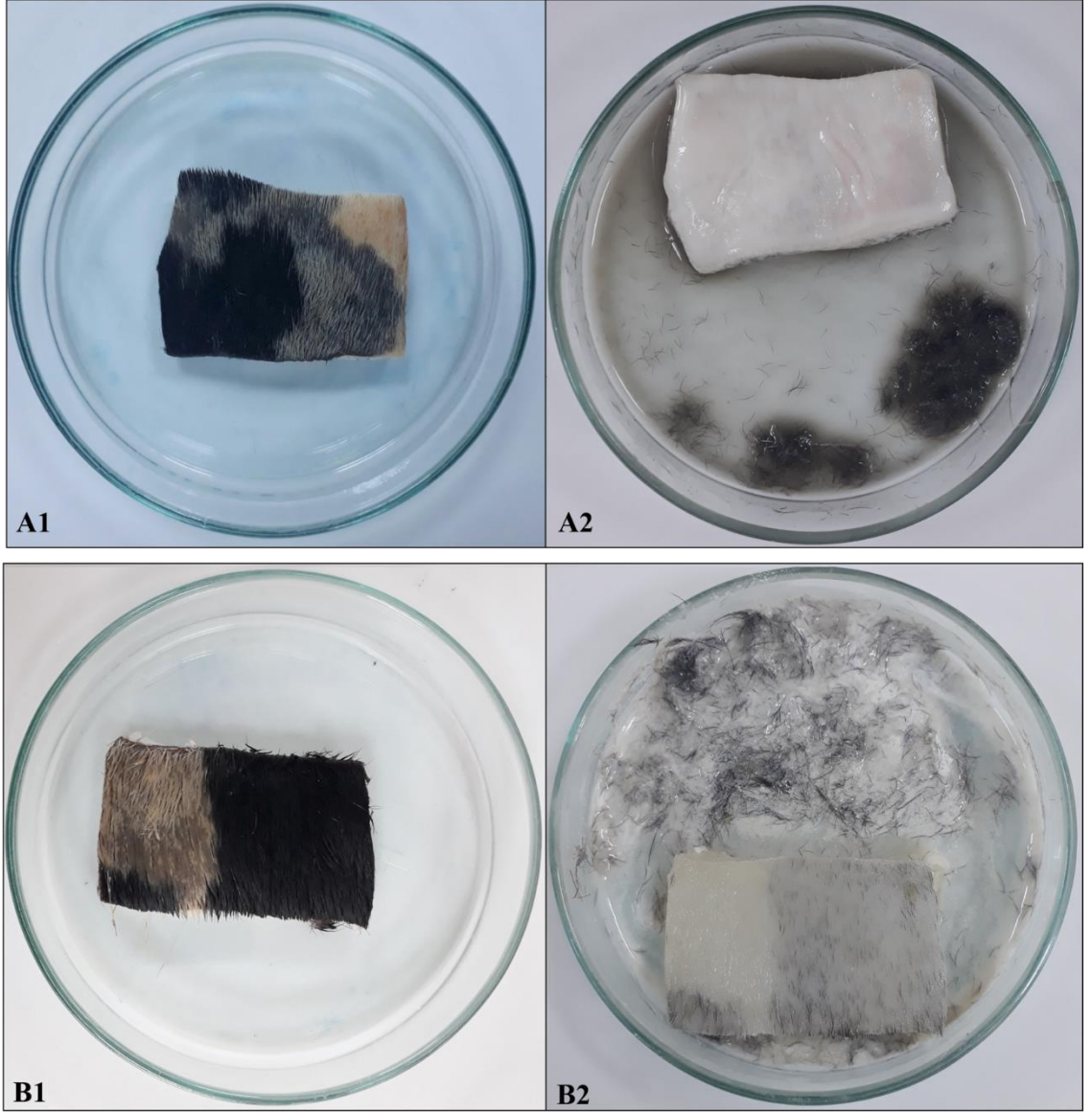
Çizelge 4.20’de belirtildiği gibi dana derisinde konsantre enzim kullanımı ile kılların 6. saate dökülmeye başladığı ve 24. saatte tamamen döküldüğü saptanırken, kimyasal işlemde ise yine 6. saatte kılların dökülmeye başladığı ancak tamamen dökülmenin 42. saate gerçekleştiği belirlenmiştir. Ham enziminde etkili olduğu ancak kıl dökme süresinin uzadığı gözlenmiştir. Enzim ile kılları giderilmiş olan dana derisinin daha beyaz, lekesiz olduğu, kimyasal işlem uygulanmış olan dana derisinin ise koyu renkli ve pek temiz olmayan bir yüzeye sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.20).

Çizelge 4.20’de belirtildiği gibi keçi derisinde konsantre enzim kullanımı ile kılların 12. saate dökülmeye başladığı ve 18. saatte tamamen döküldüğü saptanırken, kimyasal işlemde ise yine 12. saatte kılların dökülmeye başladığı ancak tamamen dökülmenin 36. saate gerçekleştiği belirlenmiştir. Ham enziminde etkili olduğu ancak kıl dökme süresinin uzadığı gözlenmiştir. Enzim ile kılları giderilmiş olan keçi derisinin daha beyaz olduğu, kimyasal işlem uygulanmış olan keçi derisinin ise kırık beyaz olduğu Şekil 4.21’de görülmektedir. Örneklerin her ikisinin de uygulama öncesinde 3x5 cm² olduğu dikkate alındığında enzim kullanılan derinin yapısının açıldığı, kimyasal kullanılan derinin ise yapısının sıkılaşmış küçüldüğü keçi derisinde net bir biçimde görülmektedir.

Çizelge 4.20’de belirtildiği gibi koyun derisinde konsantre enzim kullanımı ile kılların 12. saate dökülmeye başladığı ve 24. saatte tamamen döküldüğü saptanırken, kimyasal işlemde ise yine 12. saatte kılların dökülmeye başladığı ancak tamamen dökülmenin 42. saate gerçekleştiği belirlenmiştir. Ham enziminde etkili olduğu ancak kıl dökme süresinin uzadığı gözlenmiştir. Enzim ile kılları giderilmiş olan koyun derisi ve kimyasal işlem uygulanmış koyun derisi ise Şekil 4.22’de görülmektedir. Örneklerin her ikisinin de uygulama öncesinde 3x5 cm² olduğu dikkate alındığında enzim kullanılan derinin yapısının açıldığı, kimyasal kullanılan derinin ise yapısının sıkılaşmış küçüldüğü koyun derisinde net bir biçimde görülmektedir.

Çizelge 4.20. Enzimatik ve kimyasal işlemler ile kıl giderim süresinin belirlenmesi.

Süre (Saat)	Enzimatik İşlem						Kimyasal İşlem		
	Ham Enzim (1810 U/mL)			Konsantre Enzim (6809 U/mL)			Kireç ve Sodyum Sülfür		
	Dana	Keçi	Koyun	Dana	Keçi	Koyun	Dana	Keçi	Koyun
6	-	-	-	+	-	-	+	-	-
12	-	-	-	+	+	+	+	+	+
18	+	-	+	+	++	+	+	+	+
24	+	+	+	++		++	+	+	+
30	+	+	+				+	+	+
36	+	+	+				+	++	+
42	+	+	+				++		++
48	+	++	+						
60	++		++						
<p>- Kıllar çekildiğinde henüz dökülmeye başlamamıştır. + Kıllar çekildiğinde dökülmektedir. ++ Derideki kıllar tamamen dökülmüştür.</p>									



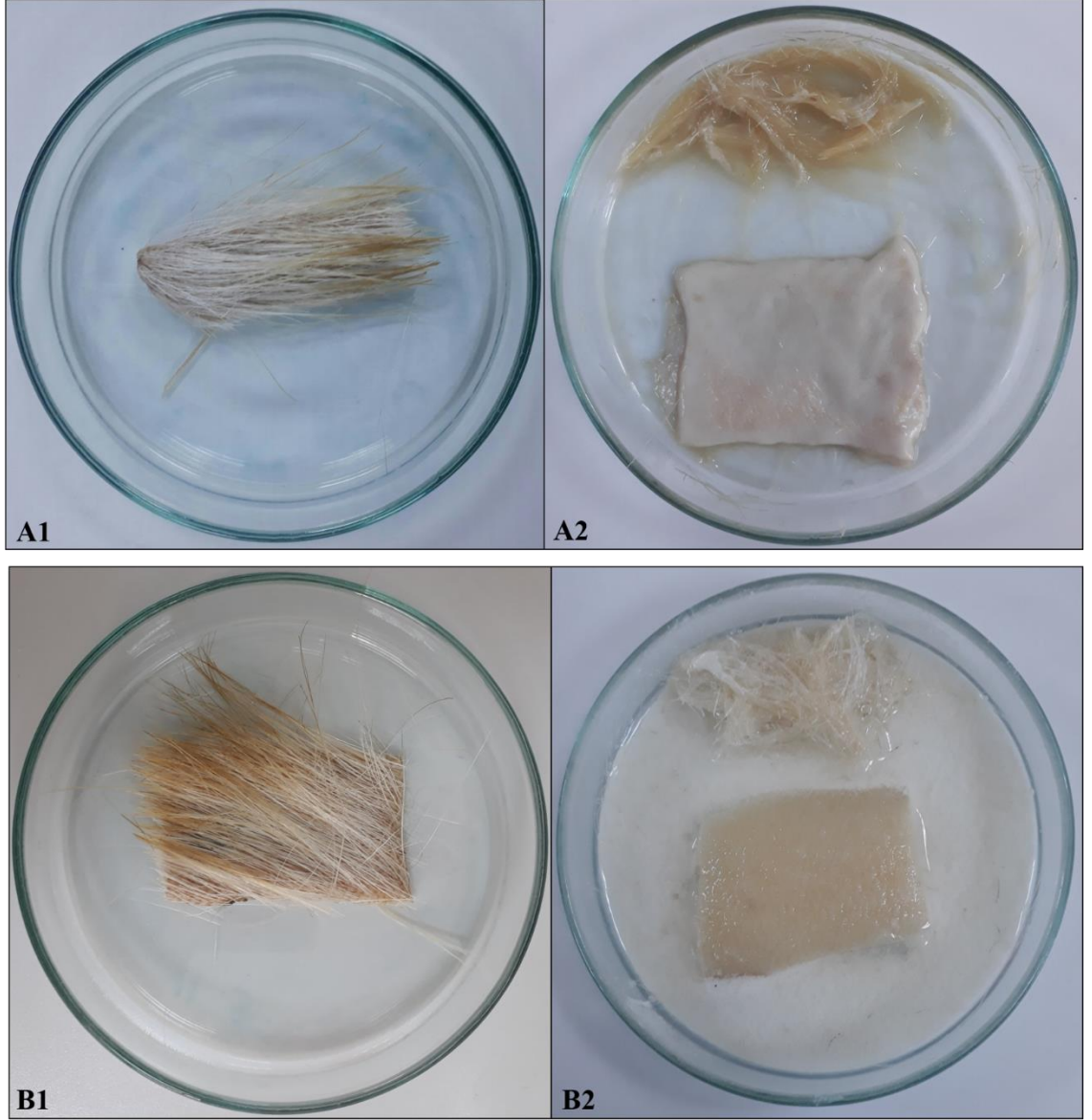
Şekil 4.20. Dana derisinde enzimatik ve kimyasal kıl giderimi.

(A1) Enzimatik uygulama öncesi dana derisi,

(A2) Enzimatik uygulama sonrası dana derisi,

(B1) Kimyasal uygulama öncesi dana derisi,

(B2) Kimyasal uygulama sonrası dana derisi.



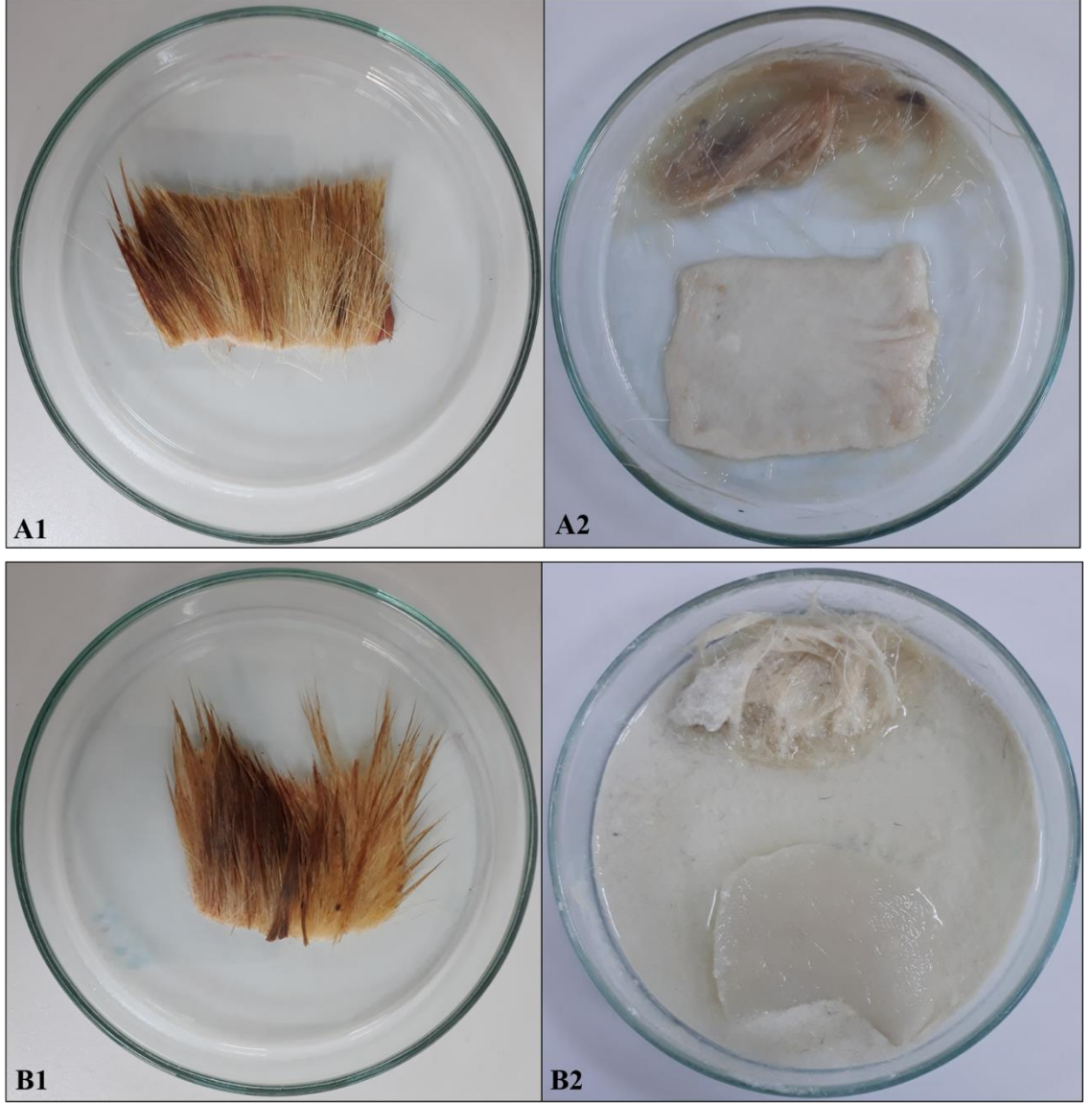
Şekil 4.21. Keçi derisinde enzimatik ve kimyasal kıl giderimi.

(A1) Enzimatik uygulama öncesi keçi derisi,

(A2) Enzimatik uygulama sonrası keçi derisi,

(B1) Kimyasal uygulama öncesi keçi derisi,

(B2) Kimyasal uygulama sonrası keçi derisi.



Şekil 4.22. Koyun derisinde enzimatik ve kimyasal kıl giderimi.

(A1) Enzimatik uygulama öncesi koyun derisi,

(A2) Enzimatik uygulama sonrası koyun derisi,

(B1) Kimyasal uygulama öncesi koyun derisi,

(B2) Kimyasal uygulama sonrası koyun derisi.

4.9. Histolojik Analiz

Enzimatik ve kimyasal muamele sonucu elde edilen dana, koyun ve keçi örnekleri ve kontrollerinin histolojik analizi yapılmıştır. Bu amaçla kılları enzim (6809 U/mL), kimyasal madde (kireç ve zırnık), jilet (kontrol) ile giderilmiş olan deri örnekleri %10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonunda 24 saat fikse edilmiş ve 3.2.20'de belirtilen şekilde hazırlanmış ve incelenmiştir. Crossman (1977)'in üçlü boya tekniği ile boyanarak incelenmiş olan deri kesitlerinde epidermis, glandüler (salgı bezi) yapıları, kan damarları ve kıl folikülleri histolojik olarak belirlenmiştir. Buna ek olarak kıl foliküllerinde kıl kalıntısının, kollajen yapısında hasarın olup olmadığı tespit edilmiştir.

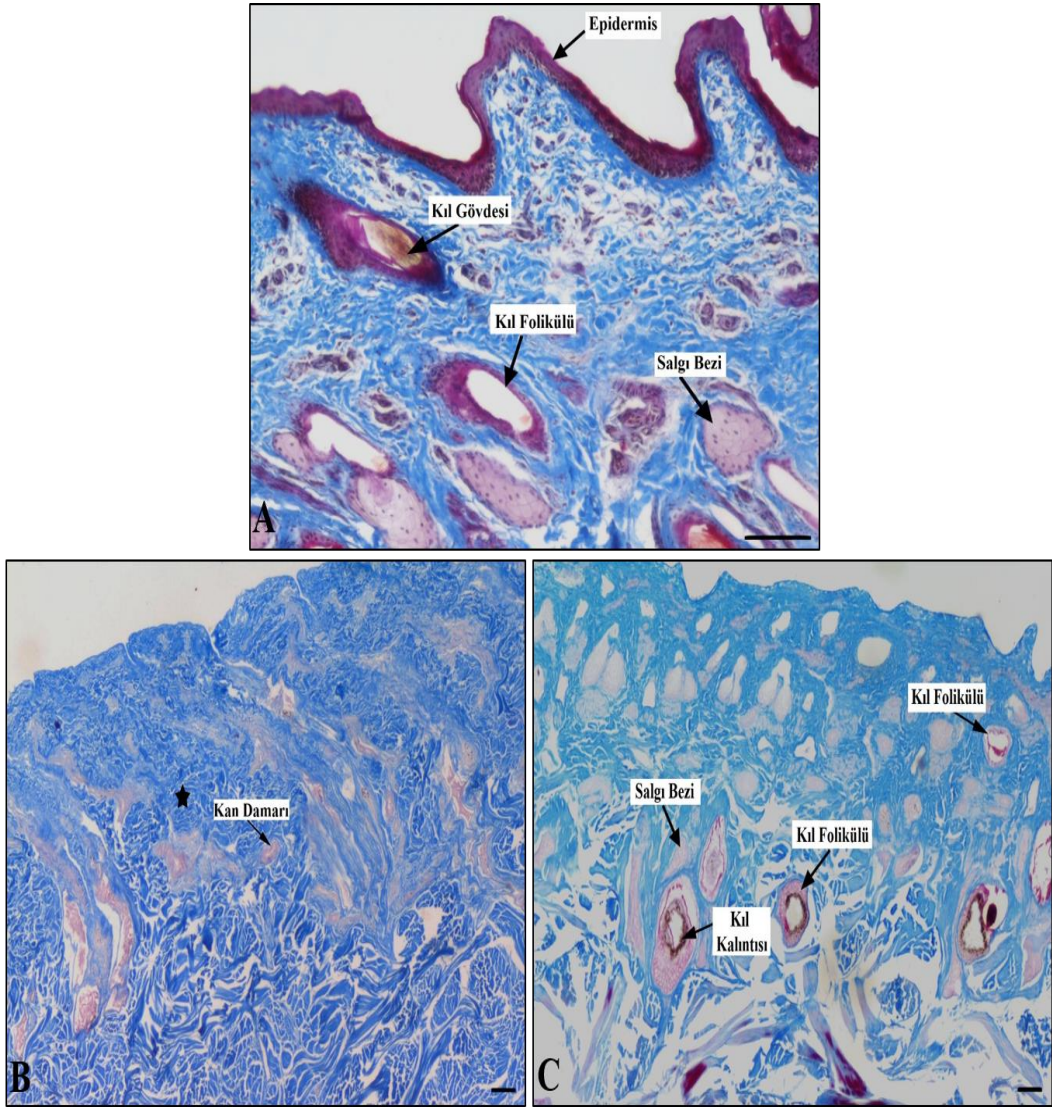
Yapılan histolojik incelemede;

Enzimle muamele edilen hiçbir hayvan derisi kesitinde epidermis, salgı bezi, kıl folikülü, kıl kalıntısına rastlanmamıştır (Şekil 4.23B, Şekil 4.24B, Şekil 4.25B). Sadece dana derisi kesitinde kan damarı gözlenmiştir (Şekil 4.23B).

