

T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE TOPRAKLARINDAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS SP.*  
SUŞLARINDAN PROTEAZ ÜRETİMİ, KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI VE  
KARAKTERİZASYONU

Nihan SEVİNÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA- 2010



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE TOPRAKLARINDAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS SP.*  
SUŞLARINDAN PROTEAZ ÜRETİMİ, KISMİ SAFLAŞTIRILMASI VE  
KARAKTERİZASYONU

Nihan SEVİNÇ

Doç. Dr. Elif DEMİRKAN

(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2010

T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE TOPRAKLARINDAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS SP.*  
SUŞLARINDAN PROTEAZ ÜRETİMİ, KISMİ SAFLAŞTIRILMASI VE  
KARAKTERİZASYONU

Nihan SEVİNÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 14.01. 2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir

Doç. Dr. Elif DEMİRKAN

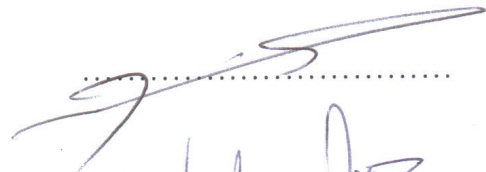
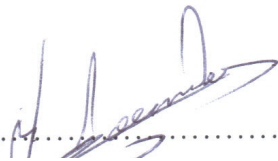
Danışman



.....

Doç.Dr.Hakan BİRİCİK

Yard.Doç.Dr.Egemen DERE

.....

## ÖZET

Bu çalışmada Türkiye' nin 21 farklı ilinden temin edilen toprak örneklerinden 54 adet bakteri izole edilmiştir. Proteaz pozitif olarak belirlenen ve en geniş zon çapına sahip olan 6 bakterinin morfolojik ve fizyolojik özellikleri araştırılmış ve hepsinin *Bacillus* cinsine ait olduğu saptanmıştır. Farklı içerikli iki çeşit ortam, 4 suşun enzim üretim kapasiteleri için test edilmiştir. En yüksek proteaz aktivitesine sahip 1 adet *Bacillus* suşu seçilmiş ve bu suş, *Bacillus* sp. N-40 olarak adlandırılmıştır.

*Bacillus* sp. N-40'ın proteaz üretimi üzerine bazı faktörlerin etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, çeşitli karbon kaynakları, azot kaynakları ve metal iyonları denenmiştir. *Bacillus* sp. N-40 suşunun maksimum proteaz üretimi, karbon kaynağı olarak fruktoz, azot kaynağı olarak ise yağsız süt tozu (skimmed milk) varlığında gözlemlenmiştir, elde edilen enzim aktivitesi verimi sırasıyla %24 ve %43 olarak belirlenmiştir. İlave edilen metal iyonlarının hiçbiri enzim aktivitesini arttırmamıştır ancak  $Ca^{+2}$ 'un bakteri üremesinde ve enzim üretiminde etkili olduğu saptanmıştır.

Tarafımızdan modifiye edilen ortam, daha yüksek enzim aktivitesi elde etmek için en uygun ortam olup, enzim aktivitesi %51 olarak bulunmuştur. Optimum enzim aktivitesi 55oC'de elde edilmiştir. Termostabilite çalışmaları enzimin 55oC' de, 3 saat sonunda, aktivitesinin %100'ünü koruduğunu göstermiştir. Bundan dolayı, enzim termostabil olabilir. Optimum pH ise 7.0 olarak elde edilmiş ve enzimin, pH skalasının alkali tarafındaki aktivitesinin asidik tarafa göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla, enzimin alkali bir enzim olduğu söylenebilir. Enzim aktivitesi üzerine  $Mn^{+2}$  ve  $Ca^{+2}$ ' un stimülatör etkisi gözlemlenmiştir. Enzim, %75 amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile kısmi olarak saflaştırılmış ve 2.11 kez saflaştırma sağlanmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 52 kDa olarak tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** İzolasyon, *Bacillus*, Proteaz üretimi, Enzim karakterizasyonu, Kısmi saflaştırma.

**ABSTRACT**

In this study, 54 bacteria were isolated from soil samples that provided from 21 different cities of Turkey. Morphological and physiological features of six bacteria that have the widest zone radius and of the protease positive were investigated and all of them were determined as *Bacillus* genus. Two kinds of media with a different content were tested their capacity for enzyme production of four strains. One strain that had the highest protease activity was selected and it was named as *Bacillus* sp. N-40.

The effects of some factors on the production of protease by *Bacillus* sp. N-40 were investigated. For this purpose, various carbon and nitrogen sources and metal ions were tested. As a result, the highest protease activity was observed in the presence of fructose as the carbon source and skimmed milk as the nitrogen source, the yields were 24% and 43%, respectively. None of the additional metal ions were increased the enzyme activity, however, it was observed that Ca<sup>+2</sup> had an effect on bacterial growth and the enzyme production.

The medium that modified by us, was the most convenient medium to obtain higher enzyme activity and found as 51% enzyme activity. The optimum enzyme activity was obtained at 55°C. Thermostability studies showed that enzyme was retained as 100% after 3 hours at 55°C, therefore it might be a thermostable. The optimum pH was determined as 7.0 and it is observed that the activity of the enzyme is higher at the alkaline side of the pH scale rather than the acidic side. Therefore, it was said that the enzyme was an alkali enzyme. The stimulatory effect of Mn<sup>+2</sup> and Ca<sup>+2</sup> on the enzyme activity were observed. The enzyme was partially purified with 75% ammonium sulphate precipitation with dialysis and obtained 2.11 fold purification. The molecular weight of enzyme was determined approximately 52 kDa.

**Key Words:** Isolation, *Bacillus*, Protease production, Enzyme characterization, Partially purification.

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>SAYFA</b>
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xiii
GİRİŞ.....	1
<b>1. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>5</b>
1.1. Proteazların Tarihçesi .....	5
1.2. Proteazların Etki Mekanizmaları .....	8
1.3. Proteazların Sınıflandırılması .....	8
1.3.1. Ekzopeptidazlar .....	8
1.3.1.1. Aminopeptidazlar .....	9
1.3.1.2. Karboksipeptidazlar .....	10
1.3.2. Endopeptidazlar .....	11
1.3.2.1. Serin proteazlar .....	13
1.3.2.2. Aspartik proteazlar.....	13
1.3.2.3. Sistein / Tiyol proteazlar.....	13
1.3.2.4. Metallo proteazlar.....	14
1.4. Proteaz Kaynakları .....	14
1.4.1. Bitkisel kaynaklar.....	14
1.4.2. Hayvansal kaynaklar.....	16
1.4.3. Mikrobiyal kaynaklar.....	18
1.5. <i>Bacillus</i> Hakkında Genel Bilgiler.....	20
1.6. <i>Bacillus</i> Proteazlarının Özellikleri.....	22
1.7. Proteazların Endüstride Kullanım Alanları.....	23
1.7.1. Deterjan sanayisinde proteazlar.....	24
1.7.2. Deri sanayisinde proteazlar.....	26
1.7.3. Gıda sanayisinde proteazlar.....	27
1.7.4. Kozmetik ve ilaç sanayisinde proteazlar.....	29
1.7.5. Tekstil sanayisinde proteazlar .....	29
1.7.6. Gümüş eldesinde proteazlar .....	30

1.7.7. Atık işleme prosesinde proteazlar.....	30
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>32</b>
2.1. Materyal.....	32
2.2. Metod.....	33
2.2.1. Bakteri izolasyonunda kullanılan kültür ortamları.....	33
2.2.2. Proteaz pozitif bakterilerin izolasyonu.....	33
2.2.3. <i>Bacillus'</i> un taksonomik sınıflandırılması için morfolojik ve fizyolojik özelliklerin belirlenmesi.....	34
2.2.3.1. Hareketlilik testi.....	35
2.2.3.2. Katalaz testi.....	35
2.2.3.3. Nişastanın hidrolizi testi.....	35
2.2.3.4. Gram boyama.....	35
2.2.3.5. Spor boyama.....	36
2.2.4. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri.....	36
2.2.5. Enzim üretimi için uygun besiyeri seçimi.....	37
2.2.6. Bakteri üretim koşulları.....	38
2.2.7. Bakteri üremesinin ölçülmesi.....	38
2.2.8. Toplam proteaz aktivitesi ( TPA ) tayini.....	39
2.3. Bakteri Gelişimi ve Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Faktörler.....	40
2.3.1. Karbon ( C ) kaynaklarının etkisi.....	40
2.3.2. Azot ( N ) kaynaklarının etkisi.....	40
2.3.3. Metal iyonlarının etkisi .....	41
2.3.4. Maksimum proteaz üretimi için modifiye ortamın hazırlanması	41
2.4. Enzim Karakterizasyonu.....	41
2.4.1. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	42
2.4.2. Termostabilitenin belirlenmesi.....	42
2.4.3. pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	42
2.4.4. pH stabilitesinin belirlenmesi.....	42
2.4.5. Metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	43
2.5. Enzimin Kısmi Saflaştırılması.....	43
2.5.1. Amonyum sülfat çöktürmesi.....	43
2.5.2. Diyaliz.....	43
2.5.3. Protein miktarının belirlenmesi.....	44
2.6. Enzimin Moleküler Ağırlığının Tespiti.....	44