Kimyasalla muamele edilen tüm hayvan derisi kesitlerinde salgı bezi, kıl folikülü ve kıl kalıntısı gözlenmiştir (Şekil 4.23C, Şekil 4.24C, Şekil 4.25C). Kimyasalla muamele edilen keçi derisinde bunlara ek olarak kan damarı gözlenmiştir. (Şekil 4.24C).

Kontrol grubunda ise salgı bezi, kan damarı, kıl folikülü, kıl kalıntısı ve kıl gövdesine ek olarak epidermis yapısı da gözlenmiştir (Şekil 4.23A, Şekil 4.24A, Şekil 4.25A).

Enzim ile muamele sonucunda kollajen yapısındaki bozulmaların en fazla koyun derisinde (Şekil 4.25B), en az ise dana derisinde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.23B). Dolayısıyla enzimatik uygulama sonucunda hayvan derisinde meydana gelen bozulmanın Koyun > Keçi > Dana şeklinde gerçekleştiği gözlenmiştir.



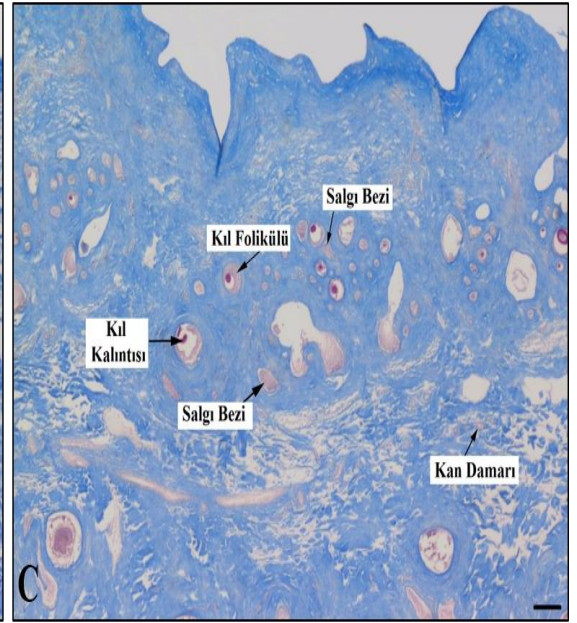
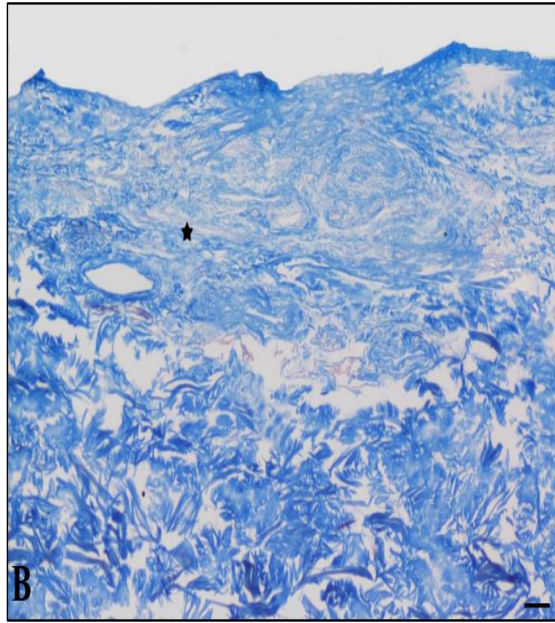
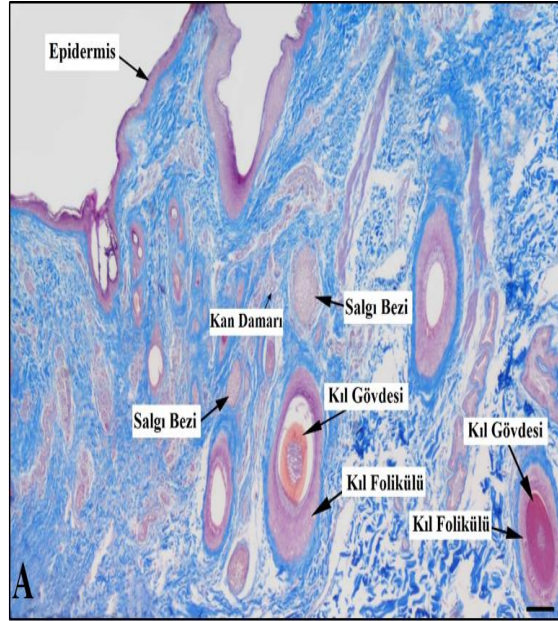
Şekil 4.23. Dana derisi kesitlerinin fotomikrografları.

(A) Kontrol,

(B) Enzimatik yöntem ile kıl giderimi gerçekleştirilmiş deri kesiti,

(C) Kimyasal yöntem ile kıl giderimi gerçekleştirilmiş deri kesiti.

Kollajen dokusu yıldız ile gösterilmiştir. Bar 100 μm .



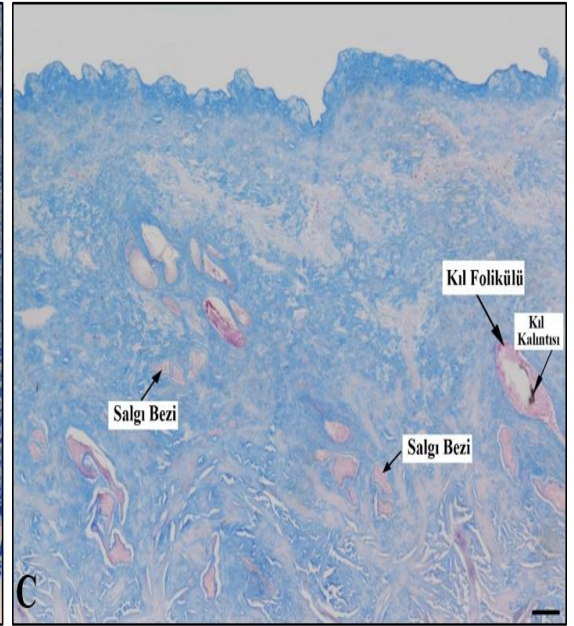
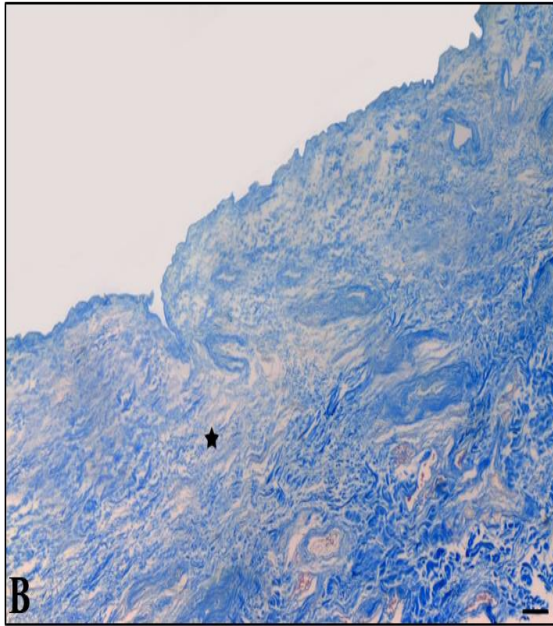
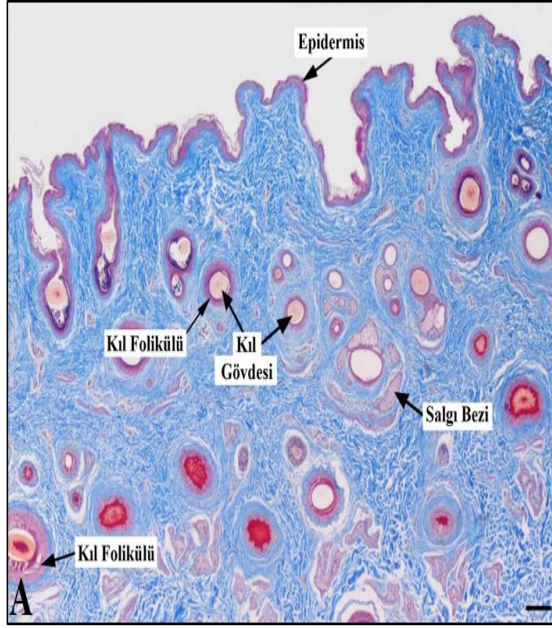
Şekil 4.24. Keçi derisi kesitlerinin fotomikrografları.

(A) Kontrol,

(B) Enzimatik yöntem ile kıl giderimi gerçekleştirilmiş deri kesiti,

(C) Kimyasal yöntem ile kıl giderimi gerçekleştirilmiş deri kesiti.

Kollajen dokusu yıldız ile gösterilmiştir. Bar 100 µm.



Şekil 4.25. Koyun derisi kesitlerinin fotomikrografları.

(A) Kontrol,

(B) Enzimatik yöntem ile kıl giderimi gerçekleştirilmiş deri kesiti,

(C) Kimyasal yöntem ile kıl giderimi gerçekleştirilmiş deri kesiti.

Kollajen dokusu yıldız ile gösterilmiştir. Bar 100 µm.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Canlılar tarafından sentezlenen ve hücrelerde metabolizma faaliyetlerinin gerçekleştirilmesini sağlayan enzimler, artık günlük ve ekonomik hayata girmiştir. Antik çağlardan günümüze kadar yediğimiz yiyeceklerden, giydiğimiz kıyafetlere, tıpta teşhis ve tedaviden, kozmetiğe, temizlikten çevre kirliliği ile mücadeleye kadar çok geniş bir yelpazede kullanılmaktadır. Enzimlerin işlem süresi, maliyeti, etkinliği ve en önemlisi çevre dostu olması gibi nitelikleri sayesinde endüstriyel uygulamalarda kullanım sayısı her geçen gün daha da artmıştır (Arunachalam ve Saritha 2009).

Proteolitik enzimlerin ticari önemi büyüktür ve dünyada ticari olarak üretilen enzimlerinin %60-65'ini proteazlar oluşturmaktadır (Puvanakrishnan ve ark. 2012). Mikroorganizmaların çoğunun proteaz ürettiği bilinmektedir. Ticari olarak üretilen proteazların %70'inden fazlasını bakteriyel proteazlar oluşturmaktadır (Contesini ve ark. 2018). Bakteriler içerisinde de sporlu olmaları, hızlı çoğalmaları ve GRAS (Generally Recognized As Safe; Genel olarak güvenilir kabul edilen) statüsünde olmaları sebebi ile proteaz üretiminde genellikle *Bacillus* sp. suşları kullanılmaktadır. *Bacillus* sp. suşları tarafından üretilen proteazların veriminin yüksek olması ve ölçeklenebilir olması yani kullanım kapasitesindeki artışın performansı etkilememesi özelliğine sahip olması ticari açıdan kullanılmasının önünü daha da açmıştır (Anonim 1999).

Proteazların kullanım alanları çok geniştir. Gıda, deri, deterjan ve kozmetik endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bilinen en kirletici sektörlerden biri olan deri sektöründe geleneksel (konvansiyonel) yöntem olarak adlandırılan ve kireç, zırnık (Sodyum sülfür, Na₂S) gibi kimyasal maddeler kullanılarak yapılan kıl giderimi işlemi, deri üretimi kaynaklı kirliliğinin ortama olarak %80-90'ına sebep olduğu için üretimin en kirletici aşaması olarak kabul edilmektedir. Diğer yandan kullanılan kimyasallar deri sektöründe çalışanlar için ciddi sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Bu negatif durumlardan dolayı son yıllarda kimyasal işlemler yerine enzimatik işlemlerin kullanılması önem kazanmıştır. Dericilikte enzim kullanımının temelini sama işlemi oluşturduğu ve ıslatma ve kıl giderimi gibi diğer iki önemli işlemde de proteazlar kullanıldığı için deri işlemede en önemli enzim grubu proteazlardır. Islatmada nötral proteazlar, kıl gideriminde alkalen proteazlar, samada ise asidik proteazlar kullanılmaktadır (Sanghi ve Singh 2012). Başta kıl giderimi olmak üzere tabaklama haricindeki bütün işlemlerin tamamen enzimlerle

gerçekleştirilmesini kolaylaştıracak adımların atılması çevre açısından çok önemlidir (Madhavi ve ark. 2011).

Proteaz üretimine yönelik çalışmalar da geçmişten günümüze devam etmekte ve enzim üretiminin arttırılmasına yönelik yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Endüstriyel uygulamada spesifik özellikte enzimlere ihtiyaç duyduğundan spesifik özellikte proteaz üreten mikroorganizmaların belirlenmesi gerekmektedir. Diğer yandan, yüksek verimde enzim üreten mikroorganizmaların izolasyonu kadar enzim üretim kapasitelerinin geliştirilmesi için de optimal ortam koşulların ve üretimi arttırmaya etki eden çeşitli faktörlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır.

Bu çalışmada Bursa Uludağ Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda daha önceden topraktan izole edilmiş olan ve iyi bir proteaz enzimi üretimine sahip yeni izolat *Bacillus subtilis* E6-5 suşu kullanılmıştır (Demirkan ve ark. 2020). Bu bakterinin en iyi geliştiği besi yeri saptanmış ve bu besi yerinin besinsel ve fiziksel optimizasyonu sonucu yeni bir modifiye ortam geliştirilmiştir. Enzim saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Ayrıca enzimin deri sanayiinde, kıl gidermede potansiyel gücü araştırılmıştır.

Proteaz enzim üretiminin teşvik edilmesi, bakterinin bulunduğu ortamdaki besi maddelerine bağlı olduğundan farklı içerikli 3 besi yeri kullanılmış ve en iyi enzim üretimi Gököz (2016) tarafından önerilen besi yerinde elde edilmiştir. Bu besi yerinde enzim üretimi 40. saatte 360 U/mL olarak saptanmıştır. Üreme de 40. saatte elde edilmiştir. *B. subtilis* E6-5 suşunun üreme grafiği incelendiğinde maksimum enzim üretiminin logaritmik fazın sonunda olduğu ve durağan fazda da devam ettiği saptanmıştır. En yüksek üreme OD'si ise 40. saatte 2.0 olarak bulunmuştur. Enzim üretiminin ve bakteri üremesinin paralel olduğu belirlenmiştir.

Maksimum enzim üretiminin 24 veya 48 saat gibi kısa sürelerde gerçekleşmesi biyoteknolojik uygulanabilirlik açısından avantajdır (Ahmetoglu ve ark. 2015). Bu açıdan *Bacillus subtilis* E6-5 suşunun maksimum proteaz üretiminin 40. saatte olması önemlidir.

Mikroorganizmaların ürettiği enzim miktarı, suşun genetik yapısına, büyüme ortamının kompozisyonuna ve şartlarına bağlıdır (Nadeem ve ark. 2010). Başta fermantasyon parametrelerinin optimizasyonu olmak üzere enzimlerin daha düşük maliyetli olarak

üretimi açısından çeşitli stratejiler geliştirilmektedir. Çünkü enzim üretim maliyetinin yaklaşık olarak %30-40'ının büyüme ortamının maliyetinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir (Vijayaraghavan ve ark. 2014). Bu maliyetin düşürülmesi inkübasyon zamanı, ortam pH ve sıcaklığı, inokulum yaşı, inokulum miktarı, inorganik ve organik azot ve karbon kaynağı gibi çeşitli parametrelerin denenmesi ile elde edilmeye çalışılmaktadır (Chatterjee ve ark. 2015).

Bu çalışmada da besinsel faktörler ele alınmış ve en iyi karbon kaynağı Sükroz olarak bulunmuştur. Sükroz bulunan besi yerinde proteaz üretimi temel besi yerine göre %32 oranında artış göstermiştir. En iyi azot kaynağı olarak temel besi yerindeki azot kaynağı olan Tripton bulunmuştur. Denemeye alınan organik azot kaynakları varlığında enzim üretiminde bir artış gözlenmezken, inorganik azot kaynakları ((NH₄)₂HPO₄, KNO₃, (NH₄)₂NO₃, (NH₄)₂SO₄) varlığında dramatik düşüşler saptanmıştır. İnorganik azot kaynağı varlığında proteaz üretiminin çok düşmesinin nedeni, besi ortamında bulunan diğer bileşenlerle amonyum tuzlarının negatif etkileşime girmesi olarak düşünülebilir.

Metal iyonun etkisini saptamak üzere yapılan çalışmalarda en yüksek enzim üretimi %0,01 CaCl₂ varlığında %13 oranında bir artışla elde edilmiş ve %0,01 konsantrasyonunun %0,02'den daha iyi olduğu gözlenmiştir. %0,01 BaCl₂ varlığı da enzim üretimi üzerine etkili olduğundan, %0,01 BaCl₂, temel besi yerinde bulunan %0,01 CaCl₂ ve %0,01 MgSO₄ ile ayrı ayrı tekrar kombine edildiğinde %0,01 BaCl₂ + %0,01 CaCl₂ kombinasyonunda enzim aktivitesi 507 U/mL olarak saptanmış ve enzim üretiminde %41'lik bir artış saptanmıştır. Diğer yandan kontrol ortamında birlikte bulunan CaCl₂ ve MgSO₄ ayrı ayrı denemeye alınmış, ancak enzim üretiminde MgSO₄ tek başına kullanıldığında verimli bir etkiye sahip olmadığı saptanmıştır.

Fermantasyon koşullarının etkisi de araştırılmış ve *B. subtilis* E6-5 için optimal değerler saptanmıştır. Sıcaklık 35°C olarak saptanmış ve bu sıcaklıkta enzim üretiminde %11'lik artış gözlenmiştir. Yüksek sıcaklıklarda gerek üremede gerekse enzim üretiminde dramatik düşüşler saptanmıştır. pH değeri 8.0 olarak bulunmuş ve enzim üretiminde %21'lik bir artış elde edilmiştir. Alkali pH'da enzim üretiminin arttığı belirlenmiştir. Havalandırma etkisinde ise 150 rpm çalkalama hızında en iyi enzim üretimi saptanmıştır. %4 inokülasyon miktarı ile %20 oranında bir artışla enzim üretimi elde edilmiştir.

Yapılan çalışmada maksimum enzim üretiminin elde edildiği inokülasyon yaşı 72. saat olarak belirlenmiştir. Bu inokülasyon saatinde enzim üretimi 2,1 katına çıkmıştır.

Çeşitli araştırmacılar da farklı bakteriyel suşlar kullanarak proteaz üretimi üzerine besinsel ve fiziksel faktörlerin etkilerini araştırmışlardır. Bu araştırmalar neticesinde birbirinden farklı sonuçlar rapor etmişlerdir.

Joo ve Chang (2005), *Bacillus* sp. I-312 suşunun maksimum proteaz üretimini pH 11.0 ve 32°C'de 48. saatte gerçekleştirdiğini bildirmiştir.

Qadar ve arkadaşları (2009), *Bacillus* sp. PCSIR EA-3 suşunun maksimum proteaz üretimini glikoz (karbon kaynağı) ve pepton (azot kaynağı) içeren besiyerinde pH 7.0 ve 35°C'de 48. saatte gerçekleştirdiğini bildirmiştir.

Das ve Prasad (2010), *Bacillus subtilis* suşunun maksimum proteaz üretimini dekstroz (karbon kaynağı) ve pepton (azot kaynağı) içeren besiyerinde pH 8.0 ve 37°C'de 48. saatte gerçekleştirdiğini rapor etmiştir.

Sundararajan ve arkadaşları (2011), *Bacillus cereus* VITSN04 suşunun maksimum proteaz üretimini soya ve kazeinli besiyerinde 16. saatte gerçekleştirdiğini saptamıştır.

Ravishankar ve arkadaşları (2012), *Bacillus subtilis* AKRS3 suşundan maksimum proteaz üretimini ksiloz (karbon kaynağı), sığır ekstraktı (azot kaynağı) ve NaCl (metal iyonu) içeren besiyerinde pH 9.0 ve 37°C'de 24. saatte gerçekleştirdiğini rapor etmiştir.

Helal ve arkadaşları (2012), *Bacillus subtilis* suşunun maksimum proteaz üretimini şeker kamışı pekmezi (karbon kaynağı), mısır özü konsantresi (azot kaynağı) içeren besiyerinde pH 10.0 ve 37°C'de 48 saatte gerçekleştirdiğini saptamıştır.

Vijayaraghavan ve arkadaşları (2012), *Bacillus subtilis* VV suşunun maksimum proteaz üretimini maltoz (karbon kaynağı) ve üre (azot kaynağı) içeren besiyerinde pH 10.0 ve 30-40°C'de 72. saatte gerçekleştirdiğini bildirmiştir.

Agasthya ve arkadaşları (2013), *Bacillus thuringiensis* suşunun maksimum proteaz üretimini pH 8.0 ve 47 °C'de gerçekleştirdiğini bildirmiştir.

Vijayaraghavan ve arkadaşları (2014), *Bacillus cereus* AT suşunun maksimum proteaz üretimini maltoz (karbon kaynağı), maya özütü (azot kaynağı) içeren besiyerinde pH 9.0 ve 37°C'de 72. saatte gerçekleştirdiğini saptamıştır.

Uddin ve arkadaşları (2014), *Bacillus* sp. suşunun maksimum proteaz üretimini pH 8.5 ve 60°C'de 26. saatte gerçekleştirdiğini bildirmiştir.