2.6.1. Çözeltilerin ve jelin hazırlanması.....	45
2.6.2. Örneklerin hazırlanması ve elektroforez koşulları.....	47
2.6.3. Boyama ve boyanın uzaklaştırılması.....	47
<b>3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI.....</b>	<b>48</b>
3.1. Proteaz Pozitif Bakterilerin Belirlenmesi.....	48
3.2. Biyokimyasal Ve Morfolojik Testler.....	50
3.2.1. Biyokimyasal testler.....	50
3.2.1.1. Katalaz testi.....	50
3.2.1.2. Nişasta hidroliz testi.....	51
3.2.2. Morfolojik testler.....	52
3.2.2.1. Koloni yapısı ve bakterilerin şekli.....	52
3.2.2.2. Hareketlilik testi.....	53
3.2.2.3. Gram boyama.....	53
3.2.2.4. Spor boyama.....	54
3.3. Proteaz Üretim Ortamının Belirlenmesi.....	55
3.4. Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Faktörler.....	57
3.4.1. Karbon kaynaklarının etkisi.....	57
3.4.2. Azot kaynaklarının etkisi.....	58
3.4.3. Metal iyonlarının etkisi.....	61
3.4.4. Maksimum proteaz üretimi için modifiye ortamın oluşturulması.....	64
3.5. Enzim Karakterizasyonu .....	67
3.5.1. Sıcaklığın ve termostabilitenin enzim aktivitesi üzerine etkisi..	67
3.5.2. pH'nın ve pH stabilitesinin enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	68
3.5.3. Çeşitli metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	70
3.6. Enzimin Kısmi Saflaştırılması.....	71
3.7. Enzimin moleküler ağırlığının tespiti.....	72
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>76</b>
KAYNAKLAR .....	85
TEŞEKKÜR.....	100
ÖZGEÇMİŞ.....	101



**KISALTMALAR DİZİNİ**

APS	- Amonyum Per Sülfat
C	- Karbon
DNA	- Deoksiribonükleik Asit
RNA	- Ribonükleik Asit
N	- Azot
SDS-PAGE	- Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SDS	- Sodyum Dodesil Sülfat
TPA	- Toplam Protein Aktivitesi
NC-IUBMD	- Uluslar Arası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
BSA	- Bovine Serum Albumine
TEMED	- n,n,n,n-Tetrametiletildiamin

**ÇİZELGELER DİZİNİ****SAYFA**

<b>Çizelge 1.1</b> Dünya çapında üretilen enzim tabanlı deterjanlar ve enzim kaynağı olan bakteri türleri.....	25
<b>Çizelge 1.2</b> Deri sanayisinde kullanılan bazı <i>Bacillus</i> türleri.....	27
<b>Çizelge 2.1</b> Proteaz pozitif bakterilerin seçiminde kullanılan katı besiyerleri	34
<b>Çizelge 2.2</b> Biyokimyasal testlerde kullanılan besiyerleri.....	34
<b>Çizelge 2.3</b> Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri.....	37
<b>Çizelge 2.4</b> Proteaz üretim ortamının tespitinde kullanılan sıvı besiyerleri.....	37
<b>Çizelge 3.1.</b> Toprak örneklerinden izole edilen bakterilerin zon çapları.....	49
<b>Çizelge 3.2.</b> <i>Bacillus</i> cinsinin belirlenmesinde kullanılan morfolojik testler ve test sonuçları.....	54
<b>Çizelge 3.3.</b> 1 no'lu besiyerinde üretilen 4 bakterinin enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.....	55
<b>Çizelge 3.4.</b> Farklı karbon kaynaklarının <i>Bacillus</i> sp. N-40'ın enzim üretimi ve üreme üzerine etkileri.....	57
<b>Çizelge 3.5.</b> Organik azot kaynaklarının <i>Bacillus</i> sp. N-40'ın TPA ve üreme miktarı üzerine etkileri.....	59
<b>Çizelge 3.6.</b> İnorganik azot kaynaklarının <i>Bacillus</i> sp. N-40'ın TPA ve üreme miktarı üzerine etkileri.....	60
<b>Çizelge 3.7.</b> Ca+2 ve çeşitli metal iyonları kombinasyonlarının TPA ve bakteri üremesi üzerine etkilerinin, kontrol ortamıyla karşılaştırılması..	61
<b>Çizelge 3.8.</b> Mg+2 ve çeşitli metal iyonları kombinasyonlarının TPA ve bakteri üremesi üzerine etkilerinin, kontrol ortamıyla karşılaştırılması.	63
<b>Çizelge 3.9.</b> Ca+2 ve Mg+2'un ayrı ayrı kullanıldığı ortamlarda TPA ve bakteri üremesi.....	63
<b>Çizelge 3.10.</b> Kontrol olarak kullanılan besiyeri ve yeni modifiye besiyerinin içerikleri.....	65
<b>Çizelge 3.11.</b> Modifiye ortamda TPA ve bakteri üremesinin kontrol ortamla ( <i>Besiyeri 1</i> ) karşılaştırılması.....	66
<b>Çizelge 3.12.</b> Proteaz enzimi üzerine sıcaklığın etkisi.....	67
<b>Çizelge 3.13.</b> Enzim üzerine pH etkisinin belirlenmesi.....	69

<b>Çizelge 3.14.</b> Metal iyonlarının kaba enzim üzerine etkisinin belirlenmesi.....	70
<b>Çizelge 3.15.</b> Proteaz enziminin saflaştırma basamakları.....	72
<b>Çizelge 3.16.</b> Standart proteinler, enzim örnekleri ve çözeltilerin Rf değerleri ile molekül ağırlıkları.....	74

**ŞEKİLLER DİZİNİ****SAYFA**

<b>Şekil 1.1</b> Eski Mısır Medeniyeti'nde şarap ve ekmek yapımı.....	5
<b>Şekil 1.2</b> Proteazların etki mekanizması.....	8
<b>Şekil 1.3</b> Ekzopeptidazların etki mekanizmaları.....	9
<b>Şekil 1.4</b> Aminopeptidazların alt grupları ve etki mekanizmaları.....	10
<b>Şekil 1.5</b> Karboksipeptidazların alt grupları ve etki mekanizmaları.....	10
<b>Şekil 1.6</b> Omega peptidazların etki mekanizması.....	11
<b>Şekil 1.7</b> Endopeptidazların etki mekanizması.....	12
<b>Şekil 1.8</b> Endopeptidazların sınıflandırılması.....	12
<b>Şekil 1.9</b> Gram boyama yapılmış <i>B.cereus</i> ve <i>B.subtilis</i> kolonilerinin mikroskopik görünüşleri.....	21
<b>Şekil 1.10</b> Proteazların endüstride kullanım yüzdeleri.....	23
<b>Şekil 2.1</b> Kullanılan toprak örneklerinin alındığı iller.....	32
<b>Şekil 3.1.</b> Proteaz pozitif izolatın besiyerindeki görüntüsü.....	48
<b>Şekil 3.2.</b> <i>Bacillus</i> sp. izolatlarının taksonomik özellikleri.....	50
<b>Şekil 3.3.</b> Belirlenen kolonilerde serbest oksijenin kabarcıklar halinde görülmesi.....	51
<b>Şekil 3.4.</b> Nişasta hidrolizi sonucunda iyotla boyanmış ve boyanmamış bölgeler.....	51
<b>Şekil 3.5.</b> Bakteriyal koloni tipleri.....	52
<b>Şekil 3.6.</b> N-40 bakterisinin 100X objektifte görünümü.....	52
<b>Şekil 3.7.</b> Petri kutusundaki yumuşak agarlı besiyerinde hareketlilik kontrolü.....	53
<b>Şekil 3.8.</b> Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin görünümü.....	53
<b>Şekil 3.9.</b> Bakterilerde görülen spor tipleri .....	54
<b>Şekil 3.10.</b> Bakterilerin <i>Besiyeri 1'</i> de proteaz üretim Kapasitelerinin karşılaştırılması.....	56
<b>Şekil 3.11.</b> N-3, N-10, N-18 ve N-40 no'lu bakterilerin zamana bağlı üreme değerleri.....	57
<b>Şekil 3.12.</b> Farklı karbon kaynaklarının <i>Bacillus</i> sp. N-40'ın enzim aktivitesi üzerine etkileri.....	58
<b>Şekil 3.13.</b> Organik azot kaynaklarının <i>Bacillus</i> sp. N-40'ın enzim üretim kapasitesi üzerine etkileri.....	60

- Şekil 3.14.** Ca+2 ve çeşitli metal iyonları kombinasyonlarının *Bacillus* sp. N-40 bakterisinin enzim üretim kapasitesi üzerine etkileri... 62
- Şekil 3.15.** Mg+2 ve çeşitli metal iyonları kombinasyonlarının *Bacillus* sp. N-40 bakterisinin enzim üretim kapasitesi üzerine etkileri... 63
- Şekil 3.16.** Kontrol (*Besiyeri 1*) ve Modifiye ortamlarda *Bacillus* sp. N-40'ın zamana karşı enzim aktivitelerinin karşılaştırılması..... 66
- Şekil 3.17.** Farklı sıcaklık değerlerinde, saptanan bağıl enzim aktivite sonuçları..... 68
- Şekil 3.18.** Farklı pH değerlerine göre saptanan bağıl enzim aktivite sonuçları..... 69
- Şekil 3.19.** Çeşitli metal iyonları varlığında kaba enzim aktivitesinin bağıl olarak değişimi..... 71
- Şekil 3.20.** SDS-Page sonrası elde edilen jelde protein bantlarının görünümü..... 73
- Şekil 3.21.** Standart proteinlerin Rf değerleri ve molekül ağırlıklarına göre oluşturulan standart eğri..... 75

**SİMGELER DİZİNİ**

%	- Yüzde Orantı
oC	- Santigrat Derece
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	- Amonyum Sülfat
α	- Alfa
APS	- Amonyum Persülfat
Ba+2	- Baryum İyonu
BaCl <sub>2</sub>	- Baryum Klorür
Ca+2	- Kalsiyum İyonu
CaCl <sub>2</sub>	- Kalsiyum Klorür
cm	- Santimetre
Cu+2	- Bakır İyonu
CuSO <sub>4</sub>	- Bakır Sülfat
dk	- Dakika
g	- Gram
Hg+2	- Cıva İyonu
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Hidrojen Peroksit
HCl	- Hidroklorik Asit
HCN	- Hidrosiyanik Asit
K-Na-tartarat	- Sodyum Potasyum Tartarat
KNO <sub>3</sub>	- Potasyum Nitrat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	- Potasyum Dihidrojen Fosfat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	- Di Potasyum Fosfat
Li+2	- Lityum İyonu
LiSO <sub>4</sub>	- Lityum Sülfat
M	- Molar
mA	- Miliamper
mg	- Miligram
Mg+2	- Magnezyum İyonu
MgSO <sub>4</sub>	- Magnezyum Sülfat
mL	- Mililitre
Mn+2	- Mangan İyonu
MnCl <sub>2</sub>	- Mangan Klorür
µL	- Mikrolitre
µm	- Mikrometre