Nisha ve Divakaran (2014), *Bacillus subtilis* NS suşunun maksimum proteaz üretimini glikoz (karbon kaynağı), sığır ekstraktı (azot kaynağı) ve MgCl₂ (metal iyonu) içeren besiyerinde pH 9.0 ve 40°C'de 48. saatte gerçekleştirdiğini bildirmiştir.

Pant ve arkadaşları (2015), *Bacillus subtilis* suşunun maksimum proteaz üretimini galaktoz (karbon kaynağı) ve pepton (azot kaynağı) içeren besiyerinde pH 10.0 ve 45°C'de 36. saatte gerçekleştirdiğini rapor etmiştir.

Ahmetoglu ve arkadaşları (2015), *Bacillus* sp. KG5 suşunun maksimum proteaz üretimini laktoz (karbon kaynağı), sığır ekstraktı (azot kaynağı) ve CaCl₂ (metal iyonu) içeren besiyerinde pH 7.0 ve 40-45°C'de 24. saatte gerçekleştirdiğini rapor etmiştir. Buna ek olarak karbon kaynağı olarak glikoz, metal iyonu olarak NaCl, MgCl₂, MnCl₂ kullanımının enzim üretimini inhibe ettiğini rapor etmiştir.

Briki ve arkadaşları (2016), *Bacillus* sp. SB12 suşunun maksimum proteazın nişasta (karbon kaynağı), maya özütü ve pepton (azot kaynağı) içeren besiyerinde pH 9.0 ve 37°C'de gerçekleştirdiğini bildirmiştir.

Anandharaj ve arkadaşları (2016), *Bacillus alkalitelluris* TWI3 suşunun maksimum proteaz üretimini laktoz (karbon kaynağı) ve skim milk (azot kaynağı) içeren besiyerinde pH 8.0 ve 40°C'de gerçekleştirdiğini bildirmiştir.

Baweja ve arkadaşları (2016), *Bacillus pumilus* MP27 suşunun maksimum proteaz üretimini buğday samanı (karbon kaynağı) ve pepton (azot kaynağı) içeren besiyerinde pH 9.0 ve 30°C'de 48. saatte gerçekleştirdiğini bildirmiştir.

Ali ve arkadaşları (2016), *Bacillus subtilis* BLK-1.5 suşunun maksimum proteaz üretimini 37 °C ve pH 10.0 değerinde gerçekleştirdiğini bildirmiştir.

Devanadera ve arkadaşları (2016), *Bacillus subtilis* USTCMS 1011 suşunun maksimum nötral proteaz üretimini dekstrin (karbon kaynağı) ve maya özütü (azot kaynağı) içeren besiyerinde 37 °C ve pH 7.0 değerlerinde 72. saatte ürettiğini saptamıştır.

Devanadera ve arkadaşları (2016), *Bacillus subtilis* USTCMS 1011 suşunun maksimum alkalin proteaz üretimini ise dekstrin (karbon kaynağı) ve maya özütü (azot kaynağı) içeren besiyerinde 30°C ve pH 9.0 değerlerinde 72. saatte ürettiğini saptamıştır.

Kim ve arkadaşları (2016), *Bacillus subtilis* FBL-1 suşunun maksimum proteaz üretimini fruktoz (karbon kaynağı) ve maya özütü (azot kaynağı) içeren besiyerinde pH 6.0 ve 37°C’de 36. saatte gerçekleştirdiğini bildirmiştir.

Rehman ve arkadaşları (2017), *Bacillus subtilis* KT004404 suşunun maksimum proteaz üretimini dekstroz (karbon kaynağı), pepton (azot kaynağı) ve malt özütü (azot ve karbon kaynağı) içeren besiyerinde pH 6.0 ve 55°C’de 48. saatte gerçekleştirdiğini bildirmiştir.

Hussain ve arkadaşları (2017), *Bacillus subtilis* suşunun maksimum proteaz üretimini maltoz (karbon kaynağı) ve pepton (azot kaynağı) içeren besiyerinde gerçekleştirdiğini bildirmiştir. Pepton ve maltozun *B. subtilis* tarafından kolayca metabolize edilebildiği için maksimum üretimi sağladığı ifade edilmiştir. Buna ek olarak azot kaynağı olarak kullanılan amonyum nitratın (NH₄NO₃) *B. subtilis* gelişimini dolayısıyla enzim üretimini baskıladığını bildirmiştir.

Bashir ve arkadaşları (2018), *Bacillus licheniformis* suşunun maksimum proteaz üretimini pH 7.5 ve 40°C’de 48. saatte gerçekleştirdiğini saptamıştır.

Bhunia ve arkadaşları (2010), *Bacillus licheniformis* NCIM-2042 suşunun proteaz üretiminde magnezyum iyonunun etkili olduğu rapor etmişlerdir. Benzer bir sonuç, Uyar ve arkadaşları (2011) tarafından da *Bacillus cereus* CA15 için saptanmıştır.

Tambekar ve Tambekar (2013), *Bacillus pseudofirmus*, *Cohnella thermotolerans* ve *Bacillus odyssey* ile yaptıkları çalışmada Mg²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺ ve Mn²⁺ iyonlarının izolatların proteaz üretimini üzerindeki artırıcı etkisini bildirmiştir.

Mothe ve Sultanpuram (2016), MgCl₂ ve CaCl₂ varlığının *Bacillus caseinolyticu*’in proteaz üretimini artırırken, ZnCl₂, FeCl₂ ve CuCl₂ gibi diğer metal tuzlarının ise proteaz üretiminde minimal etkiye sahip olduklarını saptamışlardır.

Asha ve Palaniswamy (2018), *Bacillus cereus* FT 1 suşunun Mn²⁺ iyonu varlığında proteaz üretiminin büyük ölçüde arttığını belirtmişlerdir.

Kalsiyum iyonu içeren besi yerinde genellikle proteaz üretimi artmaktadır. Bunun sebebi bakterinin enzim sekresyonunda kalsiyum iyonlarını kullanması olabilir (Ahmetoglu ve ark. 2015).

Farklı metaller, efektör olarak hareket etme yeteneklerinde farklı davranışlar sergilerler. Metalik kofaktörler enzimatik reaksiyonda önemlidir, çünkü bunların varlığı veya yokluğu enzim aktivitesini düzenler. Esansiyel besin kaynağı ile birlikte spesifik metalik iyonun varlığı enzim aktivitesini inhibe edebilir veya arttırabilir. Bu nedenle çalışmalarda da, üretim ortamındaki metal iyonlarının takviyesi değerlendirilmektedir (Sirohi ve Prakash 2015).

Enzim üretimi fizyolojik mekanizmalar tarafından düzenlenmektedir. Besi yerindeki glikoz gibi bazı katabolitler, hidrolitik enzim üretimini baskılayabilmektedir. Dolayısıyla çeşitli karbon kaynaklarının da enzim üretimini baskılaması katabolik represyon mekanizmasının gerçekleşmesi olabilir (Zambare ve ark. 2011).

Ekstrem sıcaklık değerlerinde maksimum proteaz üretimini gerçekleştiren *Bacillus* suşları da mevcuttur. *Bacillus* sp. suşunun maksimum proteaz üretimini 60°C'de gerçekleştirdiği belirtilmiştir (Uddin ve ark. 2014).

Bacillus hücreleri aerobik bir ortamda üredikleri için, iyi bir havalandırma proteaz üretimini de arttırır, bu nedenle çalkalama da önemli bir faktördür (Ebrahimpour ve ark. 2008). *Bacillus* sp. suşları kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda optimal çalkalama hızı genellikle 150 rpm olarak gösterilmiştir. *Bacillus* sp. BGS (Moorthy ve Baskar 2013), *B. subtilis* GA CAS8 (Sathishkumar ve ark. 2015), *Bacillus* sp. SB12 (Briki ve ark. 2016), *B. alkalitelluris* TWI3 (Anandharaj ve ark. 2016), *B. pumilus* MP 27 (Bejewa ve ark. 2016), *B. subtilis* KT004404 (Rehman ve ark. 2017) suşlarının maksimum proteaz üretimini 150 rpm çalkalama hızında gerçekleştirdiği rapor edilmiştir. Fakat farklılıklar da görülmektedir. Joo ve Chang (2005), *Bacillus* sp. I-312 suşunun 250 rpm, Pant ve arkadaşları (2015) ise *B. subtilis* suşunun 180 rpm çalkalama hızında maksimum proteaz üretimini gerçekleştirdiğini rapor etmiştir.

İnokulum miktarı, enzim üretiminde önemli ve çok değişken olan unsurlardan biridir. Rehman ve arkadaşları (2017), *Bacillus subtilis* KT004404 suşunun maksimum proteaz üretimini %1 inokulum kullanıldığında, Nadeem ve arkadaşları (2010), *Bacillus licheniformis* N-2 suşunun maksimum proteaz üretimini %1 inokulum kullanıldığında, Vijayaraghavan ve arkadaşları (2012) ise *Bacillus subtilis* VV suşunun maksimum proteaz üretimini %25 inokulum kullanıldığında gerçekleştirdiğini rapor etmiştir. Vijayaraghavan ve arkadaşları (2014), *Bacillus cereus* AT suşunun maksimum proteaz üretimini %6 inokulum kullanıldığında, Ozdenefe ve arkadaşları (2017), *Bacillus subtilis* suşundan alkalen proteazın üretimini %5 inokulum kullanıldığında, Bashir ve arkadaşları (2018), *Bacillus licheniformis* suşunun maksimum proteazın üretimini %1,5 inokulum kullanıldığında gerçekleştirdiğini bildirmiştir.

İnokulum yaşı da enzim üretiminde diğer unsurlar kadar önemli ve değişken bir faktördür. Ozdenefe ve arkadaşları (2017), *Bacillus subtilis* suşundan alkalen proteazın üretimini 4 saatlik inokulum yaşında, Loperena ve arkadaşları (1994), *Bacillus* sp. suşunun maksimum proteaz üretimini 12 saatlik inokulum yaşında, Nadeem ve arkadaşları (2010) ise *Bacillus licheniformis* N-2 suşunun maksimum proteaz üretimini 24 saatlik inokulum yaşında elde edildiğini rapor etmiştir.

Bu çalışma ve diğer araştırmacıların çalışma sonuçlarından da anlaşılacağı üzere farklı mikroorganizmalarla yapılan proteaz üretim verimlerindeki farklılıklar, kültür ortamı bileşiminin yanı sıra bakteri suşu özelliklerine bağlanabilir. Ayrıca, proteaz aktivitenin ölçülmesinin, aynı zamanda substrata ve test reaksiyonunun deneysel koşullarına da bağlı olduğundan farklı sonuçlar elde edilebilir. Diğer yandan, besinsel ve fiziksel faktörlerin proteaz üretimine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda farklı sonuçların alınması mikroorganizmaların kullandığı metabolik yolların farklı olduğunu da göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada en yüksek enzim üretiminin gözlemlendiği besinsel ve fiziksel faktörler bir araya getirilerek oluşturulan modifiye edilen ortamda *B. subtilis* E6-5 suşu enzim üretimi açısından değerlendirilmiş olup, proteaz enziminin aktivitesi 1810 U/mL olarak bulunmuştur. Bu besiyerinde elde edilen değer kontrol (360 U/mL) ile kıyaslandığında 5 kat fazla enzim üretimi sağlanmıştır.

Enzimlerin özelliklerinin ortaya çıkarılması yani karakterizasyonu enzim hakkında önemli bilgiler vermektedir. Bu bilgiler endüstride kullanılacak enzimler için oldukça değerlidir. Enzimin karakterizasyonunda bazı parametreler dikkate alınmaktadır. Bunlar, sıcaklık, pH, metal iyonları, kinetik özellikler olan K_m ve V_{max} moleküler ağırlıktır.

pH, sıcaklık, iyonik güç, mikroçevrede bulunan tuz, iyon ve bileşiklerin yapısı gibi faktörler enzimin üç boyutlu yapısını etkileyebilmektedir. Bu sebeple her enzimin optimum aktivite gösterdiği bir sıcaklık ve pH değeri vardır. Bu değerlerin bilinmesi, enzimin endüstriyel alanlarda aktif olarak kullanılıp kullanılmayacağını göstermektedir. pH değişimleri, enzimlerin 3 boyutlu yapısında değişikliğe yol açmaktadır, çünkü enzimler farklı pH'larda değişik iyonik gruplar oluşturduğundan farklı pH'larda enzim aktivitesinde büyük farklılıklar ortaya çıkmaktadır (Wilson ve Remigio 2012, Zekeya ve ark. 2019). Diğer yandan bazı enzimler aktivite gösterebilmek için ortamda mutlaka metal iyonlarına gereksinim duymaktadır ve bu enzimler metalloenzim olarak adlandırılmaktadırlar. Metalik iyonlar, metalik tuz çözeltisinin konsantrasyonuna bağlı olarak enzimlerin aktivitesi ve enzim katalitik/bağlama bölgelerinde bulunan aminoasit kalıntılarının yan gruplarına bağlanarak inhibe edici veya uyarıcı etkiye sahiptir. Endüstride kullanılan önemli enzimlerin çoğu metalloenzimlerdir. Enzimlerin K_m ve V_{max} değerleri ise enzimin en önemli kinetik özellikleridir. Bu özellikler enzimin belli bir substrat ile ne kadar çabuk doyuma ulaştığı (K_m) ve ulaşabildiği en hızlı (V_{max}) reaksiyonunu göstermektedir. Kinetik özelliklerin bilinmesi bir enzimin hücre içinde ne yaptığını ve o şartlardaki değişikliklere nasıl tepki verdiği hakkında fikir verebilmektedir. K_m değeri düştükçe enzimin substratına olan ilgisi artmaktadır. K_m değeri arttıkça enzimin substrata olan ilgisi ise düşmektedir. Düşük K_m değerine sahip enzimler substratlarına karşı yüksek affiniteye sahip olduğundan endüstride oldukça önemlidirler. Bu çalışma da *B. subtilis* E 6-5'den elde edilen proteaz enziminin özelliklerini belirlemek üzere enzim birkaç basamakta saflaştırılmıştır. Bunun için sırasıyla; amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, ultrafiltrasyon ve jel filtrasyon (Sephadex G-75) kromatografisi yapılmıştır. Enzim %16,1 verimle, 6,1 kez saflaştırılmıştır. Çalışmada saf enzim üzerine sıcaklık ve stabilitesi, pH ve stabilitesi, çeşitli potansiyel bileşiklerin etkileri araştırılmış, enzimin K_m ve V_{max} değerleri saptanmış ve molekül ağırlığı belirlenerek enzim karakterize edilmiştir. Ayrıca zimogram analizi de yapılmıştır.

Çalışmada *B. subtilis* E 6-5'in ürettiği proteaz enzimi için optimum sıcaklık değeri 60°C olarak saptanmıştır. Bu sıcaklık değerinde saf enzimin aktivitesi ham enzime göre 2,38 kat artış göstermiştir. 65°C'de enzim aktivitesinde 2,17 kat artış görülmüştür. Enzimin 60°C'de 60. dakikaya kadar stabil kaldığı, 90. dakika sonunda aktivitesinin %84'ünü koruduğu saptanmıştır. Enzimin ısıya dayanıklı (termostabil) karakterde olduğu belirlenmiştir.

Enzimin optimum pH değeri ise 7.0 olarak belirlenmiştir. Enzimin nötral proteaz olduğu ancak, enzimin alkali ortamda da yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Enzimin pH 6.0-10.0 gibi geniş bir pH aralığında enzimin aktivite göstermesi endüstriyel uygulamalar için önemlidir. pH stabilite denemelerinde pH 7.0'da 60 dakika boyunca stabil kalmıştır. Enzimin aktivitesinin 4 saat sonunda %85'ini, 6 saat sonunda ise %70'ini koruduğu saptanmıştır.

Metal iyonları ve bazı potansiyel bileşikleri enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu çalışmada 1 ve 5 mM konsantrasyonlardaki farklı potansiyel bileşikleri kullanılmış ve 5 mM konsantrasyonun daha etkili olduğu belirlenmiştir. $MnSO_4$, $CaCl_2$ ve KCl iyonlarının enzim aktivitesi üzerine aktivatör etki yaptığı ve enzim aktivitesinin sırasıyla, %53, %46 ve %40 oranında arttığı belirlenmiştir. $ZnSO_4$ ve anyonik bir deterjan olan SDS ve şelatlayıcı ajan olan EDTA ise enzim aktivitesini inhibe etmiştir. Çalışmada proteaz enziminin metal iyonları varlığında aktif olmasından dolayı enzimin metalloenzim olduğu belirlenmiştir.

Proteaz enziminin kinetik özellikleri belirlenmiş V_{max} 3333 U/mL ve K_m ise 1 mM olarak bulunmuştur. Enziminin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile yaklaşık 51.5 kDa olarak tespit edilmiştir. Ayrıca supernatantın zimogram profilini incelendi ve zimografda bir tane açık bant bulundu. 2 tane silik bantın varlığı da görüldü. Zimogram analizi ile de proteolitik aktivitenin 51.5 kDa ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur.

Farklı araştırmacılar farklı mikroorganizmalarla yaptıkları çalışmalarda proteazların özelliklerini ortaya çıkarmışlardır.

Rai ve Mukherjee (2009), *B. subtilis* DM-04 suşundan izole edilen proteazın optimal pH değerinin 10.0 ve optimal sıcaklık değerinin ise 37°C olduğunu rapor etmiştir.

Giri ve arkadaşları (2011), *B. subtilis* VSG-4 suşundan izole edilen proteazın optimal pH değerinin 9.0 ve optimal sıcaklık değerinin ise 50°C olduğunu rapor etmiştir.

Jain ve arkadaşları (2012), *Bacillus* sp. SM2014 suşundan izole edilen proteazın optimal pH değerinin 10.0 ve optimal sıcaklık değerinin ise 60°C olduğunu rapor etmiştir.

Vijayaraghavan ve arkadaşları (2012), *B. subtilis* W suşundan izole edilen proteazın optimal pH değerinin 10.0 ve optimal sıcaklık değerinin ise 50°C olduğunu rapor etmiştir.

Wang ve arkadaşları (2013), *B. amyloliquefaciens* suşundan izole edilen proteazın optimal pH değerinin 7.0 ve optimal sıcaklık değerinin ise 50°C olduğunu rapor etmiştir.

Annamalai ve arkadaşları (2014), *B. alveayuensis* CAS5 suşundan izole edilen proteazın optimal pH değerinin 9.0 ve optimal sıcaklık değerinin ise 50°C olduğunu rapor etmiştir.

Vijayaraghavan ve arkadaşları (2014), *B. cereus* AT suşundan izole edilen proteazın optimal pH değerinin 8.0 ve optimal sıcaklık değerinin ise 50°C olduğunu rapor etmiştir.

Chatterjee ve arkadaşları (2015), *B. subtilis* ATCC6633 suşundan izole edilen proteazın optimal pH değerinin 11.0 ve optimal sıcaklık değerinin ise 40°C olduğunu rapor etmiştir.

Ahmetoglu ve arkadaşları (2015), *Bacillus* sp. KG5 suşundan izole edilen proteazın optimal pH değerinin 7.0 ve optimal sıcaklık değerinin ise 45°C olduğunu rapor etmiştir.

Sathishkumar ve arkadaşları (2015), *B. subtilis* GACAS8 suşundan izole edilen proteazın optimal pH'sının 9.0 ve optimum sıcaklığının ise 50°C olduğunu rapor etmiştir.

Farhadian ve arkadaşları (2015), *B. subtilis* DR8806 suşundan izole edilen proteazın optimal pH değerinin 8.0 ve optimal sıcaklık değerinin ise 45°C olduğunu rapor etmiştir.

Sahin ve arkadaşları (2015), *B. subtilis* M-11 suşundan izole edilen proteazın optimal pH değerinin 8.0 ve optimal sıcaklık değerinin ise 50°C olduğunu rapor etmiştir.

Anandharaj ve arkadaşları (2016), *B. alkalitelluris* TWI3 suşundan izole edilen proteazın optimal pH değerinin 10.0 ve optimal sıcaklık değerinin ise 60°C olduğunu rapor etmiştir.

Devanadera ve arkadaşları (2016), *B. subtilis* suşundan izole edilen proteazın optimal pH değerinin 7.0 ve optimal sıcaklık değerinin ise 50°C olduğunu rapor etmiştir.

Uttatree ve Charoenpanich (2016), *B. subtilis* BUU1 suşundan izole edilen proteazın optimal pH'sının 11.0 ve optimal sıcaklığının ise 50°C olduğunu rapor etmiştir.

Ali ve arkadaşları (2016), *B. subtilis* BLK-1.5 suşundan izole edilen proteazın optimal pH değerinin 10.0 ve optimal sıcaklık değerinin ise 50°C olduğunu rapor etmiştir.

Rehman ve arkadaşları (2017), *B. subtilis* KT004404 suşundan izole edilen proteazın optimal pH değerinin 6.0 ve optimal sıcaklık değerinin ise 55°C olduğunu rapor etmiştir.