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	- Sodyum Karbonat
nm	- Nanometre
OD	- Optik Dansite
$\text{Zn}^{+2}$	- Çinko İyonu
$\text{ZnSO}_4$	- Çinko Sülfat

## GİRİŞ

Canlılar, yaşamlarını sürdürebilmek için birçok biyokimyasal dönüşümü tamamlamak zorundadırlar. Bu dönüşüm olaylarının gerçekleşmesini sağlayan biyolojik katalizörlere 'enzim' adı verilmektedir. Enzimler, canlı organizmada oluşan tüm tepkimelerin uygun koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bu tepkimeleri düzenleyen, katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu (ribozimler) hariç olmak üzere, genellikle protein ana yapıdaki özelleşmiş biyokatalizörlerdir. Enzimler de diğer katalizörler gibi reaksiyon hızını arttırarak çalışırlar. Benzer koşullar altında, enzim varlığındaki tepkime oranı, katalizör yokluğundaki reaksiyon oranına göre bir veya birkaç milyon kat daha yüksek olabilmektedir (Uludağ 2000). Yapılarındaki aminoasitlerin sıralanışı ve buna bağlı olarak kazandıkları üç boyutlu yapı enzimlerin kataliz görevini yapabilmelerini sağlayan en önemli etkidir (Onat ve Emerk 1997).

Enzimler her biyokimyasal süreçte merkez durumundadır. Enzimler düzenli tepkime dizilerindeki aktiviteleriyle besinsel moleküllerin parçalandığı tepkime basamaklarının yüzlercesini katalizler, böylece kimyasal enerji korunur, dönüştürülür ve basit öncüllerden biyolojik makromoleküller üretilir. Metabolik yollar, düzenleyici enzimlerin aktivitesi altında yaşamı sürdürmek için gerekli birçok farklı aktivite arasındaki etkileşimi sağlamak için, oldukça yüksek oranda ilişkilendirilmiştir (Nelson ve Cox 2005).

Enzim, kelime anlamı olarak eski Yunanca'da, ilk kez mayalardan elde edildiği için, "mayada bulunan" (in yeast) anlamına geliyorsa da, günümüzde enzimler yaşayan tüm hücrelerden; hayvanlardan, bitkilerden ve özellikle de mikroorganizmalardan elde edilebilmektedir (Polaina ve MacCabe 2007).

Hücrelerde önemli metabolik görevlere sahip olan enzimler artık çok çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere günlük hayata da girmişlerdir. Enzimler; ekmek, peynir, bebek gıdaları üretimi, alkollü içecekler, meyve suyu ve süt üretiminde, temizlik malzemelerinde ve tıpta teşhis ile tedavi sürecinde büyük miktarlarda kullanılmaktadırlar. Ayrıca kimya, kağıt, nişasta, biyoyakıt, kauçuk ve fotoğraf endüstrisinde, ziraatte, kontakt lens temizleyicilerinden, biyolojik savaşta kullanıma kadar çok geniş alanlarda da enzimler kullanılmaktadır. Enzimlerin bu



kadar fazla alanda kullanılabilir olmasının sebepleri; maliyet bakımından ucuz olması, in-vitro şartlarda aktif olması, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olması ve en önemlisi de enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmamasıdır (Wiseman 1987).

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

Endüstriyel enzimlerin dünya piyasasındaki payı 1,6 milyar doları aşmaktadır (Ottrup ve Jorgensen 2002, Schallmey ve ark. 2004, Zakaria 2006). Gıda, deterjan ve nişasta endüstrileri, endüstriyel enzim üretiminin %75'ini kullanmaktadır ve proteaz, amilaz, lipaz, selüloz, pektinaz gibi hidrolazlar, en yaygın kullanılan enzim gruplarıdır (Topal ve ark. 2000). Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin %80'i polimerlerin doğal yapısını bozabilme yeteneğine sahip olan hidrolazlardır (Kasavi 2006). Endüstriyel enzimler arasında ise %60'lık pazar payı ile en büyük grubu proteazlar oluşturmaktadır (Genckal ve Tari 2006). Bunu %28 ile karbohidrazlar, %2 ile lipazlar ve %10 ile diğer enzim grupları izlemektedir (Dinçbaş 2009). Günümüzde proteaz gibi birçok mikrobiyal enzim, önemli araştırma konusu haline gelmiş, dünyanın hemen her yerinde üretilmeye, sanayi ve endüstri alanında kullanılmaya başlanmıştır.

Proteazlar, proteinlerdeki peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği tarafından geliştirilen ve enzimlerin adlandırılması için kullanılan EC numaralarına göre; sınıf 3 (hidrolazlar) ve alt sınıf 3.4 (peptidazlar ya da peptid hidrolazlar) grubuna ait enzimlerdir ve EC 3.4. başlığıyla ifade edilirler. Proteazlar, endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar olmak üzere iki grupta incelenmektedirler.

Proteazlar doğada, bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kalıntıların dekompozisyonunda önemli rol oynamaktadır. Böylece besin döngüsünü ve bitkilerin besinleri alabilmelerini sağlamaktadırlar (Aoki ve ark. 1995). Proteazlar ayrıca çamaşır deterjanları, deri, et, süt, ilaç, bira, fotoğrafçılık, organik sentezler ve atık muamelesinde kullanılmaktadır (Kıran ve ark. 2006).

Proteazlar, endüstrinin hemen her alanında kullanılan diğer enzim grupları gibi çoğunlukla mikroorganizmalardan elde edilirler. Bunun nedeni mikrobiyal enzimlerin bitkisel, hayvansal ya da kimyasal olarak üretilen enzimlere göre önemli avantajlara sahip olmalarıdır. Katalitik aktiviteleri çok yüksektir, istenmeyen yan ürünler oluşturmazlar, daha stabil ve ucuzdurlar, ayrıca tek bir üretim prosesinde çok fazla miktarda üretmek mümkün olmaktadır (Zeman ve Mcree 1985).

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

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

Bu tez çalışmasında kendi doğal kaynaklarımızdan izole edilecek olan *Bacillus* sp.'lerin proteaz üretim kapasitelerinin belirlenmesi ve enzim üretim ortamının değiştirilmesi dikkate alınmış olup, üreme ortamında farklı karbon (C) ve azot (N) kaynakları ile metal iyonlarının kullanımının, bakteri üreme ve enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması planlanmıştır. Ayrıca enzimin yüksek

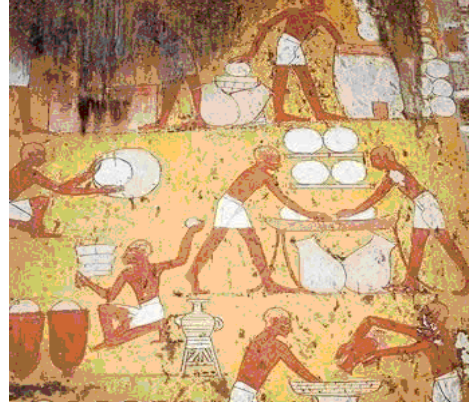
verimde eldesi için, tarafımızdan modifiye ortam hazırlanarak, bu ortamda üretilen *Bacillus* sp.'den elde edilen proteaz enziminin karakterize edilmesi amacıyla optimum sıcaklık ve termostabilitesi, optimum pH ve stabilitesinin tespiti ile metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Diğer yandan, enzim kısmi olarak saflaştırılmış ve moleküler ağırlığının tespiti yapılmıştır.

Doğrudan uygulamaya yönelik olarak hazırlanan bu çalışma sonucunda, kendi doğal kaynağımızdan izole edilen *Bacillus* sp. N-40'ın ürettiği proteaz enziminin yem, deterjan ve tekstil endüstrisinde kullanılabilirliği araştırılarak, ülke ekonomisine katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

## 1. KAYNAK ÖZETLERİ

### 1.1. Proteazların Tarihçesi

Tarih öncesi devirlerden beri enzimler hayatın birçok alanında kullanılmakta ve günümüzde de olduğu gibi bilinmeden enzim üretiminden faydalanan medeniyetlere ticari olarak büyük katkıda bulunmaktaydı. İlk ekmeğin milattan önce 3000 yıllarında Mısırlılar tarafından mayalanma olayının bilinmeden kullanımıyla, ilk şarabın ise fermentasyon olayının bilincinde olmayan insanlar tarafından milattan 8500 yıl önce üretildiği arkeolojik kaynaklarda belirtilmektedir (Şekil 1.1). Proteinlerin enzimatik hidrolizinden de çok eski çağlardan beri çeşitli amaçlarla bilinçsiz olarak faydalanılmıştır.



**Şekil 1.1.** Eski Mısır Medeniyeti' nde şarap ve ekmeğin yapımı (www.touregypt.net, 2009).

1700' lerin sonlarına doğru proteazların, etlerin yumuşatılmasında, gübre ve peynir yapımında buzağuların mide mukozasının kullanılmasıyla ve derilerin tabaklanmasında basit olarak kullanıldığı belirtilmiştir (D'Reaumur 1752). Ancak proteazlar üzerine daha detaylı çalışmalar, 1783 yılında, Spallanzani ile başlamıştır. Araştırmacı, mide sıvısının protein parçalama özelliğinde olduğunu saptamıştır (Aunstrup 1973, Hoffmann-Ostenhof 1954). 1836 yılında ise Schwann, pepsinin de benzer etki gösterdiğini ortaya koymuş ve bu enzimi yüksek oranda saflaştırılmıştır. Aynı yıllarda, çeşitli kaynaklardan proteolitik enzimler izole edilmiş ve mide sıvısından elde edilene 'pepsin', pankreastan

salgılanana 'tripsin', bağırsak mukozasından izole edilene ise 'erepsin' adı verilmiştir ( Keay ve ark. 1972).