Hussain ve arkadaşları (2017), *B. subtilis* suşundan izole edilen proteazın optimal pH değerinin 8.0 ve optimal sıcaklık değerinin ise 57°C olduğunu rapor etmiştir.

Hakim ve arkadaşları (2018), *B. subtilis* AKAL7 suşundan izole edilen proteazın optimal pH değerinin 9.0 ve optimal sıcaklık değerinin ise 40°C olduğunu rapor etmiştir.

Si ve arkadaşları (2018), *B. subtilis* FBL-1 suşundan izole edilen proteazın optimal pH değerinin 9.0 ve optimal sıcaklık değerinin ise 45°C olduğunu rapor etmiştir.

Putatunda ve arkadaşları (2018), *Bacillus* sp. HD292 suşundan izole edilen proteazın optimal pH değerinin 9.5 ve optimal sıcaklık değerinin ise 70°C olduğunu rapor etmiştir.

Singh ve arkadaşları (2017), *B. subtilis* K-1 suşundan izole edilen proteazın optimal pH değerinin 10.0 ve optimal sıcaklık değerinin ise 50°C olduğunu rapor etmiştir.

Endüstriyel açıdan kullanılmak istenilen enzimlerde aranılan en önemli özelliklerden biri termostabilitedir. Çünkü yüksek aktiviteye sahip proteazların çoğu, endüstriyel uygulamalarda termostabil olmadığı için kullanılamamıştır (Nadeem ve ark. 2010). Moleküler yüzeydeki yükler, moleküldeki iyonlar, genetik sürüklenme termal stabiliteden sorumludur. Enzim termostabilitesi, hidrojen bağları, disülfür bağları, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler gibi kuvvetler tarafından belirlenmektedir (Yang ve ark. 2014, Singh ve Bajaj 2017). Buna ek olarak moleküler yüzeydeki yükler, moleküldeki iyonlar, genetik sürüklenme termal stabiliteden sorumludur (Tiberti ve Papaleo 2011). Dolayısıyla termostabilite de en önemli unsur başta genetik yapıdır.

Bacillus subtilis PE-11 suşundan izole edilen proteazın 60°C'de 6 saate süreyle stabilitesini koruyabildiği rapor edilmiştir (Adinarayana ve ark. 2003).

Bacillus megaterium RRM2 suşundan izole edilen proteazın 60°C’de 2 saat süreyle stabilitesini koruyabildiği belirlenmiştir (Rajkumar ve ark. 2011).

Bacillus sp. SM2014 suşundan izole edilen proteazın 80°C’de 30 dakika süreyle stabilitesini koruyabildiği belirlenmiştir (Jain ve ark. 2012).

Bacillus koreensis BK-P21A suşundan izole edilen proteazın 70°C’de 1 saat süreyle stabilitesini koruyabildiği belirlenmiştir (Anbu 2013).

Bacillus amyloliquefaciens SYB-001 suşundan izole edilen proteazın 60°C’de 1 saat süreyle stabilitesini koruduğu rapor edilmiştir (Wang ve ark. 2013).

Bacillus alveayuensis CAS5 suşundan izole edilen proteazın 80°C’de 1 saat süreyle stabilitesini koruyabildiği belirlenmiştir (Annamalai ve ark. 2014).

Bacillus subtilis GACAS8 suşundan izole edilen proteazın ise 60°C’de 24 saat süreyle stabilitesini koruyabildiği rapor edilmiştir (Sathishkumar ve ark. 2015).

Bacillus subtilis DR8806 suşundan izole edilen proteazın 60°C’de 1 saat süreyle stabilitesini koruyabildiği rapor edilmiştir (Farhadian ve ark. 2015).

Bacillus sp. SB12 suşundan izole edilen proteazın 60°C’de 1 saat süreyle stabilitesini koruyabildiği rapor edilmiştir (Briki ve ark. 2016).

Bacillus alkalitelluris TWI3 suşundan izole edilen proteazın 60°C’de 30 dakika süreyle stabilitesini koruyabildiğini rapor edilmiştir (Anandharaj ve ark. 2016).

Bacillus subtilis KT004404 suşundan izole edilen proteazın 65°C’de 1 saat süreyle stabilitesini koruyabildiği rapor edilmiştir (Rehman ve ark. 2017).

pH, enzim üzerine etki eden önemli bir faktördür. Aşırı veya az hidrojen iyonu konsantrasyonları, yani ekstrem pH değerlerinin, moleküllerin proton kazanma ve kaybetme oranlarını normalin dışına çıkarmaktadır. pH değerindeki değişimler sebebi ile proteinlerin aminoasitlerin değişken olan R grubu başta olmak üzere karboksil ve amino terminalinde protonlanma veya proton kaybetme gerçekleşebilmektedir. Buna ek olarak bazik veya asidik aminoasitlerinin iyonlaşma durumlarında değişikliklere sebep olabilmektedir (Wilson ve Remigio 2012). Bu durum proteinin kimyasal özelliklerinde ve dolayısıyla konformasyonunda değişime yol açmaktadır. Eğer bitişik olması gereken

alt birimlerin etkileşimindeki azalma, substrat ilgisinde azalmaya sebep olmaktadır. pH değişimleri enzimin tersiyer yapısında bulunan ve yapının oluşumu ve devamlılığını sağlayan zayıf kuvvetlerin ortadan kalkmasına sebep olmakta, enzimin tersiyer yapısının bozulması da yani katlanmadaki açılmaların olması ise enzimin tamamen inhibe olmasına sebep olmaktadır (Zekeya ve ark. 2019).

Bacillus cinsi türlerinin genellikle optimal pH değerlerinin 6.0-10.0 aralığında olduğu yani genellikle nötral ve alkalin olduğu bilinmektedir (Contesini ve ark. 2018). Nötral proteazlar pH 5.0-8.0, alkalin proteazlar ise pH 9.0-12.0 değerleri arasında aktiftir. Fakat bu değerlerin aralığında küçük sapmalar olabilmektedir. Hakim ve arkadaşları (2018), izole ettikleri *Bacillus subtilis* AKAL7 suşunun alkalin proteazının pH 7.0-12.0 aralığında aktif olduğunu rapor etmiştir.

Adinarayana ve arkadaşları (2003), *Bacillus subtilis* PE-11 suşunun proteazının pH 8.0-10.0 aralığında stabilitesini koruyabildiğini rapor etmiştir.

Rajkumar ve arkadaşları (2011), *Bacillus megaterium* RRM2 suşundan izole edilen proteazın pH 7.0-11.0 aralığında stabilitesini koruyabildiğini saptamıştır.

Jain ve arkadaşları (2012), *Bacillus* sp. SM2014 suşunun ürettiği proteazın pH 7.0-12.0 aralığında stabil olduğunu rapor etmiştir.

Wang ve arkadaşları (2013), *Bacillus amyloliquefaciens* SYB-001 suşundan izole edilen proteazın pH 6.0-10.0 aralığında stabil olduğunu rapor etmiştir.

Anbu (2013), *Bacillus koreensis* BK-P21A suşunun proteazının pH 7.0-10.0 aralığında stabilitesini koruyabildiğini rapor etmiştir.

Annamalai ve arkadaşları (2014), *Bacillus alveayuensis* CAS5 suşundan izole edilen proteazın pH 8.0-11.0 aralığında stabil olduğunu saptamıştır.

Sathishkumar ve arkadaşları (2015), *Bacillus subtilis* GACAS8 suşundan izole edilen proteazın pH 9.0-11.0 aralığında stabilitesini koruyabildiğini rapor etmiştir.

Farhadian ve arkadaşları (2015), *Bacillus subtilis* DR8806 suşundan izole edilen proteazın pH 6.0-9.0 aralığında stabilitesini koruyabildiğini rapor etmiştir.

Briki ve arkadaşları (2016), *Bacillus* sp. SB12 suşundan izole edilen proteazın pH 7.0-11.0 aralığında stabil olduğunu rapor etmiştir.

Anandharaj ve arkadaşları (2016), *Bacillus alkalitelluris* TWI3 suşundan izole edilen proteazın pH 6.0-12.0 aralığında stabil olduğunu rapor etmiştir.

Rehman ve arkadaşları (2017), *Bacillus subtilis* KT004404 suşundan izole edilen proteazın pH 5.0-8.0 aralığında stabilitesini koruyabildiğini rapor etmiştir.

Bazı enzimler aktivite gösterebilmek için ortamda mutlaka metal iyonlarına gereksinim duymaktadırlar. Metal iyonları, bağlı bir su molekülünü aktive ederek nötr pH'da bir nükleofilik hidroksit iyonu oluşturarak enzim katalizini etkiler, böylece oluşan nükleofilik ataklara karşı oldukça hassas olan negatif yükleri stabilize eder (Ezugwu ve ark. 2016).

Yapılan çalışmada da *B. subtilis* E6-5 proteazının manganez ile aktive olması metalloproteazların aktif merkezinde katalizden sorumlu bileşenlerden birinin de manganez olması olarak yorumlanabilir. EDTA inhibisyonunu, metalloenzimlerin aktif merkezindeki metal iyonlarını şelatlaması ile sağlamaktadır. Çünkü enzimin aktif merkezinde bulunan metal iyonları, enzim stabilitesi ve yapının bütünlüğünün sağlanması açısından çok önemlidir. EDTA tarafından, enzimin aktif merkezinden metal iyonunun çıkarılması, enzimin aktivitesini ortadan kaldırmaktadır (Chatterjee ve ark. 2015). Buna ek olarak EDTA, enzimin aktivitesinde kofaktör olarak görev yapan ortamda bulunan metal iyonlarında şelatlanması ile etkisini gösterebilmektedir (Singh ve ark. 2013). Bir enzimin EDTA ile inhibe olması enzimin aktivitesi için iki değerlikli katyon iyonlarına ihtiyacının olduğu dolayısıyla metalloproteaz ailesine dahil olduğunu göstermektedir. Metal iyonları genellikle elektron alarak, nadir olarak da elektron vererek çeşitli enzimleri aktive veya inaktive etmektedir (Palmer ve Bonner 2007, Singh ve ark. 2017). Metal iyonu sayesinde enzim elektriksel açıdan yüklü hale gelirse, enzimin aktivitesi artmaktadır (Riordan 1977). Metal iyonları enzimin aktivasyonunu ya enzim ve substratın bağlanmasını sağlayan bir köprü (enzim-metal-substrat) gibi davranarak ya da reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek sağlamaktadır. Buna ek olarak metal iyonları enzimin tersiyer yapısının stabilizasyonunu sağlayabilmektedir (Singh ve ark. 2017). Ca^{2+} iyonu ile aktive olup, EDTA ile inhibe olan ve bu sebeple metalloproteaz sınıfına dahil edilen birçok çalışma mevcuttur (Wang ve ark. 2009, Wu ve ark. 2011).

S-blok metalleri (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Li^{3+}) genellikle iyonik bağlarla ligandlara zayıf bir şekilde bağlanmaktadır. Bağlanma iyonik olduğu için metal iyonları kolayca yer değiştirebilmektedir. Bu sonuç, s-blok metal iyonlarının enzimi termal denatürasyona karşı koruduğunu ve yüksek sıcaklıklarda enzimin aktif olan 3 boyutlu konformasyonunu sağlamada önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (Donaghy ve McKay 1993). Bu sebeple birçok enzimin, Ca^{2+} , Mg^{2+} gibi katyonların düşük konsantrasyonları ile spesifik olarak stabilize edildiği bilinmektedir. Çünkü bu katyonlar, çözeltideki çözülmüş oksijeni azaltarak, tiyol gibi grupları oksidasyona karşı bir miktar korumaktadır (Silva ve ark. 2018). Dolayısıyla K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Li^{3+} iyonları etkisi ile *Bacillus subtilis* E6-5 proteazının aktivitesinin iyi veya orta derecede artması bu şekilde açıklanabilir. Proteaz enzimlerinin aktivitesinin s-blok metalleri (Ca^{2+} , Mg^{2+}) etkisi ile arttığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Oberoi ve ark. 2001, Patel ve ark. 2006, Arulmani ve ark. 2007, Jaouadi ve ark. 2008, Giri ve ark. 2011). Ayrıca, proteazın termal stabilitesinin Ca^{2+} varlığında arttığı saptanmıştır. Bu sebeple bazı kaynaklarda Ca^{2+} iyonu, stabilizasyon sağlayıcı ajan olarak ifade edilmektedir. Ca^{2+} iyonunun bu etkisi protein içi etkileşimleri kuvvetlendirmesi ve proteinin içindeki belirli bölgelere bağlanarak otoliz ve sıcaklık etkisi ile meydana gelebilecek 3 boyutlu yapıdaki çözümleri önlemesi olarak açıklanmaktadır (Shah ve ark. 2010, Si ve ark. 2018).

Bacillus subtilis E6-5 suşunun proteaz enziminin Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} gibi d-blok metalleri ile aktivitesinin azalması bu metallerin kararlı kompleksler vermek üzere tercihen kovalent bağlarla enzime bağlanması sebebi ile gerçekleşmiş olabilir. Çünkü d-blok metalleri genellikle enzimlere geri dönüşü olmayan bir şekilde bağlanarak aktivitede azalmaya sebep olmaktadır (Shah ve ark. 2010).

Anyonik bir sürfaktan olan SDS, proteinlerin denatüre olmasına, doğal konformasyonunu kaybetmesine hatta alt birimlerinin birbirinden ayrışmasına sebep olmaktadır. Redükten bir ajan olan 2- β -mercaptoetanol ise proteinlerin yapısındaki disülfid bağlarını indirgeyerek ve proteinlerin "random coil" konfigürasyonuna dönmesine neden olmaktadır. Bu sebeple *Bacillus subtilis* E6-5 proteazında da görüldüğü üzere SDS ve 2- β -merkaptoetanol enzimleri genellikle inhibe etmektedir. Fakat 2- β -mercaptoetanol ve SDS ile inhibe olmayan proteazlarda vardır. Farhadian ve arkadaşları (2015), *Bacillus subtilis* DR8806 suşundan izole ettikleri proteazının aktivitesinin 2- β -merkaptoetanol'den etkilenmediğini bildirmiştir. Hatta Rehman ve arkadaşları (2017),

Bacillus subtilis KT004404 şusundan izole ettikleri proteazın aktivitesinin belirli oranlardaki SDS ve 2- β -mercaptoetanol etkisi altında aktivitesinin arttığı bildirilmiştir.

Rai ve Mukherjee (2009), *Bacillus subtilis* DM-04 suşu proteazının aktivitesinin Fe²⁺ ve Zn²⁺ iyonu etkisi ile arttığını, Mn²⁺ ve Ca²⁺ ve iyonları etkisi ile azaldığını, Mg²⁺ ve Cu²⁺ iyonları etkisi ile tamamen inhibe olduğunu rapor etmiştir. Proteazın aktivitesinin SDS'ten etkilenmediği fakat EDTA'nın enzim aktivitesini azalttığını rapor etmiştir.

Giri ve arkadaşları (2011), *Bacillus subtilis* VSG-4 suşunun proteazın aktivitesinin s-bloğu metallere olan Ca²⁺ ve Mg²⁺ ile arttığını, K⁺, Na⁺, Mn²⁺ ile değişmediğini saptamıştır. Buna ek olarak enzimin SDS varlığında ise aktivitesini koruduğunu, EDTA varlığında ise aktivitesinin az miktarda düştüğünü rapor etmiştir.

Vijayaraghavan ve arkadaşları (2012), *Bacillus subtilis* W suşu proteazının aktivitesinin Ca²⁺ iyonu varlığında arttığını, Mg²⁺ ve Mn²⁺ iyonları ile pek değişmediğini, Cu²⁺, Fe²⁺ ve Zn²⁺ iyonlarının ise enzimi inhibe ettiğini rapor etmiştir.

Vijayaraghavan ve arkadaşları (2014), *B. cereus* AT suşunun proteazının aktivitesinin Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ iyonları ile arttığını, Mn²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ azaldığını rapor etmiştir.

Uddin ve arkadaşları (2014), *Bacillus* sp. suşu proteazının aktivitesinin Mg²⁺ iyonu etkisi ile arttığını, Na⁺ ve K⁺ iyonları ve EDTA etkisi ile değişmediğini, Zn²⁺ etkisi ile azaldığını, 2- β -merkaptoetanol etkisi ile inhibe olduğunu saptamıştır.

Chatterjee ve arkadaşları (2015), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu proteazının aktivitesinin EDTA ve SDS'ten etkilenmediğini saptamıştır.

Ahmetoglu ve arkadaşları (2015), *Bacillus* sp. KG5 şusundan izole edilen proteazın Ca²⁺ ve Mg²⁺, Mn²⁺ iyonları ile aktive olurken, Cu²⁺, Zn²⁺ iyonları, SDS ve metal iyonu şelatlayıcısı olan EDTA ile inhibe olduğunu saptamıştır.

Farhadian ve arkadaşları (2015), *Bacillus subtilis* DR8806 şusundan izole edilen proteazın aktivitesinin K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺ iyonları etkisiyle arttığını, Ba²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ iyonları etkisiyle azaldığını, Na⁺, Mn²⁺, iyonlarının enzimin aktivitesi üzerine etkisinin olmadığını belirlemiştir. Enzimin aktivitesinin SDS etkisi ile azaldığı, EDTA ve 2- β -merkaptoetanol'den etkilenmediğini belirlemiştir.

Sathishkumar ve arkadaşları (2015), *Bacillus subtilis* GACAS8 suşunun proteazının, aktivitesinin Mg^{2+} ve Ca^{2+} iyonları ile arttığını, EDTA ile inhibe olurken, SDS'e karşı dirençli olduğunu saptamıştır.

Anandharaj ve arkadaşları (2016), *Bacillus alkalitelluris* TWI3 suşu proteazının aktivitesinin Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} iyonları ile artarken, Zn^{2+} , K^+ , Fe^{2+} iyonları ile azaldığını, EDTA ile tamamen inaktive olduğu bildirmiştir.

Uttatree ve Charoenpanich (2016), *Bacillus subtilis* BUU1 suşu proteazının aktivitesinin SDS ve EDTA'dan az etkilendiğini rapor etmiştir.

Hussain ve arkadaşları (2017), *Bacillus subtilis* suşu proteazının aktivitesinin Ca^{2+} ile arttığını, Mg^{2+} ile değişmediğini, Cu^{2+} iyonu ile azaldığını rapor etmiştir.

Rehman ve arkadaşları (2017), *Bacillus subtilis* KT004404 suşunun proteazının aktivitesinin SDS ve 2- β -mercaptoetanol kullanımı arttığını rapor etmiştir.

Rehman ve arkadaşları (2017), *Bacillus subtilis* KT004404 suşunun proteazının aktivitesinin Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ile arttığını, Cu^{2+} , Fe^{2+} ve EDTA etkisi ile azaldığını gözlemlemiştir.

Singh ve arkadaşları (2017), *Bacillus subtilis* K-1 suşu proteazının aktivitesinin Ca^{2+} iyonu ile arttığını, K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Mn^{2+} ile değişmediğini, Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} etkisiyle azaldığını rapor etmiştir. Buna ek olarak enzimin PMSF etkisiyle inhibe olduğunu, EDTA ve SDS'in ise aktiviteyi çok az bir miktar azalttığını rapor etmiştir.

Si ve arkadaşları (2018), *Bacillus subtilis* FBL-1 suşunun proteazının Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , K^+ iyonları etkisi ile aktivitesinin arttığını, EDTA etkisi ile tamamen inhibe olduğunu saptamıştır. Buna ek olarak aktivitesinin SDS ve 2- β -merkaptoetanol etkisi ile azaldığı rapor edilmiştir.

Putatunda ve arkadaşları (2018), *Bacillus* sp. HD292 suşundan izole edilen proteazın aktivitesinin Ca^{2+} iyonu etkisi ile artarken, Fe^{3+} , K^+ iyonları etkisi ile azaldığını saptamıştır.

B. subtilis DM-04 suşu proteazının K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 59 μ M ve 336 μ g/dk olduğunu rapor edilmiştir (Rai ve Mukherjee 2010).

Bacillus sp. SM2014 suşu proteazının K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 0,57 mg/mL ve 445,23 U/mL olduğu rapor edilmiştir (Jain ve ark. 2012).

B. megaterium AU02 suşu proteazının K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 0,722 mg/mL ve 0,018 U/mL olduğu rapor edilmiştir (Priya ve ark. 2014).

B. subtilis DR8806 suşu proteazının K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 2,499 mg/mL ve 1183 μ M/dk olduğu belirlenmiştir (Farhadian ve ark. 2015).

B. alkalitelluris TWI3 suşu proteazının K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 38 mg/mL ve 253 U/mL olduğu rapor edilmiştir (Anandharaj ve ark. 2016).

B. subtilis BUU1 suşu proteazının K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 0,2 mg/mL ve 220,76 μ mol/dk olduğu saptanmıştır (Uttatree ve Charoenpanich 2016).

B. subtilis suşu proteazının K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 0,09 mg/mL ve 200 U/mL olduğu rapor edilmiştir (Hussain ve ark. 2017).