1894 yılında ise Japon Jokichi Takamine mikrobiyal enzim üretimine ilk defa *Aspergillus oryzae*'den ürettiği bir preparat ile başlamıştır (Takamine 1894). Bu enzim preparatı karbohidraz ve proteolitik enzimlerden oluşmakta ve 'Takadiastas' adı ile bilinmektedir. 1907 yılında hayvansal organların da enzim kaynağı olarak kullanılabileceği Otto Röhm tarafından, pankreatik proteaz enziminin deri endüstrisinde kullanımı ile ispatlanmıştır (Röhm 1908). Röhm bu enzimi ürün haline getirmiş ve patentini alarak 'Oropon' adıyla satışa sunmuştur. Papaya proteazı olan papain Wallerstein tarafından, biranın bulanıklığının giderilmesinde kullanılmıştır. 1913 yılında ilk enzimatik deterjan yine Otto Röhm tarafından üretilmiş, deterjanın pH değerini 9'un altında tutabilmek için içerisine sodyum karbonat ve sodyum bikarbonat eklenmiş ve 'Burnus' adıyla satışa sunulmuştur (Uhlig 1998). Aynı yıllarda, Boidin ve Efferont, bir *Bacillus* sp'den sıvı besiyerinde amilaz ve az miktarda proteaz içeren enzim preparatı hazırlamışlar ve ürettikleri tekniğin patentini almışlardır (Aunstrup 1973).

1930'larda Bergman ve arkadaşları, proteinlerin peptid bağlarının enzimlerle parçalandığını bildirmişlerdir. 1930-1936 yılları arasında ise J. Northrop'un pepsin, tripsin ve kimotripsin enzimlerini kristalize etmesiyle enzimlerin protein yapısında oldukları kesin olarak doğrulanmıştır. 1938 yılında ise Northrop, Kunitz ve Herriott adlı araştırmacılar ilk defa 'Kristalize Enzimler' adlı yayınlarında pepsinojen, pepsin inhibitörleri, karboksipeptidaz, ribonükleaz, heksokinaz, difteri antitoksini ve birkaç farklı çeşitte enzimi saflaştırıp, kristalize ettiklerini açıklamışlar (Neurath 1999) ve bu çalışmalarını ile 1946 Nobel Kimya Ödülü'nü kazanmışlardır.

1940-42 yıllarında ise, enzimlerin spesifikliğı üzerine yapılan çalışmalarda, her enzimin belirli etkileri olduğu açıklanmış, hayvansal ve bitkisel kaynaklı proteazlarda saflaştırma işlemleri yapılmıştır (Balk 1991). *Bacillus subtilis* ve *Aspergillus* sp'ler tarafından sentezlenen diğer mikrobiyal proteazlar ise, 1950-52 yılları arasında izole edilmiş, sonraki yıllarda da *Actinoplanes* sp., *Arthrobacter* sp.,

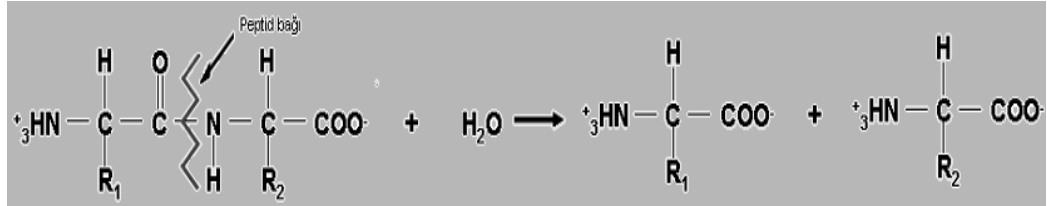
*Aspergillus sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Candida sp.*, *Clostridium sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Streptomyces sp.* gibi farklı mikroorganizma türleri enzim kaynağı olarak belirlenmiştir (James ve David 1986).

1959'da Jaag adlı araştırmacı, *Bacillus subtilis*'ten izole edilmiş proteaz içeren farklı bir enzimatik deterjan üretmiştir (Uhlig 1998). 1950 yıllarında, dünya çapında deri, bira ve tekstil sanayisinde kullanılmak üzere en fazla proteaz ve amilaz üretilmekte, diğer enzimler ise çok düşük bir kullanım alanına sahipti. 2. Dünya Savaşı'nı takip eden yıllarda fermentasyon teknolojisinde büyük bir patlama yaşanmış ve büyük ölçüde antibiyotik üretimi yapılmıştır. 1960'da Novo Nordisk firması, *B. licheniformis*'ten deterjanlarda kullanılmak üzere bakteriyel proteaz üretimine başlamıştır. Ancak kullanımın başlamasıyla birlikte, İngiltere'de alerjik reaksiyonlar ve akciğer kanserleri görülmeye başlanmıştır. Ancak yapılan çalışmalar sonucu, enzimlerin granüler hale getirilmesi ile mevcut riskler önlenmiştir. 1971 yılında da Amerikan National Academy of Sciences bu deterjanların tamamen zararsız olduğunu açıklamıştır (Uhlig 1998).

Günümüzde, kromatografik ve elektroforetik yöntemlerin geliştirilmesiyle, proteazlar ve diğer enzimler hakkındaki çalışmalar büyük bir hıza ulaşmıştır. Enzimlerin kristalleştirilebildiğinin gösterilmesi, enzimlerin yapılarının X-ışını kristalografisi ile çözülmesini mümkün kılmıştır. Kristalografi ilk defa, David Chilton Phillips önderliğinde bir grup tarafından lizozim enzimi için başarılı ve 1965'te yayımlanmıştır (Blake ve ark. 1965). Bundan sonra da yüzlerce enzimin üç boyutlu yapısı çözümlenmiş ve halen de çözülmeye devam etmektedir.

## 1.2. Proteazların Etki Mekanizmaları

Proteolitik enzimler, proteazlar ya da peptidazlar, proteinlerdeki peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir (Şekil 1.2).



**Şekil 1.2.** Proteazların etki mekanizması.

Proteazlar, hidroliz işlemini tiplerine göre farklı yollarla gerçekleştirmektedirler. Örneğin, bir aspartil proteaz hidroliz işlemini genel asit-baz mekanizması ile gerçekleştirir ve su direkt tepkimeye katılırken, sistein proteazların aktivite gösterebilmeleri açılasyon- deaçilasyon mekanizmalarına bağlıdır (Bell 2006).

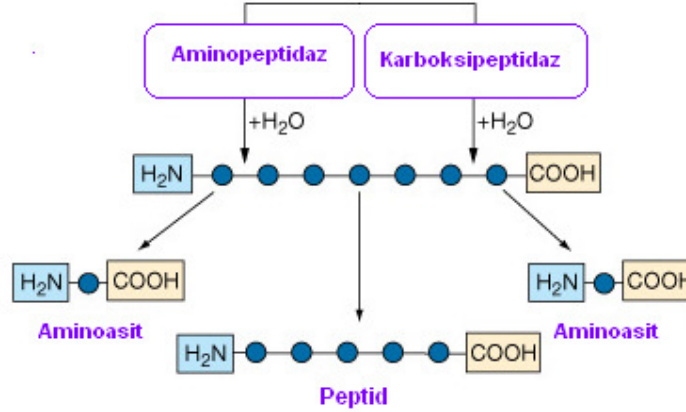
## 1.3. Proteazların sınıflandırılması

Milletlerarası Biyokimya Birliği (International Union of Biochemistry) tarafından yapılan enzim sınıflandırılmasında tüm enzimler katalizledikleri reaksiyon tipine göre 6 sınıfa ayrılmışlar ve proteazlar 3. sırada yer alan hidrolazlar sınıfına dahil edilmişlerdir (Mahler ve Cordes 1966). Proteazların alt sınıfı peptid bağlarını parçalamadan dolayı 3.4 olarak belirlenmiştir. Büyük bir aileyi (E.C 3.4) oluşturan proteazlar, Avrupa Biyokimya Komitesi tarafından EC sisteminde, ekzopeptidazlar (E.C 3.4.21-99) ve endopeptidazlar (E.C 3.4.11-19) olmak üzere 2 gruba ayrılmışlardır.

### 1.3.1. Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar, polipeptid zincirlerinin uçlarındaki serbest amino (N) ya da karboksil (C) gruplarına atak yapmaktadırlar. Ekzopeptidazlar etki ettikleri

protein zincirinin sonundaki grup serbest karboksil ise karboksipeptidaz, serbest amino grubu ise aminopeptidaz olarak adlandırılırlar.