B. subtilis K-1 suşu proteazının K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 0,14 mg/mL ve 1176 mg/dk olduğunu saptamıştır (Singh ve ark. 2017).

B. licheniformis suşu proteazının K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 29 μ M ve 104,9 U/mL olduğu belirlenmiştir (Bashir ve ark. 2018).

Bacillus sp. HD292 suşu proteazının K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 2,7 mg/mL ve 2857 μ M/dk olduğu saptanmıştır (Putatunda ve ark. 2018).

Bacillus cinsi kaynaklı proteazların 8-90 kDa gibi geniş bir aralıkta moleküler ağırlığa sahip olduğu bilinmektedir (Kato ve ark. 1992, Devanadera ve ark. 2016). *Bacillus* kaynaklı metalloproteazların ise moleküler ağırlığının genellikle 40-60 kDa aralığında olduğu bilinmektedir (Sari 2011). Fakat bunların büyük çoğunluğu 50 kDa veya daha düşük moleküler ağırlığa sahiptir (Sousa ve ark. 2007, Vijayaraghavan ve ark. 2012). Bazı istisnai durumlar da görülmektedir. Örneğin, Devanadera ve arkadaşları (2016) tarafından izole edilen *Bacillus subtilis* USTCMS 1011 suşunun ürettiği alkalen proteazın ise 8 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu saptanmıştır. *Bacillus subtilis* tarafından üretilen

proteazlar genellikle 18-35 kDa aralığında moleküler ağırlığa sahiptir. Bazı istisnai durumlar da görülmektedir. Örneğin, *Bacillus subtilis* (natto) proteazının moleküler ağırlığının 90 kDa olduğu rapor edilmiştir (Kato ve ark. 1992). *Bacillus subtilis* USTCMS 1011 suşunun nötral proteazın 65.4 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu bildirilmiştir (Devanadera ve ark. 2016).

B. subtilis GACAS8 suşu kaynaklı proteazın 41 kDa aralığında moleküler ağırlığa sahip olduğu rapor edilmiştir (Sathishkumar ve ark. 2015).

B. subtilis BUU1 suşu kaynaklı proteazın 32 kDa aralığında moleküler ağırlığa sahip olduğu rapor edilmiştir (Uttatree ve Charoenpanich 2016).

B. subtilis BLK-1.5 suşu kaynaklı proteazın 38 kDa aralığında moleküler ağırlığa sahip olduğu rapor edilmiştir (Ali ve ark. 2016).

B. subtilis suşu kaynaklı proteazın 15 kDa aralığında moleküler ağırlığa sahip olduğu rapor edilmiştir (Hussain ve ark. 2017).

B. subtilis KT004404 suşu kaynaklı proteazın 28.2 kDa aralığında moleküler ağırlığa sahip olduğu rapor edilmiştir (Rehman ve ark. 2017).

B. subtilis FBL-1 suşu kaynaklı proteazın 37.6 kDa aralığında moleküler ağırlığa sahip olduğu rapor edilmiştir (Si ve ark. 2018).

B. subtilis AKAL7 suşu kaynaklı proteazın 40 kDa aralığında moleküler ağırlığa sahip olduğu rapor edilmiştir (Hakim ve ark. 2018).

B. subtilis K-1 suşu kaynaklı proteazın 42 kDa aralığında moleküler ağırlığa sahip olduğu rapor edilmiştir (Singh ve ark. 2017).

Enzimlerin kullanılabilirliği depolanma ve endüstriyel uygulamalar sırasındaki stabilitelere bağlıdır. Bu çalışmada *Bacillus subtilis* E6-5 suşunun ham enziminin depolanma sıcaklığına bağlı olarak stabilitesi saptanmıştır. Yapılan çalışmada en iyi depolama sıcaklığı olarak -20 °C belirlenmiştir. Bu sıcaklıkta depolanan enzimin aktivitesinin 3. ay sonunda % 83'ünü, 6. ay sonunda ise % 57'sini koruduğu tespit edilmiştir.

Proteazlar, dericilikte kıl ve diğerk istenmeyen yapısal proteinlerin ve protein yapısında olan kirlerin yapısının parçalanmasını ve giderilmesini; deri işleme süresinin azaltılmasını; derinin esnekliğini ve sağlamlığını artırılması gibi pozitif etkilere sahiptir (Thorstensen 1993). Pratikte proteazlar sadece yünü değerli hayvanların derilerinden kıllarının giderilmesinde, yünü değerli olmayan hayvan derilerinde ise sadece kıl köklerinin deriden giderilmesinde yani kimyasal yöntemle yardımcı olarak kullanılmaktadır. Literatürde az sayıda çalışma da ise kireç ve sülfür kullanılmadan yalnızca alkalen proteazlar kullanılarak gerçekleştirilmiş kıl giderimi denemeleri bulunmaktadır (Khandelwal ve ark. 2015). Kimyasal maddeler yerine kıl gideriminde enzim preparatlarının kullanımı yeni olmasa da daha iyi aktiviteye ve stabiliteye sahip yeni odakların arayışı sebebiyle yapılan araştırmalar halen daha çok dikkat çekicidir.

Bu çalışmada yeni izolat *B.subtilis* E6-5'dan üretilen ham ve konsantre edilen proteaz enziminin keçi, koyun ve dana deri örneklerindeki kılları giderme potansiyeli araştırılmıştır. Ayrıca, kimyasal madde kullanılarak da kıl giderme işlemi yapılmış ve sonuçlar enzimatik işlem ile karşılaştırılmıştır.

Enzim uygulaması ile kılları giderilmiş olan derilerin hepsinin kimyasal uygulaması ile kılları giderilmiş olan derilere göre daha yumuşak, ipeksi, esnek, beyaz ve lekesiz olduğu saptanmıştır. Kimyasal madde (kireç ve zırnık) ile muamele edilmiş derilerin ise çok sert, sıkışmış ve küçülmüş olduğu buna ek olarak kılları çekilirken tam olarak kökten gelmediği için koyu renkli ve temiz olmayan bir yüzeye sahip olduğu görülmüştür. Dana derisine konsantre enzim (6 809 U/mL) uygulanmasında kılların 24. saatte, kimyasal madde uygulanmasında ise 42. saate döküldüğü belirlenmiştir. Keçi derisinde konsantre enzim (6 809 U/mL) uygulanması sonucu kılların 18. saatte, kimyasal madde uygulanmasında ise 36. saate döküldüğü saptanmıştır. Koyun derisinde konsantre enzim (6 809 U/mL) uygulanmasında kılların 24. saatte, kimyasal madde uygulandığında ise 42. saate döküldüğü görülmüştür. Konsantre enzim ham enzimden daha etkili olmuştur. Yapılan çalışmalarda enzimatik işlem uygulanmış derilerin düzgün bir şekilde açıldığı görülmüştür. Bu durum proteazın kıl ve istenmeyen yapısal proteinleri gidermesine ve derinin su alımını artırarak esnekliğini sağladığı düşünülebilir. Buna benzer bir durum Thorstensen (1993) tarafından da rapor edilmiştir.

Bu çalışmada enzimatik ve kimyasal muamele sonucu elde edilen koyun, keçi, dana deri örnekleri ve kontrollerinin histolojik analizleri de gerçekleştirilmiştir. Enzimle muamele edilen hiçbir hayvan derisi kesitinde epidermis, salgı bezi, kıl folikülü, kıl kalıntısına rastlanmamıştır. Sadece dana derisi kesitinde kan damarı gözlenmiştir. Kimyasalla muamele edilen tüm hayvan derisi kesitlerinde salgı bezi, kıl folikülü ve kıl kalıntısı gözlenmiştir. Kimyasalla muamele edilen keçi derisinde bunlara ek olarak kan damarı gözlenmiştir. Kontrol grubunda ise salgı bezi, kan damarı, kıl folikülü, kıl kalıntısı ve kıl gövdesine ek olarak epidermis yapısı da gözlenmiştir. Enzim ile muamele sonucunda kollajen yapısındaki bozulmaların en fazla koyun derisinde, en az ise dana derisinde olduğu gözlenmiştir. Kollajen yapısındaki bozulmanın en fazla koyunda olmasının sebebi koyunun ter ve yağ bezlerinin fazla gelişmiş olması, dana ve keçiye göre daha yumuşak bir deri yapısına sahip olması olabilir.

Enzimatik olarak kıl giderimi için gerçekleştirilmiş olan araştırmalar mevcuttur.

Bacillus subtilis suşu proteazının pH 11.0 ve 45°C’de keçi derisindeki kılları 7 saatte giderdiği belirlenmiştir (Arunachalam ve Saritha 2009).

Bacillus licheniformis N-2 suşu proteazının keçi derisindeki kılları 40°C’de ve 100 rpm çalkalama hızında 12 saatte giderdiği rapor edilmiştir (Nadeem ve ark. 2010).

Bacillus subtilis VV suşu proteazının (16 200 U/g) keçi derisindeki kılları oda sıcaklığı ve pH’ 10.0’da 16 saatte giderdiği rapor edilmiştir (Vijayaraghavan ve ark. 2012).

Bacillus subtilis AKRS3 suşu proteazının (42,75 U/mL) keçi ve koyun derisindeki kılları pH 9.0 ve 37°C’de 12 saatte giderdiği rapor edilmiştir (Ravishankar ve ark. 2012).

Bacillus cereus AT suşu proteazının (11 400 U/g) keçi derisindeki kılları oda sıcaklığı ve pH 9.0 değerinde 18 saatte giderdiği rapor edilmiştir (Vijayaraghavan ve ark. 2014).

Bacillus subtilis PD4 suşunun proteazının keçi derisindeki kılları 24 saatte giderdiği saptanmıştır (Vanitha ve ark. 2014).

Bacillus sp. SB12 suşunun proteazının (159 U/mL), keçi derisindeki kılları 37°C ve pH 9.0’da 12 saatte giderdiği rapor edilmiştir (Briki ve ark. 2016).

Bacillus alkalitelluris TWI3 suşunun proteazının (50 U/mL) keçi derisi üzerindeki kılları %10 oranında distile su içeren glisin-NaOH tamponu (pH 10.0) içerisinde ve 37°C’de 24 saatte giderdiği bildirilmiştir (Anandharaj ve ark. 2016).

Bacillus subtilis KT004404 suşunun proteazının (696 U/mL) keçi derisindeki kılları pH 6.0 ve 55°C’de 24 saatte giderdiği bildirilmiştir. Fakat bu proteazın kollajenolitik özelliği gösterdiği için keçi derisinin sindirilmesine neden olduğu ve derinin kalitesinin düştüğü belirtilmiştir (Rehman ve ark. 2017).

Enzimatik olarak kılları giderilmiş olan deride kimyasal ile muamele edilen deriye kıyasla daha temiz, pelt rengi daha beyaz, pürüzsüz, yumuşak ve ipeksi olmaktadır (Anandharaj ve ark. 2016).

Kimyasal yöntem deriyi sertleştirmekte ve koyulaştırmaktadır. Zırnık ve kireç uygulanan derinin lekeli, koyu veya kırık beyaz, sadece enzim uygulanan derinin renginin ise bembeyaz olduğunu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. *Bacillus subtilis* K2 (Hameed ve ark. 1999), *Bacillus cereus* MCM B-326 (Zambare ve ark. 2007), *Bacillus cereus* VITSN04 (Sundararajan ve ark. 2011), *Bacillus subtilis* PD4 (Vanitha ve ark. 2014) kaynaklı proteaz enzimleri ile yapılan kıl gideriminde kimyasal yöntem nazaran daha temiz ve lekesiz bir deri elde edildiği vurgulanmıştır. Bu durumun enzimatik yöntemde kılların kırılmak yerine kökten çıktığı yani deride kıl kökü kalıntısı kalmadığı; kireç ve zırnık uyguladıkları deride ise kılların kökü kalıntısı kaldığı için olduğu rapor edilmiştir. Buna ek olarak *Bacillus subtilis* K2 suşunun proteazının uygulandığı keçi derilerinin enzim sayesinde daha porlu bir yapıya kavuştuğu ve bu sayede derilerin boyayı almalarının kolaylaştığı belirtilmiştir (Hameed ve ark. 1999). Zambare ve arkadaşları (2007) ise *Bacillus cereus* MCM B-326 suşundan izole edilen proteazın dana derisindeki kılları parçalanmadan giderdiğini, bu sayede temiz bir yüzey elde edildiğini, kimyasal yöntem ile kılların parçalandığını ve enzimatik yöntem kullanılarak kılların çeşitli amaçlarda değerlendirilebileceğine dikkat çekmiştir.

Bazen kimyasal kıl giderimi yönteminde iyi sonuç alabilmek için yüksek sıcaklık kullanılmaktadır. Bu sebeple enzimlerin kimyasal kıl gideriminde yardımcı olarak kullanılması durumunda yüksek sıcaklık altında aktivitesini kaybetmeyecek olan termostabil proteazlara ihtiyaç vardır (Silva ve ark. 2018).

Bu çalışma sonucunda *Bacillus subtilis* E6-5 suşundan üretilen proteaz enzimi için ortam koşulları optimize edilerek yeni ve verimli bir modifiye üretim ortamı elde edilmiş, enzimin saflaştırılması sonucu karakterize edildiğinde enzimin termostabil olduğu, nötral proteaz olmasına rağmen geniş bir alkali pH değeri aralığında da yüksek aktivite gösterdiği ve ayrıca düşük K_m 'e sahip olması nedeni ile endüstrinin farklı alanlarında da kullanım potansiyeli olabileceği, derideki kılların enzimatik olarak uzaklaştırılmasında kimyasal işlemlere göre daha etkili olduğu ve böylece en kirletici sanayi dallarından biri olan dericilikte güçlü bir kullanım potansiyeline sahip olabileceğini düşünülmektedir. Yurtdışından temin edilen proteaz enziminin geniş çapta üretilmesi ve böylece ülke ekonomisine katkıda bulunması mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Adinarayana, K., Ellaiah, P., Prasad, D.S. 2003.** Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 4(4): 440-448.
- Aehle, W. 2006.** Enzymes in industry: products and applications. 2nd, Completely revised edition, John Wiley & Sons, New Jersey, USA, 508 pp.
- Afşar, A., Gülümser, G., Mutlu, M.M., Özgünay, H. 2003.** Enzimatik etki ile kromlu derilerdeki kırıxıklıkların giderilmesi ve işlemin dayanım özellikleri üzerine etkilerinin araştırılması. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 40(2): 137-144.
- Agasthya, A.S., Sharma, N., Mohan, A., Mahal, P. 2013.** Isolation and molecular characterisation of alkaline protease producing *Bacillus thuringiensis*. *Cell Biochem. Biophys.*, 66: 45-51.
- Ahmetoglu, N., Bekler, F., Acer, O., Guven, R., Guven, K. 2015.** Production, purification and characterisation of thermostable metallo-protease from newly isolated *Bacillus* sp. KG5. *Eurasia J. Biosci.*, 9: 1-11.
- Akbulut, T., Bilsel, T., Uyarel, H., Terzi, S., Sayar, N., Aydın, A., Dayı, Ş, Çiloğlu, F., Bağırtan, B., Peker, İ., Yeşilçimen, K. 2004.** Anjiyotensin dönüştürücü enzim gen polimorfizminin erken koroner arter hastalığı gelişimindeki rolü. *Türk Kardiyol. Dern. Arş.*, 32: 23-27.
- Akbulut, U. 2012.** Deri tabaklamasının sırlarını Sümerler'den öğrendik. <http://www.uralakbulut.com.tr/wp-content/uploads/2009/11/DER%C4%B0-TABAKLAMANIN-SIRLARINI-S%C3%9CNERLERDEN-%C3%96%C4%9EREND%C4%B0K-MAYIS-2012.pdf> - (Erişim tarihi: 20.09.2019).
- Akın, N. 2003.** Peynirin olgunlaşmasında enzimlerden kaynaklanan proteoliz. *Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi Derg.*, 3: 37-45.
- Akyüz, A., Bilek, S. 2018.** Protein çöktürme yöntemlerinin karşılaştırılması. *Çukurova J. Agric. Food Sci.*, 33(2): 83-92.
- Alamdari, E.K., Ehsani, M.R. 2017.** Antimicrobial peptides derived from milk: a review. *J. Food Biosci. Technol.*, 7: 49-56.
- Alessandro, R., Silvia, O., Adriano, B. 2003.** Dehairing activity of extracellular proteases produced by keratinolytic bacteria. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 78: 855-859.
- Alfa, M.J., Jackson, M. 2001.** A new hydrogen peroxide-based medical device detergent with germicidal properties: comparison with enzymatic cleaners. *Am. J. Infect. Control.*, 29(3): 168-177.
- Ali, N., Ullah, N., Qasim, M., Rahman, H., Khan, S.N., Sadiq, A., Adnan, M. 2016.** Molecular characterization and growth optimization of halo-tolerant protease producing *Bacillus subtilis* Strain BLK-1.5 isolated from salt mines of Karak, Pakistan. *Extremophiles*, 20: 395-402.

Amin, K.A., Hassan, M.S., Awad, E., Hashem, K.S. 2011. The protective effects of cerium oxide nanoparticles against hepatic oxidative damage induced by monocrotaline. *International Journal of Nanomedicine*, 6: 143-149.

Anandharaj, N., Sivasankari, B., Siddharthan, N., Rani, R.P., Sivakumar S. 2016. Production, purification, and biochemical characterization of thermostable metallo-protease from novel *Bacillus alkalitelluris* TWI3 isolated from tannery waste. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 178: 1666-1686.

Anbu, P. 2013. Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A). *Int. J. Biol. Macromol.*, 56: 162-168.

Annamalai, N., Rajeswari, M.V., Balasubramanian, T. 2014. Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveayuensis* CAS 5 using marine wastes. *Food Bioprod. Process.*, 92: 335-342.

Anonim, 1994. Detergents 'are bad for health and environment'. <https://www.independent.co.uk/news/uk/detergents-are-bad-for-health-and-environment-study-says-people-wash-clothes-too-often-1422265.html>-(Erişim tarihi: 24.01.2020).

Anonim, 1999. Affirmation of GRAS status as direct food ingredients. <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-1999-04-23/pdf/99-10011.pdf>-(Erişim tarihi: 04.12.2019).

Anonim, 2011. Mesleki eğitim ve oğretim sisteminin geliştirilmesi projesi, Tekstil teknolojisi, keçeleşmezlik, tutum ve apre kombinasyonu. http://megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Ke%C3%A7ele%C5%9Fmezlik%20Ve%20Tutum%20Apre%20Kombinasyonu.pdf-(Erişim tarihi: 25.01.2020).

Anonim, 2012. Manual for the employ of deodorised poultry manure in the bating phase. Life podeba project. LIFE10 ENV/IT/000365, deliverable action No:10. http://ec.europa.eu/environment/life/project/Projects/index.cfm?fuseaction=home.showFile&rep=file&fil=PODEBA_manual_EN.pdf-(Erişim tarihi: 29.09.2019).

Anonim, 2014. Rehber döküman. Deri üretimi teknolojisi. <http://en.kimyasal.boun.edu.tr/webpages/courses/leathertechnology/deri14.html>-(Erişim tarihi: 15.06.2019).

Anonim, 2015a. De-hairing hide without polluting. <https://www.downtoearth.org.in/news/dehairing-hide-without-polluting-30007>-(Erişim tarihi: 28.11.2019).

Anonim, 2015b. Tanning (leather). New world encyclopedia. [https://www.newworldencyclopedia.org/entry/Tanning_\(leather\)#cite_note-Possehl-1](https://www.newworldencyclopedia.org/entry/Tanning_(leather)#cite_note-Possehl-1)-(Erişim tarihi: 20.09.2019).

Anonim, 2015c. De-hairing hide without polluting. <https://www.downtoearth.org.in/news/dehairing-hide-without-polluting-30007>-(Erişim tarihi: 28.11.2019).

Anonim, 2016. Proteases for biocatalysis – Novozymes. https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document-library/Advance-your-business/Pharma/Biocatalysis_brochure_Proteases.pdf-(Erişim tarihi: 24.12.2019).

Anonim, 2017a. The chemistry of the leather industry. <https://nzic.org.nz/app/uploads/2017/10/5C.pdf>-(Erişim tarihi: 24.02.2019).

Anonim, 2017b. Ham deri işleme tesisleri-çevresel etkiler ve alınacak önlemler kılavuzu. Çevre ve şehircilik bakanlığının ÇED alanında kapasitesinin güçlendirilmesi için teknik yardım projesi. <http://www.hlccevre.com/images/PDF/sektorel-kilavuzlar/ham-deri-isleme-tesisleri.pdf>-(Erişim tarihi: 01.03.2019).

Anonim, 2018. Global enzymes market expected to reach \$10,519 Million by 2024. <https://www.prnewswire.com/news-releases/global-enzymes-market-expected-to-reach-10-519-million-by-2024-898959866.html>-(Erişim tarihi: 12.12.2019).

Anonim, 2019a. Enzymes market by type (protease, carbohydrase, lipase, polymerases and nucleases, and other types), by source, by reaction type, by formulation, by application, and segment forecasts, 2017-2026. <https://www.reportsanddata.com/report-detail/enzymes-market->(Erişim tarihi: 11.12.2019).