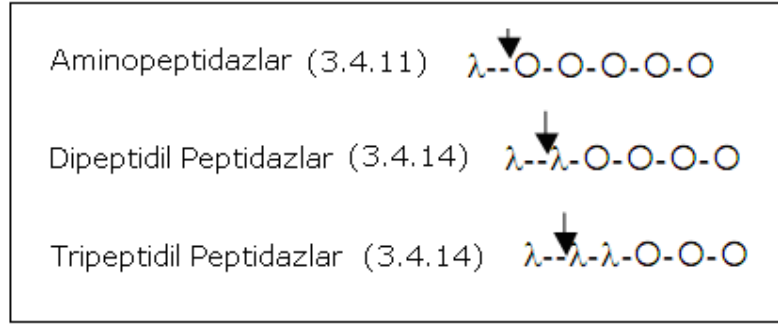


**Şekil 1.3.** Ekzopeptidazların etki mekanizmaları (Silverthorn 2004).

### 1.3.1.1. Aminopeptidazlar

Aminopeptidazlar, polipeptid zincirinin ucundaki serbest N terminaline atak yapmaktadırlar. Enzim, tek bir aminoasidi, bir dipeptidi ya da bir tripeptidi hidroliz etmesine göre isim almaktadır (Şekil 1.4). Aminopeptidazların N-terminal metionini (Met) uzaklaştırdıkları bilinmektedir. Bakteri ve fungusları da içeren mikroorganizmaların çoğunda bulunmaktadır. Genellikle hücre içi enzimlerdir fakat *A. oryzae* tarafından üretilen aminopeptidaz hücre dışı bir enzimdir. Bakteri ve funguslardan üretilen aminopeptidazların substrat spesifisiteleri, hidroliz ürünlerinin profilleri temel alındığında farklı olabilmektedir. Örneğin, *E.coli*'den üretilen *aminopeptidaz I* 400 kDa'luk büyük bir proteazdır. Optimum pH'sı 7.5-10.5 arasındadır ve optimum aktivite için Mg<sup>+2</sup> ya da Mn<sup>+2</sup>'a ihtiyaç duyarlar. *Bacillus licheniformis* aminopeptidazın ise, molekül ağırlığı 34 kDa'dur ve aktivitesi Co<sup>+2</sup> iyonları varlığında artar. Diğer taraftan, *B. stearothermophilus* aminopeptidaz II bir dimerdir ve molekül ağırlığı 80-100 kDa arasında olup, Zn<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup> ve Co<sup>+2</sup> iyonları tarafından aktive olmaktadır (Rao ve ark. 1998).



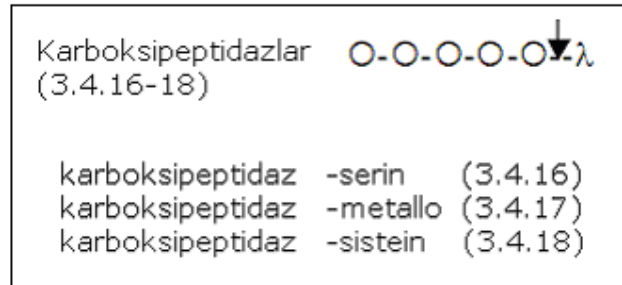


**Şekil 1.4.** Aminopeptidazların alt grupları ve etki mekanizmaları (Tanksale 2001).

### 1.3.1.2. Karboksipeptidazlar

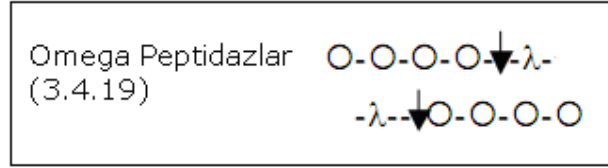
Karboksipeptidazlar, polipeptid zincirinin serbest bir C ucunda işlevseldir ve tek bir aminoasit ya da bir dipeptidi ayırmaktadırlar (Şekil 1.5).

Karboksipeptidazlar enzimlerin aktif bölgesindeki aminoasit çeşitlerinin yapısına göre üç ana gruba ayrılırlar. Bunlar; serin karboksipeptidazlar, metallo karboksipeptidazlar ve sistein karboksipeptidazlardır. *Penicillium* sp., *Saccharomyces* sp. ve *Aspergillus* sp.'den izole edilen serin karboksipeptidazların substrat spesifisiteleri ayındır fakat optimum pH, stabilite, moleküler ağırlık ve inhibitörlerin etkisi gibi diğer özellikleri farklıdır. *Saccharomyces* sp., ve *Pseudomonas* sp.'den izole edilen metallo karboksipeptidazlar aktiviteleri için  $\text{Zn}^{+2}$  ya da  $\text{Co}^{+2}$  iyonuna ihtiyaç duyarlar. Sistein karboksipeptidazlar, aktif bölgelerinde sistein aminoasidi içerirler (Rao ve ark. 1998 ).



**Şekil 1.5.** Karboksipeptidazların alt grupları ve etki mekanizmaları (Tanksale 2001).

Bazı ekzopeptidazların tepkime mekanizmaları tam olarak açıklanamadığından alt grup olarak da sınıflandırılmışlardır. Omegapeptidaz olarak bilinen bu peptidazlar, NC-IUBMB (Uluslar arası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Adlandırma Komitesi) tarafından E.C 3.4.19 alt-alt sınıfına yerleştirilmişlerdir.



**Şekil 1.6.** Omega peptidazların etki mekanizması (Tanksale 2001).

Omegapeptidazlar serbest bir N ya da C terminal ucuna ihtiyaç duymazlar. Endopeptidazlardan farklı olarak N ya da C terminal uçlara yakın bölgelerde hidroliz etme yeteneğine sahiptirler (Şekil 1.6). Amino veya karboksipeptidazların direkt etkide bulunamadıkları polipeptid bölgelerini hidroliz ederler. Farklı özelliklerde omegapeptidazlar vardır. Bunlar; ubiquitinil hidrolazlar, piroglutamil peptidazlar ve gama-glutamil hidrolazlardır ([http://merops.sanger.ac.uk/about/about\\_9.htm](http://merops.sanger.ac.uk/about/about_9.htm), 2005 ).

### 1.3.2. Endopeptidazlar

Endopeptidazlar, polipeptid zincirlerinin iç bölgelerindeki peptid bağlarına etki etmeleri ile karakterize edilirler (Şekil 1.7). Serbest amino (N) ya da karboksil (C) grubunun varlığı enzimatik aktivite üzerine negatif etki yaratmaktadır.



### 1.3.2.1. Serin proteazlar

Serin proteazlar, aktif bölgelerinde serin içermeleri ile karakterize edilirler. Serin proteazlar substrat tercihlerine göre 3 grupta toplanırlar; tripsin benzeri serin proteazlar, pozitif yüklü aminoasitten sonraki peptid bağıını hidrolizlerler, kimotripsin benzeri serin proteazlar, büyük hidrofobik aminoasitten sonraki peptid bağıını hidrolizlerler, elastaz benzeri serin proteazlar ise küçük hidrofobik aminoasitten sonraki peptid bağıını hidrolizlemektedirler (Rao ve ark. 1998).

Serin proteazlar, virüsler, bakteriler ve ökaryot organizmalarda çok sık ve bol sayıda olmakla birlikte hayati önem taşımaktadırlar. Serin proteazlar, 7 ile 11 arasında değişen pH'larda aktiftirler, bu nedenle bunlara serin alkalın proteazlar da denmektedir. Moleküler ağırlıkları 18-35 kDa arasında değişmektedir. Küfler, maya mantarları, birçok bakteri türü ve bazı makro mantar çeşitleri bilinen serin proteaz üreticileri olsa da, subtilisin üreten bazı *Bacillus sp.*'ler en iyi serin proteaz üreticilerindendir (Rao ve ark. 1998). Bilinen en önemli serin proteazlar ise triptaz, lipaz, elastaz, kimotripsin, tripsin, trombin ve fosfolipazdır.

### 1.3.2.2. Aspartik proteazlar

Asidik proteazlar olarak bilinen aspartik endopeptidazlar aktif merkezlerinde katalitik aktiviteleri için iki aspartik aside ihtiyaç duyar. Aspartik proteazlara örnek olarak; pepsin, retropepsin, renin, katepsin D ve HIV-1 proteazı verilebilir (Szecsi ve ark. 1992). Düşük pH'larda aktivite gösteren aspartik proteazların moleküler ağırlıkları 30-45 kDa arasında değişmektedir ve heksapeptid yapısında olan pepstatin adlı inhibitör tarafından inhibe edilmektedirler (Rao ve ark. 1998).

### 1.3.2.3. Sistein/ Tiyol proteazlar

Sistein proteazlar tüm prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda bulunmaktadır. Tiyol proteazlar ortamda sadece HCN (hidrosiyamik asit) ve sistein bulunması durumunda aktifleşirler. Sistein peptidazın aktif merkezindeki bir sistein rezidüsü, katalitik mekanizmadaki asıl rolü oynamaktadır. Aktif merkezdeki bu tiyol grubu oksidasyona karşı duyarlıdır ve ağır metallerle reaksiyona girebilmektedir (Kenny 1999). Aktif merkezlerinin spesifitesine göre sistein proteazlar 4 gruba

ayrılmaktadır. Bunlar; papain benzeri tiyol proteazlar, tripsin benzeri tiyol proteazlar, glutamik aside özel ve diğer tiplerdeki tiyol proteazlardır. En iyi bilinen grup papain benzeri endoproteazlardır (Gençkal 2004). Sistein proteazlar, 'kaspazlar' olarak da bilinmektedirler. Kaspazların çoğu apoptoziste rol almaktadırlar ve birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskad (şelale tarzı reaksiyon dizisi)' a neden olurlar (Ulukaya 2003). Sistein proteazlar nötr pH'larda aktivite gösterirler.

#### **1.3.2.4. Metallo proteazlar**

Metalo endopeptidazlar, katalitik mekanizmasında yaygın olarak çinko, kobalt veya diğer metal iyonlarını kullanılmaktadırlar. EDTA ile inhibe edilebilen metallo proteazlar, aktif merkezlerindeki fonksiyonel gruplara göre sınıflandırılırlar. En iyi bilinen tipleri serralysin, adamalysin gibi matriks metalloproteazları ve hücre zarının yapısında bulunan yüzey membran proteinleri olan ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) proteinleridir (Edwards ve ark. 2008).

#### **1.4. Proteaz Kaynakları**

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

##### **1.4.1. Bitkisel kaynaklar**

Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanılmasını, bitkinin yetiştiği iklim koşulları ve kültivasyon toprağının uygunluğu gibi farklı faktörler belirlemektedir. Bitkisel kaynaklı proteazlar, aktif merkezlerindeki sülfidril grupları ile karakterize edilirler ve günümüzde bitkilerden elde edilen tüm proteazlar aynı gruba aittirler. Enzimlerin aktivitesinden ise bu sülfidril grupları sorumludur (Uhlig 1998).