Anonim, 2019b. Leather manufacturing. <https://www.satrap.com/spotlight/article.php?id=194->(Erişim tarihi: 05.12.2019).

Anonim, 2019c. [https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC3/-](https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC3/)(Erişim tarihi: 27.12.2019).

Anonim, 2019d. <https://www.ebi.ac.uk/merops/about/glossary.shtml->(Erişim tarihi: 28.12.2019).

Anonim, 2019e. <https://medcraveonline.com/PPIJ/proteases-naturesquos-destroyers-and-the-drugs-that-stop-them.html->(Erişim tarihi: 11.12.2019).

Anonim, 2019f. <https://www.marketsandmarkets.com/market-reports/feed-enzyme-market-1157.html->(Erişim tarihi: 29.05.2019).

Anonim, 2019g. Leather manufacturing, <https://www.satrap.com/spotlight/article.php?id=194->(Erişim tarihi: 05.12.2019).

Anonim, 2020a. Industrial enzyme market-growth, trends, and forecast (2020-2025). <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/industrial-enzymes-market->(Erişim tarihi: 17.07.2020).

Anonim, 2020b. <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/rules.html->(Erişim tarihi: 27.05.2020).

Anonim, 2020c. [https://www.rcsb.org/-](https://www.rcsb.org/)(Erişim tarihi: 22.05.2020).

Anonim, 2020d. <https://derivesen.com/turkiyede-dericilik-sektoru->(Erişim tarihi: 29.05.2020).

Anonim, 2020e. <https://www.azurlis.co.nz/pages/anatomy-of-your-skin-some-of-its-properties->(Erişim tarihi: 29.05.2020).

Anonim, 2020f. <https://rejuvenatehairtransplant.com/blog/hair-structure/>-(Erişim tarihi: 29.05.2020).

Anson, M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22(1): 79-89.

Anwar, A., Saleemuddin, M., 1998. Alkaline proteases: a review., *Bioresource Technology*, 64: 175-183.

Arrieta, M.C., Leskiw, B.K., Kaufman, W.R. 2006. Antimicrobial activity in the egg wax of the African cattle tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol.*, 39: 297-313.

Arshad, Z.I., Amid, A. 2014. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 98(17): 7283-7297.

Arulmani, M., Aparanjini, K., Vasanthi, K., Arumugam, P., Arivuchelvi, M., Kalaichelvan, P.T. 2007. Purification and partial characterization of serine protease from thermostable alkalophilic *Bacillus laterosporus*-AK1. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23: 475-481.

Arunachalam, C., Saritha, K. 2009. Protease enzyme: an eco-friendly alternative for leather industry. *Indian Journal of Science and Technology*, 2(12): 29-32.

Arya, A., Kumar, A., Jha, J. 2018. Understanding enzymes: an introductory text. First Edition, Drawing Pin Publishing, New Delhi, India.

Asha, B., Palaniswamy, M. 2018. Optimization of alkaline protease production by *Bacillus cereus* FT 1 isolated from soil. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(2): 119-127.

Aylangan, A., Öztan, A. 2008. Hayvansal gıda sanayisi yan ürünleri kullanılarak protein hidrolizatları üretimi. Türkiye 10. Gıda Kong. 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.

Babe, L.M., Craik, C.S. 1997. Viral proteases: evolution of diverse structural motifs to optimize function. *Cell*, 91: 427-430.

Bacon, C.L., Wilkinson, M., Jennings, P.V., Fhaolain, I.N., O'Cuinn, G. 1993. Purification and characterisation of an aminotripeptidase from cytoplasm of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2. *International Dairy Journal*, 3(2): 163-177.

Balasubramanian, S., Pugalenti, V., 2000. A comparative study of the determination of sulphide in tannery waste water by ion selective electrode (ISE) and iodimetry. *Water Res.*, 34: 4201-4206.

Barrett, A J., McDonald, J.K. 1986. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochem. J.*, 237(3): 935.

Barrett, A., Rawlings, N., Woessner, J. 2012. Handbook of proteolytic enzymes, 3rd Edition. *Elsevier*, Academic Press, London, UK, 4094 pp.

Basheer, T., Umesh, M. 2018. Valorization of tannery solid waste materials using microbial techniques: microbes in tannery solid waste management: Handbook of research on microbial tools for environmental waste management. Eds.: Pathak, V., Navneet., pp. 127-145.

- Bashir, F., Asgher, M., Hussain, F., Randhawa, M.A. 2018.** Development and characterization of cross-linked enzyme aggregates of thermotolerant alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *Int. Journal of Biological Macromolecules*, 113: 944-951.
- Baweja, M., Tiwari, R., Singh, P.K., Nain, L., Shukla, P. 2016.** An alkaline protease from *Bacillus pumilus* MP 27: functional analysis of its binding model toward its applications as detergent additive. *Front. Microbiol.*, 7: 1-14.
- Beg, Q.K., Gupta, R. 2003.** Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavenensis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(2): 294-304.
- Belmessikh, A., Boukhalfa, H., Mechakra-Maza, A. 2013.** Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*, Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, 44: 377-385.
- Bergmann, M., Ross, W.F. 1936.** *J. Biol. Chem.*, 114: 717-726.
- Berzelius, J.J. 1836.** *Annl. Chim. Phys.*, 61: 146.
- Bharati, S.L., Chaurasia, P. K. 2018.** Research advancements in pharmaceutical, nutritional, and industrial enzymology advances in medical technologies and clinical practice. IGI Global, Hershey, Dauphin, Pennsylvania, USA, 549 pp.
- Bhat, Z.F., Kumar, S., Bhat, H.F. 2015.** Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9): 5377-5392.
- Bhunja, B., Dutta, D., Chaudhuri, S. 2010.** Selection of suitable carbon, nitrogen and sulphate source for the production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* NCIM-2042. *Not. Sci. Biol.*, 2(2): 56-59.
- Bienkiewicz, K. 1983.** Physical Chemistry of Leather Making. Robert Krieger Publishing, Malabar, Florida, USA, 541 pp.
- Blaney, M., Shen, V., Kerner, J.A., Jacobs, B.R., Gray, S., Armfield, J., Semba, C.P. 2006.** Alteplase for the Treatment of Central Venous Catheter Occlusion in Children: Results of a Prospective. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 17(11): 1745-1751.
- Brandelli, A., Sala, L., Kalil, S.J. 2015.** Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. *Food Research International*, 73: 3-12.
- Briki, S., Hamdi, O., Landoulsi, A. 2016.** Enzymatic dehairing of goat skins using alkaline protease from *Bacillus* sp. SB12. *Protein Expression and Purification*, 121: 9-16.
- Borsa, B.A., Aldağ, M.E., Tunali, B., Dinç, U., Dalar, Z., Özalp, V.C. 2016.** Nadir görülen fırsatçı patojen *Bacillus pumilus*'un neden olduğu bir sepsis olgusu. *Mikrobiyol Bul.*, 50(3): 466-470.
- Bougatef, A., Balti, R., Haddar, A., Jellouli, K., Souissi, N., Nasri, M. 2012.** Protein hydrolysates from Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus*) heads as influenced by the extent of enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17: 841-852.

- Buchner, E. 1897.** *Chem. Ber.*, 30, pp. 117-124.
- Buehler, E. 2006.** Bread Science: the chemistry and craft of making bread. Two Blue Books Publisher, Hillsborough, NC, USA, 254 pp.
- Burton, R.M., Stadtman, E.R. 1953.** *J. Biol. Chem.*, 202: 873.
- Busto, E., Lopez-Iglesias, M., Gotor, V. 2011.** Use of protease from *Bacillus licheniformis* as promiscuous catalyst for organic synthesis: applications in C-C and C-N bond formation reactions. *Adv. Synth. Catal.*, 353: 2345-2353.
- Buxbaum, E. 2007.** Fundamentals of protein structure and function. *Springer International Publishing*, Switzerland, pp. 59-63.
- Cadirci B., Yasa, I., Bitlisli, B., Karavana, H. 2015.** Thermostable serine protease by *Aspergillus parasiticus* TEM have promising activity in enzymatic dehairing process. *JNRS*, 4(8): 72-83.
- Caille, J., Govindan, C.K., Junga, H. 2002.** Hetero diels-alderbiocatalysis approach for the synthesis of (s) -3-[2- {(methylsulfonyl)oxy}ethoxy]-4-(triphenylmethoxy)-1-butanol methanesulfonate, a key intermediate for the synthesis of the pkc inhibitor. *Org. Process Res. Dev.*, 6: 471-476.
- Castilla I.A., Woods D.F., Reen F.J., O’Gara F. 2018.** Harnessing marine biocatalytic reservoirs for green chemistry applications through metagenomic technologies. *Marine Drugs*, 16(7): 227. doi:10.3390/md16070227.
- Cengiz, N. 2002.** Deri sanayiinde kullanılan kimyasalların işçi ve çevre sağlığı üzerine etkileri. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 3: 9-21.
- Cerda-Costa, N., Gomis-Ruth, F.X. 2014.** Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. *Protein Society*, 23(2): 123-144.
- Chatterjee, J., Giri, S., Maity, S., Sinha, A., Rajshekhar, A.R., Gupta, S. 2015.** Production and characterization of thermostable alkaline protease of *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) from optimized solid-state fermentation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 62(5): 709-718.
- Chhabra, N., Aseri, M.L., Padmanabhan, D. 2013.** A review of drug isomerism and its significance. *International Journal of Applied & Basic Medical Research*, 3(1): 16-18.
- Chittenden, R.H., Hartwell, J.A. 1891.** The relative formation of proteases and peptones in gastric digestion. *The Journal of physiology*, 12(1): 12-22.
- Choi, J.M., Han, S.S., Kim, H.S. 2015.** Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. *Biotechnol. Adv.*, 33: 1443-1454.
- Choudhary, R.B., Jana, A.K., Jha, M.K. 2004.** Enzyme technology applications in leather processing. *Indian Journal of Chemical Technology*, 11: 659-671.
- Chowdary, P., Dasani, H., Jones, J.A.H., Loran, C.M., Eldridge, A., Hughes, S., Collins, P.W. 2001.** Recombinant factor IX (BeneFix[®]) by adjusted continuous infusion: a study of stability, sterility and clinical experience. *The Official Journal of the World Federation of Haemophilia*, 7(2): 140-145.

- Chowdhury, M., Mostafa, M.G., Biswas, T., Saha, A. 2013.** Treatment of leather industrial effluents by filtration and coagulation processes. *Water Resources and Industry*, 3: 11-22.
- Claus, D., Berkeley, R.C.W. 1986.** Genus *Bacillus* Cohn, 1872. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt. J.G., Eds., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 2: 1105-1139.
- Cohn, F. 1872.** Untersuchungen über bakterien. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, 2(1): 127-224.
- Contesini, F.J., Melo, R.R., Sato, H.H. 2018.** An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(3): 321-334.
- Craik, C.S., Page, M.J., Madison, E.L. 2011.** Proteases as therapeutics. *Biochem J.*, 435(1): 1-16.
- Crossman, G.A. 1977.** Modification of mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anat. Rec.*, 69: 33-38.
- Csapo, J., Albert, C. 2018.** Methods and procedures for the processing of feather from poultry slaughterhouses and the application of feather meal as antioxidant. *Acta. Univ. Sapientiae, Alimentaria*, 11: 81-96.
- Çakmakçı, S., Cantürk, A., Çakır, Y. 2017.** Peynir üretimi için sütü pıhtılaştırıcı enzimlere genel bir bakış ve güncel gelişmeler. *Akademik Gıda*, 15(4): 396-408.
- Çelik, S. 2018.** Çiğdem (*Crocus biflorus*) yumrularından proteaz enziminin saflaştırılması ve saflaştırılan enzimin kazeinin koagülasyonunda kullanılabilirliğinin araştırılması. *GIDA*, 43(2): 231-239.
- Çolak, S., Dandar, U., Çavdar, Z. 2008.** Geyik hamderilerinin bazı yapısal özelliklerinin araştırılması üzerine bir çalışma. *Hayvansal Üretim*, 49(1): 38-46.
- Dagmar, F. 2004.** Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. The American Phytopathological Society Symposium, 94(11): 1245.
- Das, G., Prasad, M.P. 2010.** Isolation, purification & mass production of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. *International Research Journals of Microbiology*, 1(2): 26-31.
- Decoux, S. 2002.** Enzymes used for adhesive removal in paper conservation: a literature review. *Journal of the Society of Archivists*, 23: 187-195.
- Demain, A.L., Solomon, N.A. 1981.** *Industrial microbiology. Sci. Am.*, 245: 67-75.
- Demirkan E., Kut D., Sevgi T., Dogan M., Baygin E. 2020.** Investigation of effects of protease enzyme produced by *Bacillus subtilis* 168 E6-5 and commercial enzyme on physical properties of woolen fabric. *The Journal of The Textile Institute*, 111:1, 26-35.
- Dettmer, A., Ayub, M.A.Z., Gutterres, M. 2011.** Hide unhairing and characterization of commercial enzymes used in leather manufacture. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(3): 373-380.

- Dettmer, A., Cavalli, E., Ayub, M.A.Z., Gutterres, M. 2012a.** Optimization of the unhairing leather processing with enzymes and the evaluation of inter-fibrillary proteins removal: an environment-friendly alternative. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 35: 1317-1324.
- Dettmer, A., Cavaleiro, J.C., Cavalli, E., Rossi, D.M., Gusatti, C.S., Ayub, M.A.Z., Gutterres, M. 2012b.** Optimization of the biotechnological process for hide unhairing in substitution of toxic sulfides. *Chem. Eng. Technol.*, 35(5): 803-810.
- Devanadera, M.K.P., Haw, S.V.O., Arzaga, M.J.J., Buenaflor, L.J., Gagarin, T.J.E., Vargas, A.G., Mercado, S.M., Santiago, L.A. 2016.** Optimization, production, partial purification and characterization of neutral and alkaline proteases produced by *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.*, 6(2): 832-838.
- Dikmelik, Y. 2013.** Deri Teknolojisi. Sepici Kültür Hizmeti Yayınları, İzmir, 388 s.
- Donaghy, J.A., Mckay, A.M. 1993.** Production and properties of an alkaline protease by *Aureobasidium pullulans*. *J. Appl. Bacteriol.*, 74: 662-666.
- Dönmez, S. 1986.** Gıda sanayiinde kullanılan enzimler ve ülkemizdeki durumu. *GIDA*, 11(4): 215-220.
- Duclaux, E. 1898.** Traite de microbiologie: microbiologie generale. Masson Press, Primary Source Edition, 650 pp.
- Duschak, V.G., Couto, A.S. 2009.** Cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*: a sulfated glycoprotein antigen as relevant candidate for vaccine development and drug target. *Current Medicinal Chemistry*, 16(24): 3174-3202.
- Dyke, Y.V. 2004.** Practical applications of protease enzymes in paper conservation. The Book and Paper Group Annual, 23: 93-107.
- Ebrahimpour, A., Rahman, R.N.Z.R.A., Ean Chng, D.H., Basri, M., Salleh, A.B. 2008.** A modeling study by response surface methodology and artificial neural network on culture parameters optimization for thermostable lipase production from a newly isolated thermophilic *Geobacillus* sp. strain ARM. *BMC Biotechnol.*, 8: 96.
- Ehrenberg, C.G. 1835.** Dritter beitrug zur erkenntniss grosser organisation in der richtung des kleinsten raumes. *Physikalische Abhandlungen der Koeniglichen Akademie der Wissenschaften zu Berlin aus den Jahren*, pp.143-336.
- Essays, U.K. 2018.** The Liming And Unhairing Process Commerce Essay. Retrieved from <https://www.ukessays.com/essays/commerce/the-liming-and-unhairing-process-commerce-essay.php?vref=1>-(Erişim tarihi: 04.12.2019).
- Ezugwu, A.L., Ottah, V.E., Eze, S.O.O., Chilaka F.C. 2016.** Effect of pH, various divalent metal ion and different substrates on glucoamylase activity obtained from *Aspergillus niger* using amylopectin from tiger nut starch as carbon source. *African Journal of Biotechnology*, 15(21): 980-988.
- Farhadian, S., Asoodeh, A., Lagzian, M. 2015.** Purification, biochemical characterization and structural modeling of a potential htrA-like serine protease from *Bacillus subtilis* DR8806. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 115: 51-58.
- Fathima, N.N., Rao, J.R., Nair, B.U. 2012.** Tannery solid waste to treat toxic liquid wastes: a new holistic paradigm. *Environ. Eng. Sci.*, 29: 363-372.

- Fernandez-Garcia, E., Lopez-Fandino, R., Alonso, L., Ramos, M. 1994.** Dairy foods: the use of lipolytic and proteolytic enzymes in the manufacture of manchego type cheese from ovine and bovine milk. *J. Dairy Sci.*, 77: 2139-2149.
- Florkin, M. 1957.** Discovery of pepsin by Theodor Schwann. *Rev. Med. Liege*, 12: 139-144.
- Freddi, G., Mossotti, R., Innocenti, R. 2003.** Degumming of silk fabric with several proteases. *J. Biotechnol.*, 106(1): 101-112.
- Gelabert, H.A., Jimenez, J.C., Rigberg, D.A. 2007.** Comparison of retavase and urokinase for management of spontaneous subclavian vein thrombosis, *Annals. of Vascular Surgery*, 21(2): 149-154.
- Gilligan, A.M., Waycaster, C.R., Bizier, R., Chu, B., Carter, M.J., Fife, C.E. 2017.** *Advances in Wound Care*, 6(4): 125-134.
- Giraldo, J., Roche, D., Rovira, X., Serra, J. 2006.** Hypothesis: the catalytic power of enzymes: Conformational selection or transition state stabilization?. *FEBS Letters*, 580: 2170-2177.
- Giri, S.S., Sukumaran, V., Sen, S.S., Oviya, M., Banu, B.N., Jena, P.K. 2011.** Purification and characterization of a detergent and oxidizing agent stabler alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* VSG-4 of tropical soil. *The Journal of Microbiology*, 49(3): 455-461.
- Gomaa, A.M. 2018.** Application of enzymes in brewing. *Journal of Nutrition and Food Science Forecast*, 1(1): 1002.
- Gököz, M., 2016.** Proteazın fazla üretimi için UV mutasyon yoluyla *Bacillus subtilis* strain 168 E6-5’de suş geliştirme çalışmaları ve üreme ortamının optimizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*. Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Bursa.
- Gunay, M. 2013.** Eco-friendly textile dyeing and finishing. In Tech Publishing, Rijeka, Croatia, 270 pp.
- Guo, Z., Lin, D., Guo, J., Zhang, Y., Zheng, B. 2017.** In vitro antioxidant activity and in vivo anti-fatigue effect of sea horse (*Hippocampus* sp.) peptides. *Molecules*, 22: 482.
- Gupta, R., Beg, Q., Lorenz, P. 2002.** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59(1):15–32.
- Gupta, R., Rajput, R., Sharma, R., Gupta, N. 2013.** Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97(23): 9931-9940.
- Guttenplan, S.B., Shaw, S., Kearns, D.B. 2013.** The cell biology of peritrichous flagella in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 87(1): 211-229.
- Hakim, A., Bhuiyan, F.R., Iqbal, A., Emon, T.H., Ahmed, J., Azad, A.K. 2018.** Production and partial characterization of dehairing alkaline protease from *Bacillus subtilis* AKAL7 and *Exiguobacterium indicum* AKAL11 by using organic municipal solid wastes. *Heliyon*, 4(6):e00646.

- Hameed, A., Keshavarz, T., Evans, C.S. 1999.** Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K2, for use in leather processing. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 74: 5-8.
- Hammami, A., Fakhfakh, N., Abdelhedi, O., Bayoudh, A. 2017.** Proteolytic and amylolytic enzymes from a newly isolated *Bacillus mojavensis* SA: characterization and applications as laundry detergent additive and in leather processing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.148.
- Hartley, B.S. 1960.** *Annual Review of Biochemistry*, 29(1): 45-72.
- Harwood, C.R. 2008.** *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends Microbiol.*, 16(2): 73-79.
- Helal, M.M.I, Amer, H., Abdelwahed, N.A.M., Ghobashy, M.O.I. 2012.** Physiological and microbiological studies on production of alkaline protease from locally isolated *Bacillus subtilis*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(3): 193-203.
- Hosseini, S.V., Saffari, Z., Farhanghi, A., Atyabi, S.M., Norouzi, D. 2016.** Kinetics of alkaline protease production by *Streptomyces griseoflavus* PTCC1130. *Iranian Journal of Microbiology*, 8(1): 8-13.
- Houde, A., Kademi, A., Leblanc, D. 2004.** Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 118(1-3): 155-70.
- Höhn, A., Daqing, S., Nolle, F. 2005.** Enzymes in fruit juice and wine industry, Ch. 5. In: processing fruits. Science and Technology, 2nd Ed, CRC Press, Florida, USA, pp. 98-112.
- Hussain, F., Kamal, S., Rehman, S., Azeem, M., Bibi, I., Ahmed, T., Iqbal, H.M.N. 2017.** Alkaline protease production using response surface methodology, characterization and industrial exploitation of alkaline protease of *Bacillus subtilis*. *Catal Lett.*, 147:1204-1213.
- Işık, B. 2014.** Biyosensörlere farklı bir bakış açısı enzim aktivitesi tayinlerine yönelik sistemler. *Yüksek Lisans Tezi*, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Tekirdağ.
- Jain, D., Pancha, I., Mishra, S.K., Shrivastav, A. 2012.** Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from *Bacillus* sp.: a potential additive for laundry detergents. *Bioresour Technol.*, 115: 228-236.
- Jaouadi, B., Ellouz-Chaabouni, S., Rhimi, M., Bejar, S. 2008.** Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. *Biochimie*, 90: 1291-1305.
- Jellouli, K., Ghorbel-Bellaaj, O., Ayed, H.B., Manni, L., Agrebi, R., Nasri, M. 2011.** Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. *Process Biochemistry*, 46: 1248-1256.