Bitkisel kaynaklı proteazlar özellikle tropikal bitkilerden elde edilmektedir. Bilinen en güçlü bitkisel proteaz kaynakları; papaya (*Carica papaya*), ananas

(*Anana sativa*), bazı *Ficus* türleri (*F. carica*, *F. glabrata*), enginar (*Cynera cardunculus*) ve soya fasülyesi (*Soya hispidus*) dir (Ward 1985a).

Endüstriyel proteazların en büyük bitkisel kaynağı ise olgunlaşmamış, yeşil papaya bitkisidir ve papaya enzimine 'papain' adı verilmektedir. Papainin kaynağı olan papaya bitkisi ile ilgili araştırmalar, tropikal bölgelerde yaşayan bazı yerli halkların eti pişirmeden önce bu bitkinin yapraklarına sarmaları ve böylece etin daha iyi pişeceği ve sindirileceği yönündeki inançlarının bazı bilim adamlarının dikkatini çekmesi sonucu başlamıştır. Araştırmalar sonunda eti yumuşatan ve kolayca sindirilmesini sağlayan faktörün yapraklarda ve meyvelerde bulunan papain enzimi olduğu anlaşılmıştır. Fakat sanılanın aksine meyvelerde yapraklardan daha çok papain enzimi bulunmuştur (Uhlig 1998).

Papain, vücudumuzda karbohidratları, yağları ve diğer bileşikleri de etkileyerek tüm sindirim sistemini olumlu yönde düzenleme yeteneğine de sahiptir. Papain'e, mide tarafından salgılanan ve proteinleri parçalayan enzim olan pepsin'e benzerliği nedeni ile bitkisel pepsin adı da verilir ([www.bitkisel-tedavi.com/papaya](http://www.bitkisel-tedavi.com/papaya) 2009). Papaya bitkisi Hindistan, Srilanka, Uganda ve Zaire'de yetişmektedir.

Olgunlaşmamış bitki alınır ve bıçaklarla iyice kıyılarak yapısındaki şeffaf lateks maddesi elde edilir. Kurutulduktan sonra beyaz renge dönen maddenin 1 kg'ı 200 g ham papain içerir. Bir ağaçtan yaklaşık 450 gram lateks elde edilebilmektedir (Schwimmer 1981). Yılda 500 ton ham papain enzimi üretilmekte ve 15 milyon dolarlık değer sağlanmaktadır ( Uhlig 1998).

Ham papainde %10 kadar lateks proteini, %45 civarında kimopapain A ve B, endoglukanaz, karboksipeptidaz, lizozim, amilaz ve az miktarda da lipaz enzimleri bulunmaktadır. Papain, 70°C'de 90 dakika kaynatılmaya dayanıklıdır (Uhlig 1998).

'Bromelain' ise ananas ağacından elde edilen bir proteazdır. Enzim, ilk defa 1892'de Chittenden adlı bir araştırmacı tarafından ananas öz suyunda tanımlanmıştır. Bromelain terapötik destek olarak 1957'de tanıtılmış ve o zamandan beri bilimsel literatürde yerini almış 600'den fazla araştırma

makalesiyle birçok hastalığa önemli faydaları olduğu kanıtlanmıştır (<http://en.wikipedia.org/wiki/Bromelain>, 2006).

Enzimin ilk fark edilen özelliği, hazmı kolaylaştıran bir madde olmasıdır. Bromelain vücuttaki proteinleri sindiren bir enzimdir. Bu yüzden gıda sanayisinde ve bazı kültürlerde et yumuşatıcı olarak kullanılmaktadır. Bu enzim sadece mide asidine yardımcı olmakla kalmayıp, aynı zamanda bağırsaklardaki alkalen ortama da olumlu etkilerde bulunmaktadır. Enzim, bir sistein proteaz olarak karakterize edilir ve pH 5-9 arasında aktiftir (Rao ve ark. 1998).

Bromelainin etkileri sadece sindirim sistemini desteklemekle sınırlı değildir. Antienflamatuar etkisi sayesinde romatoid artrit (Rhumatoid arthritis) ve sinüzit (sinusitis) tedavisinde yardımcı olduğu da klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bromelain, aşırı trombosit yapışkanlığını önlediği için doğal bir kan incelticidir ve enzimin bu özelliği angina (Angina pectoris-kalbe yeterli kan ulaşmaması sonucu ortaya çıkan göğüs ağrısı) ve tromboflebit (kan pıhtılaşmasının sonucu olarak oluşan damar iltihabı) semptomlarının azalması şeklinde kendini göstermektedir (<http://en.wikipedia.org/wiki/Bromelain> 2006).

İncir' den elde edilen fisin enzimleri çok yüksek proteaz aktivitesine sahiptir. 10-15 g bitkiden 100-150 mg fisin elde edilebilmektedir (Uhlig 1998) ancak kurutma işlemi aktivitenin çoğunu yok etmektedir. Fisin, yüksüz ve aromatik aminoasitler içeren bağlarda etkili olmaktadır. Fisin'in optimum pH'sı 6.5'tur ve pH 4.0-9.5 arasında etkilidir. Enzim, antik çağda peynir mayası olarak sütün pıhtılaştırılmasında kullanılmıştır. Endüstride ise biracılık, et, yem ve deniz ürünlerinde kullanılmaktadır (<http://www.piercenet.com> 2006).

#### **1.4.2. Hayvansal kaynaklar**

Hayvansal proteazlar enzimolojinin başlangıcından beri bilinmektedir. Protein ve enzimlerin kimyasal yapıları keşfedilmeden önce pepsin ve pankreas proteazlarının protein sindirici özellikleri olduğu bilinmekteydi. Günümüzde ise en çok bilinen hayvansal kaynaklı proteazlar; pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve renindir. Hayvansal proteazlar, gıda sanayisinde, protein hidrolizatları üretiminde, et ve balık atıklarının gideriminde, deri endüstrisinde ve tıpta kullanılmaktadır.

Tripsin, pankreastan salgılanan, ince bağırsakta proteinleri parçalayıcı özelliğe sahip sindirim enzimidir. Enzimatik mekanizması diğer serin proteazlara benzer. Tripsin, bakteriyel ortamın hazırlanmasında ve bazı özel tıbbi uygulamalarda kullanılır. Kimotripsin, proteolizi gerçekleştirebilen hayvansal pankreatik ekstraktlarda bulunan bir sindirim enzimidir. Bir serin proteazdır ve peptid bağlarını fenilalanin, tirozin ve triptofan aminoasitlerinden sonraki karboksil gruplarından hidrolizler. Saf kimotripsin pahalı bir enzimdir ve yalnızca diagnostik ve analitik uygulamalarla süt protein hidrolizatlarının deallerjenasyonunda kullanılmaktadır (Rao ve ark. 1998).

Pepsin, gıda proteinlerini peptidlere parçalamak için, hemen hemen tüm omurgalıların midelerinde ana hücreler tarafından salgılanan asidik bir proteazdır. Pepsin 1836'da Theodor Schwann tarafından keşfedilen ilk hayvansal enzimdir. Aktif enzim, enzimin zimojen formundan yani pepsinojenden oluşturulur. Pepsin bir aspartik proteazdır ve pH 1-2 arasında optimum aktivite göstermektedir. pH 6'nın üzerinde inaktive olur ve iki hidrofobik aminoasit arasındaki peptid bağlarının hidrolizini katalizler (<http://en.wikipedia.org/wiki/Pepsin>, 2006).

Renin, anne sütünü sindirmek için her memelinin midesinde üretilen doğal, kompleks bir enzimdir ve sütü pıhtılaştırır. Hayvansal bazlı renin (rennet) için en yaygın kaynak yeni doğan sütle beslenmiş buzağının kesilen şirdenidir (Fankhauser 2007). Renin, pepsine benzer bir proteazdır ve bütün süt veren memelilerin midelerinde inaktif pro-renin olarak bulunur. Pepsin işleviyle ya da kendi kendine katalizle aktif renine dönüşür. Süt endüstrisinde süt kazeininin çöktürülmesinde ve lor üretiminde kullanılmaktadır (Rao ve ark. 1998).

Ökaryotik hücrelerde ise proteazlar, organizmanın türüne göre daha kompleks görevlerde bulunmaktadır. Bu enzimler kanın pıhtılaşması, kontrollü hücre ölümü ve doku farklılaşması gibi yaşam için önemli bazı biyolojik süreçlerde rol oynar. Triptaz, kimaz, karboksipeptidaz, katepsin C ve G gibi nötral proteazlar özellikle insan ve rat mast hücrelerindeki salgı granüllerinin dominant protein unsurlarıdır ve seçici olarak bu hücrelerde lokalize olurlar.



Nötral proteazlar, diğer hücre tiplerine oranla memeli mast hücrelerinde daha yüksek düzeylerde bulunduğundan, biyolojik doku ve sıvılarda, mast hücrelerinin rol oynadığı biyolojik olayların tanımlanmasında ölçüt olarak kullanılmaktadırlar.

Son yıllarda çeşitli proteaz inhibitörleri kullanılarak belittiğimiz proteaz sınıflarının diğer üyeleri de belirlenmeye çalışılmaktadır. Farklı hastalık durumlarında farklı tipte proteazlar rol oynadığından bu enzimlerin inhibitörlerinin bilinmesi yeni terapötik ajanların geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir (Henningsson ve ark. 2005).

### **1.4.3. Mikrobiyal kaynaklar**

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

Günümüzde en çok kullanılan proteaz kaynağı, bakteri, fungus ve virüs orijinli olan mikrobiyal proteazlardır. Mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamalar için hemen hemen tüm özelliklerinin istenen yönde değiştirilebilmesi, bitki ve hayvansal proteazlara göre daha saf elde edilebilmesi ve mikroorganizmaların uygun bir kültür ortamında üretilmesi mümkün olduğundan mikrobiyal kaynaklı proteazlar bitki ve hayvan kaynaklı proteazlara göre daha çok tercih edilmektedirler (Kıran ve ark. 2006).