- Johnevelsy, B., Naik, G., 2001.** Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Proc. Biochem.*, 37: 139-144.
- Joo, H.S., Chang, C.S. 2005.** Production of protease from a new alkaliphilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*, 40: 1263-1270.
- Joo, H.S., Chang, C.S. 2006.** Production of an oxidant and SDS-stable alkaline protease from an alkaliphilic *Bacillus clausii* I-52 by submerged fermentation: feasibility as a laundry detergent additive. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 176-183.
- Kalia, V.C., Saini, A.K. 2017.** Metabolic engineering for bioactive compounds: strategies and processes. *Springer International Publishing*, Switzerland, 412 pp.
- Kallel, A., Ksibi, M., Dhia, H.B., Khelifi, N. 2017.** Recent advances in environmental science from the euro-mediterranean and surrounding regions. *Advances in Science, Technology & Innovation*, pp. 133-135. Doi: 10.1007/978-3-319-70548-4.
- Kamini, N.R., Hemachander, C., Mala, J.G.S., Puvanakrishnan, R. 1999.** Microbial enzyme technology as an alternative to conventional chemicals in leather industry. *Curr. Sci.*, 77: 80-86.
- Kara, M., Sivri, D., Köksel, H. 2005.** *Food Research International*, 38: 479-486.
- Karn, S.K., Kumar, A. 2019.** Protease, lipase and amylase and optimization from activated sludge of pulp and paper industry. *Indian Journal of Experimental Biology*, 57: 201-205.
- Kato, T., Yamagata, Y., Arai, T., 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.
- Keay, L., Wildi, B.S. 1970.** Proteases of the genus *Bacillus*. I. neutral proteases. *Biotechnology and Bioengineering*, 12: 179-212.
- Khandelwal, H.B., More, S.V., Kalal, K.M., Laxman, R.S. 2015.** Eco-friendly enzymatic dehairing of skins and hides by *C. breffieldianus* protease. *Clean Techn. Environ. Policy*, 17: 393-405.
- Kim, P.I., Ryu, J., Kim, Y.H., Chi, Y.T. 2010.** Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20(1): 138-45.
- Kim, M., Si, J.B., Wee, Y.J. 2016.** Identification of a newly isolated protease-producing bacterium *Bacillus subtilis* FBL-1 from soil. *Microbiol. Biotechnol. Lett.*, 44: 185-193.
- Kimmel, J.R., Smith, E.L. 1954.** Crystalline papain: I. preparation, specificity, and activation. *J. Biol. Chem.*, 207: 515-531.
- Kondo, M., Fukao, T., Shinoda, S., Kawamoto, N., Kaneko, H., Kato, Z., Matsui, E., Teramoto, T., Nakano, T., Kondo, N. 2007.** Lymphocyte responses to chymotrypsin or trypsin v-digested beta-lactoglobulin in patients with cow's milk allergy. *Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 3(1): 1-9.

- Kousoulis, A.A., Tsoucalas, G., Armenis, I., Marineli, F., Karamanou, M., Androustos, G. 2012.** From the "hungry acid" to pepsinogen: a journey through time in quest for the stomach's secretion. *Annals of gastroenterology*, 25(2): 119-122.
- Köksal, N.H. 2006.** Lomber diskektomi operasyonu sonrası omurgada oluşan direk radyografik değişiklikler. *Uzmanlık Tezi*, Bakırköy Prof. Dr. Mazhar Osman Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroşirürji Kliniği. 81 s.
- Kumar, D., Kumar, V., Verma, A.K., Dubey, A. 2014.** Kinetic characterization and immobilization of partially purified extracellular alkaline protease from rhizospheric soil bacterium *Bacillus subtilis* strain EN4. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 7(1): 727-732.
- Kühne, W.F. 1877.** Über das verhalten verschiedener organisirter und sog ungeformter fermente. *Verhandlungen des naturhistorisch-medicinischen Vereins zu Heidelberg*, 1: 190-193.
- Kvedar, J.C., Daryanani, H.A., Baden, H.P. 1991.** A comparison of the cross-linked components of stratum corneum of epidermis and the cuticle of the cortex of hair. The molecular and structural biology of hair. *Ann. NY Acad. Sci.*, 642: 44-50.
- Laemmli, U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lassoued, I., Mora, L., Barkia, A., Aristoy, M.C., Nasri, M., Toldra, F. 2015.** Bioactive peptides identified in thornback ray skin's gelatin hydrolysates by proteases from *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *J. Proteomics*, 14(128): 8-17.
- Lee, R., 2017.** Collagen, elastin, and glycosaminoglycans. Just about skin. <http://www.justaboutskin.com/collagen-elastin-glycosaminoglycans/>-(Erişim tarihi: 03.05.2019).
- Levene, P.A. 1905.** The cleavage products of proteoses. *J. Biol. Chem.*, 1: 45-58.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., Wang, X. 2012.** Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2: 1-11.
- Liu, B., Zhang, J., Li, B., Liao, X., Du, G., Chen, J. 2013.** Expression and characterization of extreme alkaline, oxidation-resistant keratinase from *Bacillus licheniformis* in recombinant *Bacillus subtilis* WB600 expression system and its application in wool fiber processing. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 29(5): 825-832.
- Loperena, L., Ferrari, M.D., Belobrajdic, L., Weyrauch, R., Varela, H. 1994.** Study of *Bacillus* sp. culture conditions to promote production of unhairing proteases. *Revista Argentina de Microbiologia*, 26(3): 105-115.
- Lowe, D.A. 2001.** Basic Biotechnology. (Ed: Ratledge C and Kristionsen B.), Second Edition, Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 679 pp.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193(1): 265-275.
- Lu, Z., Guo, W., Liu, C. 2018.** Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis*. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 80(3): 427-433.

- Luan, Y., Xu, W. 2007.** The structure and main functions of aminopeptidase N. *Curr. Med. Chem.*, 14(6): 639-647.
- Ma, J.W., Huang, B.S., Hsu, C.W., Peng, C.W., Cheng, M.L., Kao, J.Y., Wang, S.S. 2017.** Efficacy and safety evaluation of a chlorine dioxide solution. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(3): 329.
- Mabrouk, S.S., Hashem, A.M., El-Shayeb, N.M.A., Ismail, A.M.S., Abdel-Fattah, A.F. 1999.** Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresource Technology*, 69: 155-159.
- Macedo, A.J., Silva, W.O.B., Gava, R., Driemerier, D., Henriques, J.A.P., Termignoni, C. 2005.** Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 594-596.
- Madhavi, J., Srilakshmi, J., Rao, M.V.R., Rao, K.R.S.S. 2011.** Efficient leather dehairing by bacterial thermostable protease. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology*, 3(4): 11-26.
- Mahmoud, M.I., Cordle, C.T. 2000.** Protein hydrolysates as special nutritional ingredients. *Developments in Food Science*, 41: 181-215.
- Makino, M., Sahara, T., Morita, N., Ueno, H. 2019.** Carboxypeptidase Y activity and maintenance is modulated by a large helical structure. *FEBS Open Bio.*, 9(7): 1337-1343.
- Mares-Mares, E., Gutierrez-Vargas, S., Perez-Moreno, L., Ordonez-Acevedo, L.G., Barboza-Corona, J.E., Leon-Galvan, M.F. 2017.** Characterization and identification of cryptic biopeptides in *Carya illinoensis* storage proteins. *BioMed Research International*, 2017: 1549156. doi:10.1155/2017/1549156.
- Marmer, W.N., Dudley, R.L. 2005.** Oxidative deairing by sodium percarbonate. *JALCA.*, 100(11): 427- 431.
- Marshall, R.C., Orwin, D.F.G., Gillespie, J.M. 1991.** Structure and biochemistry of mammalian hard keratin. *Electron Microsc. Rev.*, 4: 47-83.
- Matthews, B.W., Jansonius, J.N., Colman, P.M., Schoenborn, B.P., Dupourque, D. 1972.** Three dimensional structure of thermolysin. *Nature*, 238: 37-41.
- McKay, M. J., Offerman, M. K., Barrett, A. J., Bond, J. S. 1983.** *Biochem. J.*, 213: 467-471.
- Mehta, A., Bodh, U., Gupta, R. 2017.** Fungal lipases: a review. *Journal of Biotech Research*, 8: 58-77.
- Merrifield, R.B. 1964.** Automated synthesis of peptides. *Science*, 150: 178-185.
- Miller, D., Millar, I., Millar, J., Millar, M. 2002.** The cambridge dictionary of scientists, 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, U.K., pp. 320-321.
- Minh, N.P. 2015.** Alcalase and protamex hydrolysis of bioactive peptides from soybean. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.*, 4(7): 132-143.
- Monnet, V. 2013.** Oligopeptidase F (oligopeptidase B): handbook of proteolytic enzymes, Ed.: Rawlings, N.D., Salvesen, G. Academic Press, pp. 529-534.

- Moorthy, I., Baskar, R. 2013.** Statistical modeling and optimization of alkaline protease production from a newly isolated alkalophilic *Bacillus* species BGS using response surface methodology and genetic algorithm. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 43: 293-314.
- Mothe T., Sultanpuram, V.R. 2016.** Production, purification and characterization of a thermotolerant alkaline serine protease from a novel species *Bacillus caseinilyticus*. *3 Biotech.*, 6(1): 53.
- Motyán, J.A., Toth, F., Tozser, J. 2013.** Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, 3(4): 923-942.
- Mounier, J., Coton, M., Irlinger, F., Landaud, S., Bonnarme, P. 2017.** Smear-ripened cheeses. In cheese chemistry, physics and microbiology, Fourth Edition, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 1302 pp.
- Murakami, Y., Hirata, M., Hirata, A. 1996.** Mathematical approach to thermolysin-catalyzed synthesis of aspartame precursor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(3): 246-252.
- Murphy, J.M., Mace, P.D., Evers, P.A. 2017.** Live and let die: insights into pseudoenzyme mechanisms from structure. *Current Opinion in Structural Biology*, 47: 95-104.
- Nadeem, M., Qazi, J.I., Baig, S. 2010.** Enhanced production of alkaline protease by a mutant of *Bacillus licheniformis* N-2 for dehairing. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 53(5): 1015-1025.
- Nahar, S., Mizan, M.F.R., Ha, A.J.W., Ha, S.D. 2018.** Advances and future prospects of enzyme-based biofilm prevention approaches in the food industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(6): 1484-1502.
- Neves, A.C., Harnedy, P.A., O’Keefe, M.B., FitzGerald, R.J. 2017.** Bioactive peptides from atlantic salmon (*Salmo salar*) with angiotensin-converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory, and antioxidant activities. *Food Chem.*, 218: 396-405.
- Nisha, N.S., Divakaran, J. 2014.** Optimization of alkaline protease production from *Bacillus subtilis* NS isolated from sea water. *Afr. J. Biotechnol.*, 13: 1707-1713.
- Northrop, J.H. 1930.** Crystalline pepsin, isolation and tests of purity. *J. Gen. Physiol.*, 13: 739-766.
- Northrop, J.H., Kunitz, M. 1931.** Isolation of protein crystals processing tryptic activity. *Science*, 73: 262-263.
- Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., Saxeana, R.K., Gupta, R. 2001.** Characterization and wash performance analysis of an SDS-stable alkaline protease from a *Bacillus* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 17: 493-497.
- Okafor, N. 2007.** Biocatalysis: immobilized enzymes and immobilized cells. *Modern Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Science Publishers, Enfield, pp. 398-420.
- Ormandy, E.H., Dale, J., Griffin, G. 2011.** Genetic engineering of animals: ethical issues, including welfare concerns. *The Canadian Vet. J.*, 52(5): 544-550.
- Ozcan, T., Kurdal, E. 2012.** The effects of using a starter culture, lipase, and protease enzymes on ripening of mihalic cheese. *Int J Dairy Technol.*, 65(4): 585-593.

Ozdenefe, M.S., Dinçer, S., Unal, M., Kayis, F.B., Takci, H.A., Arkut, A. 2017. Optimization of culture conditions for alkaline protease production from waste breads using *Bacillus subtilis*. *Romanian Biotechnological Letters*, 12(3): 12597-12610.

Öncü, C., 1968. Dericilik temel bilgileri. Ankara Üniversitesi Basımevi, 287 s.

Pacheco, G.F.E., Pezzali, J.G., Kessler A.M., Trevizan, L. 2016. Inclusion of exogenous enzymes to feathers during processing on the digestible energy content of feather meal for adult dogs. *R. Bras. Zootec.*, 45(6): 288-294.

Padmapriya, B., Rajeswari, T., Nandita, R., Raj, F. 2012. Production and purification of alkaline serine protease from marine *Bacillus* species and its application in detergent industry. *Europ. J. Appl. Sci.*, 4(1): 21-26.

Palmer, T., Bonner, P.L.R. 2007. Enzymes: biochemistry, biotechnology, clinical chemistry. 2nd edition, Horwood Publishing, 1-416. Doi: 10.1533/9780857099921.

Pant, G., Prakash, A., Pavani, J.V.P., Bera, S., Deviram, G.V.N.S., Kumar, A., Panchpuri, M., Prasuna, R.G. 2015. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*, 9: 50-55.

Park, C.H., Lee, S.J., Lee, S.G., Lee, W.S., Byun, S.M. 2004. Hetero and autoprocesing of the extracellular metalloprotease (Mpr) in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 186(19): 6457-6464.

Patel, R.K., Dodia, M.S., Joshi, R.H., Singh, S.P. 2006. Purification and characterization of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *Process Biochem.*, 41: 2002-2009.

Payen, F.W., Persoz, J.F. 1833. *Ann. Chim. Phys.*, 53: 73-92.

Polaina, J., MacCabe, A.P. 2007. Industrial enzymes structure, function and applications. 1st Edition, *Springer International Publishing*, Switzerland, 641 pp.

Popp, G., Becker, H. 1896. Enzymatic unhairing. Patent No. US607549A, U.S. Patent and Trademark Office.

Pouyan, N. 2014. Pasteur, a chemistry graduate who revolutionized the medicine. *Journal of Microbiology Research*, 4(3): 148-151.

Prabakaran, V., Soma-Prabha, A., Blessy-Thayalin, T.S. 2015. Screening and production of protease enzyme from marine microorganism and its industrial application, *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 1(4): 33-41.

Priya, J.D.A., Divakar, K., Prabha, M.S., Selvam, G.P. 2014. Isolation, purification and characterisation of an organic solvent-tolerant Ca²⁺ dependent protease from *Bacillus megaterium* AU02. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 172: 910-932.

Putatunda, C., Kundu, B.S., Bhatia, R. 2018. Purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus* sp. HD292. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.*, 89: 957-965.

Puvanakrishnan, P., Sivasubramanian, S., Hemalatha, T. 2012. Microbial technology: concepts and applications, MJP Publisher, Chennai, India, 516 pp.

- Puvanakrishnan, R., Sivasubramanian, S., Hemalatha, T. 2015.** Microbes and enzymes: basics and applied. MJP Publishers, Chennai, India, 558 pp.
- Qadar, S.A.U, Shireen, E., Iqbal, S., Anwar, A. 2009.** Optimization of protease production from newly isolated strain of *Bacillus* sp. PCSIR EA-3. *Indian Journal Biotechnology*, 8: 286-290.
- Qureshi, M.A., Khare, A.K., Pervez, A. 2015.** Enzymes used in dairy industries. *Int. J. Appl. Res.*, 1(10): 523-527.
- Rai, S.K., Mukherjee, A.K. 2009.** Ecological significance and some biotechnological application of an organic solvent stable alkaline serine protease from *Bacillus subtilis* strain DM-04. *Bioresource Technology*, 100: 2642-2645.
- Rai, S.K., Mukherjee, A.K. 2010.** Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochemical Engineering Journal*, 48: 173-180.
- Rajkumar, R., Jayappriyan, K.R., Rengasamy, R. 2011.** Purification and characterization of a protease produced by *Bacillus megaterium* RRM2: application in detergent and dehairing industries. *J. Basic Microbiol.*, 51: 614-624.
- Rampelotto, P.H. 2016.** Biotechnology of extremophiles: advances and challenges. 1st Edition, *Springer International Publishing*, Switzerland, 720 pp.
- Ramundo, J., Gray, M. 2008.** Enzymatic wound debridement. *J. Wound Ostomy Continence Nurs.*, 35: 273-280.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(3): 597-635.
- Ravishankar, K., Kumar, M.A., Saravanan, K. 2012.** Isolation of alkaline protease from *Bacillus subtilis* AKRS3. *African Journal of Biotechnology*, 11(69): 13415-13427.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J. 1993.** Evolutionary families of peptidases. *Biochem J.*, 290(1): 205-218.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Thomas, P.D., Huang, X., Bateman, A., Finn, R.D. 2018.** The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.*, 46: D624-D632.
- Razon, Y., Erez, E., Vidne, B., Birk, E., Katz, J., Tamari, H., Dagan, O. 2005.** Recombinant factor VIIa (NovoSeven[®]) as a hemostatic agent after surgery for congenital heart disease. *Pediatric Anesthesia*, 15(3): 235-240.
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., Ashraf, M. 2019.** Microbial proteases applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 7: 110. doi: 10.3389/fbioe.2019.00110

- Rehman, R., Ahmed, M., Siddique, A., Hasan, F., Hameed, A., Jamal, A. 2017.** Catalytic role of thermostable metalloproteases from *Bacillus subtilis* KT004404 as dehairing and destaining agent. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 181: 434-450.
- Reunanen, N., Kahari, V.M. 2013.** Matrix Metalloproteinases in cancer cell invasion. In: madame curie bioscience database. *Landes Bioscience*; 2000-2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6598/>-(Erişim tarihi: 19.01.2020).
- Riordan, J.F. 1977.** The role of metals in enzyme activity. *Ann. Clin. Lab. Sci. Review.* 7(2): 119-129.
- Rockel, B., Kopec, K.O., Lupas, A.N., Baumeister, W. 2012.** Structure and function of tripeptidyl peptidase II, a giant cytosolic protease. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1824(1): 237-245.
- Rodney, R.M., Hall, J.K., Westwood, C.T., Celi, P., Lean, I.J. 2016.** Precalving and early lactation factors that predict milk casein and fertility in the transition dairy cow. *Journal of Dairy Science*, 99(9): 7554-7567.
- Rose, C., Suguna, L., Rajini, R., Samivelu, N., Rathinasamy, V., Kuttalam, I., Ramasami, T. 2007.** Process for lime and sulfide free unhairing of skin or hides using animal and/or olant enzymes. US Patent No. 7198647, U.S. Patent and Trade Mark Office.
- Röhm, O., 1913.** Trypsin in detergents. Patent No. DE 2839323, German Patent and Trade Mark Office.
- Ruffell, B., Affara, N.I., Cottone, L., Junankar, S., Johansson, M., DeNardo, D.G., Korets, L., Reinheckel, T., Sloane, B.F., Bogyo, M., Coussens, L.M. 2013.** Cathepsin C is a tissue-specific regulator of squamous carcinogenesis. *Genes Dev.*, 27(19): 2086-2098.
- Sahin, S., Ozmen, I., Kir, E. 2015.** Purification, immobilization, and characterization of protease from local *Bacillus subtilis* M-11. *Asia-Pac. J. Chem. Eng.*, 10: 241-247.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., Pandey, A. 2005.** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40: 2689-2694.
- Sanghi, R., Singh, V. 2012.** Green chemistry for environmental remediation, 1st Edition, Wiley-Scrivener, New York City, USA, 800 pp.
- Santoro, S.W., Joyce, G.F. 1997.** A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(9): 4262-4266.
- Sarıkaya, E. 1995.** α -amilaz üreten bazı *Bacillus* suşlarının gelişme parametreleri, enzim özellik ve üretim koşullarının optimizasyonu. *Doktora Tezi*, Biyoloji Anabilim Dalı. Ankara Üniversitesi, Ankara, s: 40-65
- Sari, E. 2011.** *Bacillus circulans* M34'ten proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 103 s.

- Sathishkumar, R., Ananthan, G., Arun, J. 2015.** Production, purification and characterization of alkaline protease by ascidian associated *Bacillus subtilis* GA CAS8 using agricultural wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(2): 214-220.
- Say, D., Güzeler, N. 2016.** Süt pıhtılaştırılmasında kullanılan bazı bitkiler. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, s: 253-261.
- Schaechter, M. 2009.** Encyclopedia of microbiology. 3rd Edition, Academic Press, San Diego, CA., USA, 4600 pp.
- Schitteck, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M., Schroeder, K., Blin, N., Meier, F., Rassner, G., Garbe, C. 2001.** Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat. Immunol.*, 2(12): 1133-1137.
- Schwann, T. 1836.** Ueber das Wesen des Verdauungsprocesses. *Annalen der Physik und Chemie.*, 38: 359-364.
- Seager, S.L., Slabaugh, M.R., Hansen, M.S. 2018.** Chemistry for today: general, organic, and biochemistry, 9th Edition. Cengage Learning, Boston, USA, 886 pp.
- Selamet, S. 2012.** Sürdürülebilirlik ve grafik tasarım. *ZKÜ Sosyal Bilimler Dergisi*, 8(15): 125-148.
- Senthilvelan, T., Kanagaraj, J., Mandal, A.B. 2012.** Application of enzymes for dehairing of skins: cleaner leather processing. *Clean Techn. Environ. Policy*, 14: 889-897.
- Sevinc, N., Demirkan, E. 2011.** Production of protease by *Bacillus* sp. N-40 isolated from soil and its enzymatic properties. *J. Biol. Environ. Sci.*, 5(14): 95-103.
- Sewalt, V., Shanahan, D., Gregg, L. 2016.** The generally recognized as Safe (GRAS) process for industrial microbial enzymes. *Indus. Biotechnol.*, 12: 295-302.
- Shafi, J., Tian, H., Ji, M. 2017.** *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(3): 446-459.
- Shafique, M., Naz, S., Jabeen, N., Nawaz, H., Khan, Z., Solangi, B., Ali, S. 2019.** *Streptomyces* sp. MM-3 from rhizosphere of Psidium Guajava: A potential candidate for protease with dehairing properties. *Pakistan Journal of Botany*, 51. doi: 10.30848/PJB2019-2(40).
- Shah, K., Mody, K., Keshri, J., Jha, B. 2010.** Purification and characterization of a solvent, detergent and oxidizing agent tolerant protease from *Bacillus cereus* isolated from the Gulf of Khambhat. *J. Mol. Catal. B-Enz.*, 67: 85-91.
- Shankar, S., More, S.V., Laxman, R.S. 2010.** Recovery of silver from waste X-Ray film by alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Kathmandu University Journal of Science Engineering and Technology*, 6(1): 60-69.
- Sharma, M., Gat, Y., Arya, S., Kumar, V., Panghal, A., Kumar, A. 2019.** A review on microbial alkaline protease: an essential tool for various industrial approaches. *Industrial Biotechnology*, 15(2): 69-78.

Sheldon, R.A., Woodley, J.M. 2018. Role of biocatalysis in sustainable chemistry. *Chem. Rev.*, 118: 801-838.

Shotton, D.M., Hartley, B.S. 1973. Evidence for the amino acid sequence of porcine pancreatic elastase. *Biochem. J.*, 131: 643.

Si, J.B., Jang, E.J., Charalampopoulos, D., Wee, Y.J. 2018. Purification and characterization of microbial protease produced extracellularly from *Bacillus subtilis* FBL-1. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 23: 176-182.

Silva, C., Martins, M., Jing, S., Fu, J., Cavaco-Paulo, A. 2018. Practical insights on enzyme stabilization. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(3): 335-350.

Silva, N., Taniwaki, M.H., Junqueira, V.C., Silveira, N., Nascimento, M.S., Gomes, R.A.R. 2013. Microbiological examination methods of food and water: a laboratory manual. 1st Edition, CRC Press, London, UK. 484 pp.

Silva, S.V., Malcata, F.X. 2005. Caseins as source of bioactive peptides. *Intl. Dairy J.*, 15: 1-15.

Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., Mehta, P.K. 2016. Microbial proteases in commercial applications. *J. Pharm. Chem. Biol. Sci.*, 4(3): 365-374.

Singh, S., Tripathi, V., Garg, S. 2013. An oxidant, detergent and salt stable alkaline protease from *Bacillus cereus* SIU1. *African Journal of Biotechnology*, 10(57): 12257-12261.

Singh, S., Bajaj, B.K. 2017. Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. *Energ. Ecol. Environ.*, 2(6): 370-386.

Singh, S., Gupta, P., Bajaj, B.K. 2017. Characterization of a robust serine protease from *Bacillus subtilis* K-1. *J. Basic Microbiol.*, 58: 88-98.

Singhal, P., Nigam, V.K., Vidyarthi, A.S. 2012. Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases. *Int. J. Adv. Biotechnol. Res.*, 3: 653-669.

Sinha, R., Khare, S. 2013. Characterization of detergent compatible protease of a halophilic *Bacillus* sp. EMB9: differential role of metal ions in stability and activity. *Bioresource Technology*, 145: 357-361.

Sirohi, R., Prakash, V. 2015. Effect of metal ions on amylase production using *Bacillus subtilis* isolated from soil of Almora District, Uttarakhand, *India International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 3(4): 37-41.

Sivaram, N.M., Barik, D. 2019. Toxic waste from leather industries in energy from toxic organic waste for heat and power generation, Chapter 5, Woodhead Publishing Series in Energy, pp. 55-67.

Sivasubramanian, S., Manohar, B.M., Puvanakrishnan, R. 2008. Mechanism of enzymatic dehairing of skins using a bacterial alkaline protease. *Chemosphere.*, 70: 1025-1034.

- Sousa, F., Ju, S., Erbel, A., Kokol, V., Cavaco-Paulo, A., Gubitz, G.M. 2007.** A novel metalloprotease from *Bacillus cereus* for protein fibre processing. *Enzyme Microb. Technol.*, 40: 1772-1781.
- Souza F.R., Gutterres M. 2012.** Application of enzymes in leather processing: a comparison between chemical and coenzymatic processes. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 29(3): 473-482.
- Souza, P.M., Bittencourt, M.L.A., Caprara, C.C., Freitas, M., Almeida, R.P.C., Silveira, D., Fonseca, Y.M., Filho, E.X.F , Junior, A.P., Magalhaes, P.O. 2015.** A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2): 337-346.
- Steinkuhler, C. 2008.** Viral Proteases. In: encyclopedia of molecular pharmacology, Offermanns, S., Rosenthal, W. (eds.), *Springer International Publishing*, Berlin, Heidelberg.
- Stiuso, P., Caraglia, M., De-Rosa, G., Giordano, A. 2013.** Bioactive peptides in cancer: therapeutic use and delivery strategies. *Journal of Amino Acids.*, 568953.
- Stoll, V.C., Blanchard, J.S. 1990.** Buffers: principles and practice. *Methods in Enzymology*, 182: 24-38.
- Sundararajan, S., Kannan, C.N., Chittibabu, S. 2011.** Alkaline protease from *Bacillus cereus* VITSN04: potential application as a dehairing agent. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(2): 128-133.
- Takamine, J. 1894.** Process of making diastatic enzyme. Patent No. US525823A, U.S. Patent and Trademark Office.
- Tambekar, S.D, Tambekar, DH. 2013.** Optimization of the production and partial characterization of an extracellular alkaline protease from thermo-halo-alkalophilic lonar lake bacteria. *Biosci. Discov.*, 4: 30-38.
- Tavano, O.L., Berenguer-Murcia, A., Secundo, F., Fernandez-Lafuente, R. 2018.** Biotechnological applications of proteases in food technology. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, 17(2): 412-436.
- Thangam, E.B., Rajkumar, G.S., 2000.** Studies on production of extracellular protease by *Alkaligenes faecalis*. *World J. Microbiol.Biotechnol.*, 16: 663-666.
- Thanikaivelann, P., Rao, J.R., Nair, B.U., Ramasami, T., 2004.** Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. *Trend Biotechnol.*, 22: 181-188.
- Thorstensen, T.C. 1993.** Practical Leather Technology. 4th edition, Kieger Publishing Company, Malabar, Florida, ISBN 0-8946-689-3.
- Tiberti, M., Papaleo, E. 2011.** Dynamic properties of extremophilic subtilisin-like serine-proteases. *Journal of Structural Biology*, 174(1): 69-83.
- Tipton, K. 2018.** Translocases (EC 7): A new EC Class. <https://iubmb.org/wp-content/uploads/sites/2790/2018/10/Translocases-EC-7.pdf>-(Erişim tarihi: 16.01.2020).

Trautwein, G., Kuhlmann, K.P. 1982. Immunofluoreszenz, Theorie Und Praxis, Hannover, pp. 52.

Tufvesson, P., Lima-Ramos, J., Nordblad, M. 2011. Guidelines and cost analysis for catalyst production in biocatalytic processes. *Org. Process Res. Dev.*, 15: 266-274.

Turner, A.J. 2004. Neprilysin: handbook of proteolytic enzymes, Ed.: Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. Academic Press, pp. 419-426.

Uçan F., Akyıldız A. 2012. Meyve suyu sanayiinde enzimatik uygulamalar. *GIDA*, 37(6): 363-370.

Uddin, E., Maitra, P., Faruquee, H., Alam, F. 2014. Isolation and characterization of proteases enzyme from locally isolated *Bacillus* sp.. *American Journal of Life Sciences*, 2(6): 338-344.

Uttatree, S., Charoenpanich, J. 2016. Isolation and characterization of a broad pH and temperature active, solvent and surfactant stable protease from a new strain of *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8: 32-38.

Uyar, F., Porsuk, I., Kizil, G., Yilmaz, E.I. 2011. Optimal conditions for production of extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* strain CA15. *Eurasian Journal of Biosciences*, 5: 1-9.

Vaccaro, L. 2016. Green chemistry. *Beilstein J. Org. Chem.*, 12: 2763-2765.

Van Beilen, J.B., Li, Z. 2002. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 338-344.

Van Donkelaar, L.H.G., Mostert, J., Zisopoulos, F.K., Boom, R.M., Vander Goot, A. 2016. The use of enzymes for beer brewing: thermodynamic comparison on resource use. *Energy*, 115: 519-527.

Vanitha, N., Rajan, S., Murugesan, A.G., 2014. Production of alkaline protease by PD4 strain and its application in leather process. *IJPCBS*, 4(3): 545-550.

Verma, A., Ansari, M.W., Anwar, M.S., Agrawal, R., Agrawal, S. 2014. Alkaline protease from *Thermoactinomyces* sp. mitigates industrial pollution. *Protoplasma*, 251: 711-718.

Vij, R., Reddi, S., Kapila, S., Kapila, R. 2016. Transepithelial transport of milk-derived bioactive peptide VLPVPQK. *Food Chem.*, 190: 681-688.

Vijayaraghavan, P., Vijayan, A., Arun, A., Jenisha, J.K., Vincent, S.G.P. 2012. Cow dung: a potential biomass substrate for the production of detergent-stable dehairing protease by alkaliphilic *Bacillus subtilis* strain VV. *SpringerPlus*, 1: 76.

Vijayaraghavan, P., Lazarus, S., Vincent, S.G.P. 2014. De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: biosynthesis and properties. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21: 27-34.

Vishwanatha, K.S., Rao, A.G.A., Singh, S.A. 2009. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chem.*, 114: 402-407.

- Vranova, V., Rejsek, K., Formanek, P. 2013.** Proteolytic activity in soil: a review. *Applied Soil Ecology*, 70: 23-32.
- Wang, B., Wu, W., Liu, X. 2007.** Purification and characterization of a neutral serine protease with nematicidal activity from *Hirsutella rhossiliensis*. *Mycopathol.*, 163: 169-176.
- Wang, H.Y., Liu, D.M., Liu, Y., Cheng, C.F., Ma, Q.Y., Huang, Q., Zhang, Y.Z. 2006.** Screening and mutagenesis of a novel *Bacillus pumilus* strain producing alkaline protease for dehairing. *Lett. Appl. Microbiol.*, 44: 1-6.
- Wang, J., Xu, A., Wan, Y., Li, Q. 2013.** Purification and characterization of a new metallo-neutral protease for beer brewing from *Bacillus amyloliquefaciens* SYB-001. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 170: 2021-2033.
- Wang, S., Chao, C.H., Liang, T.W., Chen, C.C. 2009.** Purification and characterization of protease and chitinase from *Bacillus cereus* TKU006 and conversion of marine wastes by these enzymes. *Journal of Marine Biotechnology*, 11(3): 334-344.
- Ward, O.P. 1985.** Proteolytic enzymes: comprehensive biotechnology, Ed.: Moo-Young, M. Pergmon Press Ltd., New York, USA, pp. 789-818.
- Wendelbo, O., Fosse, B. 1970.** Protein surgery: A restoring procedure applied on paper. *Restaurator*, 1(4): 245-249.
- Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J., Wong, D.W.S. 2002.** Handbook of Food Enzymology, CRC Press; 1st Edition, 1128pp.
- Wilson, J.A., 1941.** Modern Practise in Leather Manufacture. Reinhold Publishing Corporation. 744 pp.
- Wilson, P., Remigio, Z. 2012.** Production and characterisation of protease enzyme produced by a novel moderate thermophilic bacterium (EP1001) isolated from an alkaline hot spring, Zimbabwe. *African Journal of Microbiology Research*, 6(27): 5542-5551.
- Windelspecht, M. 2003.** Groundbreaking scientific experiments, inventions, and discoveries of the 19th century. Westport: Greenwood Publishing Group, 100 pp.
- Windle, M.C., Walker, N., Kung, J.L. 2014.** Effects of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of corn silage harvested at different dry matter contents and ensiled for various lengths of time. *J. Dairy Sci.*, 97: 3053-3060.
- Wood, J.T. 1912.** Puering, bating & drenching of Skins. New York, Spon, 300 pp.
- Wu, J.W., Chen, X.L. 2011.** Extracellular metalloproteases from bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(2): 253-262.
- Yadav, A.N., Singh, S., Mishra, S., Gupta, A. 2019.** Recent advancement in white biotechnology through fungi: perspective for value-added products and environments. *Springer International Publishing*, New York, USA. 504 pp.
- Yanar, Y., 2015.** Seafood enzymes and their application in the seafood industry. *Ege J. Fish Aqua Sci.*, 32(2): 105-113.

- Yang, H., Li, J., Shin, H., Du, G. 2014.** Molecular engineering of industrial enzymes: recent advances and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(1): 23-29.
- Yang, X., Yousef, A.E. 2018.** Antimicrobial peptides produced by *Brevibacillus* spp.: structure, classification and bioactivity: a mini review. *World J Microbiol Biotechnol.*, 34(4): 57.
- Yılmaz, M. 2003.** Toprakтан izole edilen *Bacillus* cinsi bakterilerin bazı metabolik özelliklerinin belirlenmesi plazmid DNA ve protein profillerinin incelenmesi. *Doktora Tezi*, Ankara Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Yu, L., Yang, L., An, W., Su, X. 2014.** Anticancer bioactive peptide-3 inhibits human gastric cancer growth by suppressing gastric cancer stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry.*, 115(4): 697-711.
- Zaki, N. 2018.** Biodegradable plastic production by *Bacillus* spp. isolated from agricultural wastes and genetic analysis of PHA synthesis. *Al-Mustansiriyah Journal of Science*, 29(1): 67-74.
- Zambare, V.P, Nilegaonkar, S.S., Kanekar, P.P. 2007.** Production of an alkaline protease by *Bacillus cereus* MCM B-326 and its application as a dehairing agent. *World J. Microbiol Biotechnol.*, 23: 1569-1574.
- Zambare, V., Nilegaonkar, S., Kanekar, P. 2011.** A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. *New Biotechnology*, 28(2): 173-181.
- Zekeya, N., China, C., Mbwana, S., Mtambo, M. 2019.** Dehairing of animal hides and skins by alkaline proteases of *Aspergillus oryzae* for efficient processing to leather products in Tanzania. *African Journal of Biotechnology*, 18(20): 426-434.
- Zhang, K., Wei, R., Song, R. 2019.** Extraction of cathepsin D-like protease from neon flying squid (*Ommastrephes bartramii*) viscera and application in antioxidant hydrolysate production. *Biomolecules*, 9(6): 228.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Behice ZEREN
Doğum Yeri : Fatih / İSTANBUL
Doğum Tarihi : 01.07.1988
Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Yedikule Anadolu Lisesi
Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi
Doktora : Bursa Uludağ Üniversitesi
İletişim (e-posta) : zerenbehicezeren@gmail.com

YAYINLAR :

Ak, A., Demirkan, E., Cengiz, M., Sevgi, T., Zeren, B., Abdou, M. 2019. Optimization of culture medium for the production and partial purification and characterization of an antibacterial activity from *Brevibacillus laterosporus* strain EA62. *Romanian Biotechnological Letters*, 24(4): 705-713.

Demirkan, E., Sevgi, T., Gokoz, M., Guler B.E., Zeren B., Ozalpar B., Maoulida A. 2018. Strain improvement by UV mutagenesis for protease overproduction from *Bacillus subtilis* E6-5 and nutritional optimization. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 12(35): 69-77.

Demirkan, E., Sevgi, T., Guler, B.E., Zeren, B., Ozalpar, B., Maoulida, A. 2019. Türkiye topraklarından izole edilen *Bacillus* sp. suşlarının biyoremidasyonda kullanılma potansiyellerinin araştırılması. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1): 107-113.

Zeren, B., Ersoy, F., Demirkan, E. 2019. Gene cloning studies of a novel phytase from *Bacillus megaterium* EBD 9-1 strain. *Journal of Applied Biological Sciences*,13(1): 6-10.

KONGRELER:

Baygın, E., Akçakoca, D., Zeren, B., Demirkan, E. 2014. Türkiye topraklarından fitaz üreten *Bacillus* sp.'lerin izolasyonu ve besinsel parametrelerin fitaz üretimi üzerine etkilerinin araştırılması. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı), 23-27 Haziran, Eskişehir.

Sevgi, T., Güler, B.E., Zeren, B., Özalpar, B., Abdou, M., Demirkan, E. 2017. Türkiye topraklarından izole edilen *Bacillus* sp. suşlarının biyoremediasyonda kullanılma potansiyellerinin araştırılması. Ulusal Çevre, Deniz ve Kıyı Kirliliği Sempozyumu (UCEDKKS-2017), 10-12 Ekim, Bursa.

Sevgi, T., Zeren, B., Güler, B.E., Demirkan, E. 2017. Screening of petroleum degrading *Bacillus* sp.strains isolated from different non-contaminated soil samples. 15th World Congress on 2nd International Conference on Biotechnology And Biotech Industries Meet Enzymology and Molecular Biology. March 20-21, Rome, Italy.

Sevgi, T., Baygın, E., Zeren, B., Demirkan, E. 2018. Screening and production of protease enzyme from *Bacillus* sp. strains and its dehairing application. VII. International Congress on Molecular Biology and Biotechnology, 25 - 27 April 2018, Konya.

Zeren, B., Özalpar, B., Güler, B.E., Demirkan, E. 2017. Yeni izolat *Bacillus* sp. 10-2 α -amilaz enzimi ile ticari amilaz enzimlerinin hayvan yem katkı maddesi olarak kullanılabilirliği için sıcaklık, stabilite ve pH değerlerinin saptanması. Uludağ Üniversitesi, VI. Bilgilendirme ve Ar-Ge Günleri, 15-16 Mart, Bursa.

Zeren, B., Sevgi, T., Özalpar, B., Güler, B.E., Demirkan, E. 2017. Türkiye topraklarından *Bacillus* sp.suşlarının antibiyotik üretim potansiyellerinin araştırılması. 3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi, 26-29 Nisan, İstanbul.

PROJELER :

Demirkan, E., Ersoy, F., Baygın, E., Akçakoca, D., Zeren, B., Usta, A., Sevgi T. Türkiye topraklarından izole edilecek *Bacillus* sp. suşlarından fitaz üretimi, üretim koşullarının optimizasyonu, enzimin saflaştırılması, karakterizasyonu ve genin *E.coli*'de ifade edilmesi. Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu. Proje no: QUAP (F)2012/11, 02/05/2012-19/10/2016. (Yardımcı Araştırmacı).

Demirkan, E., Sevgi, T., Zeren, B., Güler, B.E. Türkiye topraklarından izole edilmiş *Bacillus* sp. suşlarının petrol parçalama yeteneklerinin saptanması. Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu. Proje no: HDP(F)-2016/57, 14/11/2016-21/11/2017. (Yardımcı Araştırmacı).

Demirkan, E., Ersoy, F., Sevgi, T., Abdou, M., Zeren, B., Yeni izolat *Bacillus* sp. suşundan lipaz: taranması, üretim koşullarının optimizasyonu, kısmi saflaştırılması, karakterizasyonu, deterjan endüstrisindeki potansiyel uygulamaları ve *Bacillus* cinsinin genetik çeşitliliğinin ortaya çıkarılması. Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu. Proje no: KUAP(F)-2018/5, 2018-Devam ediyor. (Yardımcı Araştırmacı).