Mikrobiyal proteazlar aktif merkezlerine göre sınıflandırılmaktadırlar ve en önemli grupları; serin-, metallo- ve karboksil proteazlardır. Ayrıca literatürde 'jelatinaz', 'keratinaz', 'kazeinaz' şeklinde yapılan sınıflandırmalara da rastlamak mümkündür (Novel ve ark. 1963).

Fungus orijinli proteazları üreten mantarlar, bakterilerden daha geniş kapsamlı enzim üreticileridirler. Örneğin, *Aspergillus oryzae* asit, nötral ve alkalin proteazları birlikte üretebilmektedir. Ayrıca fungal proteazlar pH 4-11 gibi

geniş bir pH aralığında aktivite gösterirler. Bakteriyel kaynaklı enzimler ile karşılaştırıldıklarında bakteriyel enzimlerden daha düşük reaksiyon hızına ve daha düşük bir sıcaklık toleransına sahiptirler. Fungal enzimler katı hal fermentasyon prosesi ile üretilmektedirler. Fungal asit proteazlar pH 4.0-4.5 arasında optimuma sahiptirler, pH 2.5-6.0 arasında kararlıdır. Özellikle peynir endüstrisinde dar pH ve sıcaklık spesifitesinden dolayı kullanılırlar.

Fungal nötral proteazlar ya da metalloproteazlar, pH 7.0' de aktiftirler ve şelatlayıcı ajanlar tarafından inhibe olurlar. Protein hidrolizatlarının acılığının azaltılmasında kullanılmaktadırlar. Fungal alkalin proteazlar ise gıda proteinlerinin modifikasyonunda kullanılırlar (Rao ve ark. 1998, Uhlig 1998). Fungal proteazlar endo ve ekzopeptidazlar olup, çok geniş çeşitlilikte salgılanabilmektedirler (Gripon 2003).

Virus orijinli proteazlar, özellikle virüs proteinlerine olan hassasiyetleri dolayısıyla önemlidirler. Viral proteazlar, viral replikasyon ve birleşimi koordine etmek ve düzenlemek için optimize edilmişlerdir. Yapılan araştırmalarda en önemli nokta viral proteazların üç boyutlu yapısı ve sentetik inhibitörler ile etkileşimidir. Serin, aspartik ve sistein peptidazlar değişik virüslerde bulunmaktadır. Virüs kaynaklı peptidazların hepsi endopeptidazlardır (Babe ve Craik 1997).

Bakteri orijinli proteazlar, büyük polipeptidlerin daha küçük peptidlere ve amino asitlere hidrolizine yardımcı olurlar, böylelikle onların hücre tarafından absorpsiyonunu kolaylaştırırlar. Hücre dışı enzimler, onların depolimerleşme aktivitesinden dolayı beslenmede büyük bir rol oynar. Hücre içi proteazlar hücrede uygun protein dönüşümü yapmaya katkısıyla bilinirler. *E.coli*'de, *lon* geni tarafından üretilen ATP-bağlı proteaz *La*, anormal proteinlerin hidrolizinden sorumludur (Çelik 2006).

Spor oluşturan bakterilerde sporların, mayalarda askosporların, civık mantarlarda spor yapıların oluşumu, funguslarda konidial boşalım gibi olayların tümünde protein dönüşümleri gerçekleşmektedir. Sporlaşma için bir proteaz gereksinimi proteaz inhibitörlerinin kullanımıyla kanıtlanmıştır. Maya diploidlerinde asko spor oluşumunun proteaz A aktivitesindeki artışa bağlı olduğu gösterilmiştir.

Bakteri orijinli proteazlar, başlıca nötral ve alkali olmak üzere ticari proteazların çoğu *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilmektedirler. Bakteriyel nötral proteazlar, pH 5-8 arasında, düşük sıcaklıklarda aktiftirler ve bağıl olarak düşük sıcaklık toleransına sahiptirler. Gıdaları hidrolizlediklerinde oluşan hidrolizatlarda daha az acı tat oluşturduklarından gıda endüstrisinde hayvansal proteazlara göre daha çok tercih edilmektedirler. Sahip oldukları düşük termotoleransları gıda hidrolizatlarının üretimi sırasında reaktivitelerinin kontrolü için avantajlıdır (Rao ve ark. 1998).

### 1.5. *Bacillus* Hakkında Genel Bilgiler

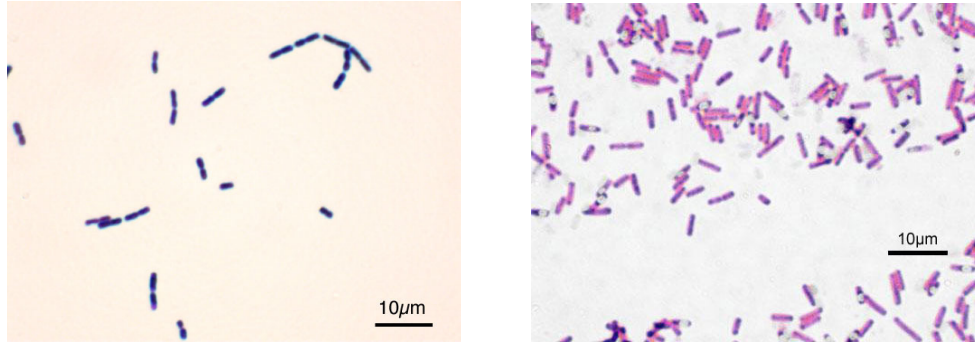
'Bacillaceae' familyası içerisinde *Bacillus* ve *Clostridium* olmak üzere iki ana alt grup bulunmaktadır (Garrity 2004). Başlangıçta *Bacillus* türleri arasında yer alan bazı bakteriler, DNA yapılarındaki G+C oranlarına göre ayrı cinsler olarak tanımlanmıştır. Bunlar; *Alicyclobacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Virgibacillus* ve *Halobacillus* cinsleridir. Son sınıflandırma ile *Bacillus* grubu içerisinde 50 geçerli tür kalmıştır. Burada en iyi bilinen türler ise *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. sphaericus* ve *B. thuringiensis*'tir. Bunların rRNA dizilişlerine bakılarak üç tür *Bacillus* ana grubu belirlenmiştir. Bunlar; "*B. subtilis*" grubu, "*B. cereus*" grubu ve "*B. circulans*" grubudur (Logan ve Turnbull 1999).

*Bacillus* türlerinin çoğu tabiatta saprofit olarak bulunmaktadır. *Bacillus* türleri tabiatta çürüten organik materyallerde, toz, toprak, yeşil sebzelerde, suda ve bazı türlerde de normal vücut florasında bulunmaktadır. Bazı türler, insanlarda, hayvanlarda, diğer memelilerde ve böceklerde zorunlu patojen veya fırsatçı enfeksiyon etkenidirler (Logan ve Turnbull 1999, Berkeley ve Logan 1997). *Bacillus*'lar arasında *B. anthracis* ve *B. cereus* insan ve hayvanlarda enfeksiyon oluşturmaları açısından en önemli türlerdir. Bunların dışında kalan *Bacillus* türleri insanlarda veya hayvanlarda nadiren enfeksiyon etkenidirler (Banwart 1983).

*Bacillus* hücreleri çubuk şeklinde ve düzdür, 0,5-2,5 µm eninde 1,2-10 µm boyundadır, uçları yuvarlak ya da kare şeklindedir ve ortamda bazen çiftler ya da zincirler halinde bulunurlar. Hepsi Gram (+) olmakla beraber, yaşlı kültürlerde Gram (-) olarak da görülebilirler. *Bacillus*'lar peritriköz kamçıya sahip olup,

hareketlidirler. Hepsi endospor oluşturmakta olup, endosporlar bazen oval, bazen yuvarlak ya da silindirik şekilde olabilirler. Birçok zorlu koşula karşı oldukça dirençlidirler. Bu cinste yer alan bakteriler hem aerobik hem de fakültatif anaerobik koşullarda üreyebilmektedirler. Sıcaklık, pH ve tuzluluğa karşı yüksek fizyolojik yetenekleri nedeniyle bunlara karşı toleransları vardır. Gelişebildikleri minimum sıcaklık derecesi 25°C ila 75°C arasındadır. Üreyebildikleri minimum pH bazı asidofilik karakterli türler için 7,5 ila 8,0'e kadar çıkmaktadır. Katalaz pozitif olup, fermentatif ya da oksijenli solunum gösteren bir metabolizmaya sahip organotrofturlar. Kolayca kültüre alınabilirler ve yapılarında heterojenlik bulunmamaktadır (Holt ve ark. 1994). Bu grupta bulunan türlerin çoğu nutrient agarda kolayca üreyebilmektedirler (Ayhan 2000). *Bacillus*'ların, rutin besi yerlerindeki koloni morfolojisi bakteri türüne göre farklılıklar göstermektedir.

Koloniler genellikle 1-6 mm arasında dalgalı veya saçaklı kenarlı olmaktadır. *Bacillus*'ların alt tür düzeyinde tanımlanmaları, ancak bakteri morfolojisinin belirlenmesi, biyokimyasal ve fizyolojik testlerin yapılması ile mümkün olabilmektedir.



**Şekil 1.9.** Gram boyama yapılmış *B. cereus* ve *B. subtilis* kolonilerinin mikroskopik görünüşleri ([www.microbelibrary.org/microbelibrary/files/](http://www.microbelibrary.org/microbelibrary/files/), 2009).

*Bacillus* türü mikroorganizmalar endüstriyel olarak kullanılan hemen hemen bütün enzim tiplerini üretebildiklerinden oldukça önemlidirler. Özellikle yüksek sıcaklık ve pH' larda üreyebilen bir *Bacillus* soyunun üreteceği proteaz enzimleri, deterjanlara katkı maddesi olarak eklenmekte ve sıcak su ile daha etkin temizlik sağlayacak yıkama imkanı verebilmektedir. Biyoteknolojide uygulama olanağı bulacağı düşüncesi termofilik enzimlere olan ilgiyi arttırmıştır. Dolayısıyla tekstil ve deterjan endüstrisinde özellikle termofilik ve alkalifilik mikroorganizmaların

ürettiği amilaz ve proteaz üreticisi *Bacillus* türlerinin taranmasına, izolasyon ve identifikasyonuna yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Ayrıca düşük sıcaklıklarda yüksek aktiviteli proteaz ve amilaz üretebilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması ve enzimlerinin deterjan katkı maddesi olarak kullanılması, yüksek enerji sarfiyatını engelleyeceğinden günümüzde oldukça önem kazanmıştır.

### 1.6. *Bacillus* Proteazlarının Özellikleri

*Bacillus* türündeki mikroorganizmalar, proteaz tiplerinden çoğunlukla alkalin serin proteazları üretmektedirler. Bu nedenle *Bacillus* proteazları daha çok alkali özellik göstermektedir.

Alkalin proteazların optimum pH aralığı pH 9.0-11.0 arasında olmakla birlikte, optimum pH değerleri pH 11.5, pH 11-12, pH 12.3 ve pH 12-13 olan birkaç istisna durum da bulunmaktadır. Alkalin proteazlar yüksek izoelektrik noktalarına sahiptirler ve genellikle pH 6.0-12.0 arasında kararlıdır. Optimum sıcaklık değerleri genellikle 50-70°C' dir. Alkolofilik *Bacillus* sp. B 18'den izole edilen enzim istisna olarak 85°C gibi yüksek optimum sıcaklığa sahiptir. *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. ve *Thermus* sp.'den izole edilen alkalin proteazlar da yüksek sıcaklıkta bir miktar termostabilite göstermekle birlikte, ortama Ca<sup>+2</sup> iyonlarının ilavesi ile enzim termostabilitesinde artış gözlenmektedir (Kumar ve Takagi 1999).

Alkalin proteazların moleküler ağırlıkları genellikle 15-30 kDa arasında ise de, birkaç yayında 31.6 kDa, 33 kDa, 36 kDa ve 45 kDa gibi daha yüksek moleküler ağırlığa sahip olan enzimlerin de var olduğu bildirilmiştir. Bazı *Bacillus* türlerinden izole edilen alkalin proteazların çoklu elektroforetik formlara sahip olduğu gözlenmiştir. Bu enzimlerin çoklu formları protein molekülündeki glutamin ya da asparagin aminoasitlerinin geri dönüşümsüz deaminasyonu gibi enzimatik olmayan bir yolla ya da protein molekülünün otoproteolizi ile oluşur (Kumar ve Takagi 1999).

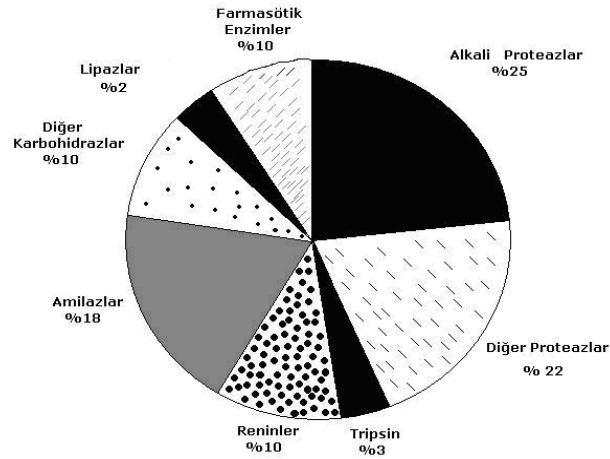
Alkalin proteazlar maksimum aktivite gösterebilmek için Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup> gibi iki değerlikli katyonlara veya bu katyonların bir kombinasyonuna ihtiyaç duyarlar. Bu katyonların *Bacillus* alkalin proteazlarının termal stabilitesini arttırdığı da bulunmuştur. Bu katyonlar enzimi termal denatürasyona karşı

korumakta ve yüksek sıcaklıklarda enzimin aktif konformasyonunu korumada önemli bir rol oynamaktadırlar (Çelik 2006).

Çeşitli inhibitörlerle yapılan inhibisyon çalışmaları enzimin doğası, aktif merkezinin yapılanması ve enzimin kofaktör ihtiyacı konusunda bilgi vermektedir. Alkalen proteazlar genellikle PMSF (Fenilmetilsülfonil florür) ve DFP (Diizopropil florofosfat) ile tamamen inhibe olurlar. PMSF aktif bölgedeki serin aminoasitlerini sülfolar ve aktivite tamamen kaybolur. Bu inhibisyon profili, proteazları serin hidrolazlar olarak tanımlamaktadır. Buna ek olarak, bazı metalo alkalen proteazların EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) ile inhibe olduğu bulunmuştur. Alkalen proteazlar doğal proteinleri hidrolizledikleri başarı ile bazı sentetik substratları da hidrolizleyabilmektedir. Alkalen proteazların ve subtilisinlerin kazeine karşı hemoglobin ya da sığır serum albumine olduğundan daha aktif oldukları bulunmuştur. Alkalen proteazlar tirozin, fenilalanin gibi aromatik ya da hidrofobik aminoasit birimlerinin yer aldığı peptid bağlarının hidrolizine karşı spesifiktirler (Rao ve ark. 1998, Kumar ve Takagi 1999).

### 1.7. Proteazların Endüstride Kullanım Alanları

Proteazlar endüstriyel enzimlerin en önemli grubudur ve toplam enzim payının dünya çapındaki satışının yaklaşık %60'ına sahiptir (Laxman ve ark. 2005). Proteazlar çamaşır deterjanlarında, deri ve tekstil sanayisinde, gıda, kozmetik, ilaç sanayisinde, atıkların işlenmesinde, tıbbi teşhis ve X ışını filmleri üzerindeki jelatinin bozunması amacıyla kullanılmaktadır.



**Şekil 1.10.** Proteazların endüstride kullanım yüzdeleri (Gupta ve ark. 2002).

### 1.7.1. Deterjan sanayisinde proteazlar

Dünya enzim üretiminin yaklaşık %30'unu deterjan enzimi üretimi oluşturmaktadır (Horikoshi 1996). Proteazlar; protein moleküllerini parçalayarak çamaşırlardaki lekeleri çıkabilecek veya deterjan içeriğindeki diğer maddelerle çözünebilecek hale getirmektedir. İdeal deterjan proteazları, yiyecek, kan ve diğer vücut salgılarından dolayı lekelerin büyük bir kısmının uzaklaşmasını kolaylaştırmak için, geniş substrat özgüllüğüne sahip olmalıdır. Deterjan içinde bir proteazın en iyi performansı için anahtar parametre onun izoelektrik nokta (pI) sıdır (Çelik 2006). Deterjan çözeltisinin pH'ı ile pI'sı birbirine uyumlu ise proteazın bu uygulama için çok uygun olduğu kabul edilir. Ayrıca bir proteazın pI değeri ne kadar yüksekse, o proteaz o kadar yüksek pH' larda etki gösterebilmektedir (Çelik 2006).

Proteazlar, günümüzde tüm dünyada çamaşır deterjanı katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Proteazların bu alanda kullanımlarındaki artışın temel sebebi, çevresel kaygılardır. Sıcak yıkamalar için tasarlanmış olan deterjanlar, sodyum fosfat ve 60°C üzerindeki yüksek sıcaklıklarda aktif hale gelen bir beyazlatma maddesi olan sodyum perborat içermekteydi, ancak fosfat kirlenmesini azaltmak için ortaya çıkan çevresel baskılar ve polyester kumaşların kullanımının artması nedeniyle bu içerikler deterjanlarda azaltılmış hatta kaldırılmıştır (Kasavi 2006). Bunun sonucu olarak da bakteriyel enzimlerin kullanımı artmıştır (Orhan 2003).

Yıkama verimini arttıran proteazlar, enzimin karakterine bağlı olarak daha düşük sıcaklıklarda ve daha düşük sürelerde temizlik sağlayabilmektedir. Proteazların özellikle kan ve çim gibi lekelerin çıkarılmasında çok etkili olduğu bilinmektedir. Yiyecek lekelerinin çıkarılmasında ise proteazların amilaz ve lipazlarla birlikte kullanıldığı kombinasyonları daha etkili olmaktadır. Ayrıca, deniz solucanlarından elde edilen proteazlar lens yıkama çözeltilerinde kullanılmakta ve düşük sıcaklıklarda kontak lenslerin temizlenmesini sağlamaktadırlar (Orhan 2003, Öztürk 2004, Aehle 2004).

Çamaşır deterjanlarında kullanılan enzimlerin yüksek verime sahip olması için, 1 saat boyunca 95°C'ye ulaşan sıcaklıklarda pH 9-11 arasında aktivitesini koruması, beyazlatıcı ve yüzey temizleyicilerin varlığında kararlı olması ve de deterjan içerisinde en az 1 sene aktivitesini kaybetmemesi gerekmektedir. Son

yıllarda deterjanlarda kullanılan bütün proteazlar, *Bacillus* türleri tarafından üretilen serin ve alkalin proteazlardır. Çamaşır deterjanlarında kullanılan proteazlar; *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* veya *Bacillus* sp.'den elde edilmektedir (Uhlig 1998, Uludağ 2000, Aehle 2004). *Bacillus* suşları dışında, *Conidiobolus coronatus*'tan elde edilen bir alkalin proteazın da Hindistan'da üretilen ticari deterjanlarda kullanıldığı belirtilmiştir (Maurer 2004). Endüstriyel alanda çalışan birçok firma, sürekli olarak katalitik aktiviteyi artıracak yeni enzimleri bulmaya, onları tanımlamaya ve büyük ölçekli proseslerde elde etmeye çalışmaktadır. Ayrıca protein mühendisliği metodlarıyla var olan suşların özelliklerinin geliştirilmesi ile de deterjan sanayisi için yeni proteazların üretilmesi yoluna gidilmektedir. Birçok firma tarafından ticari olarak üretilen ve ticari adı ile bilinen proteazlar Çizelge 1.1'de verilmiştir.

<b>Ticari Adı</b>	<b>Üretici Firma</b>	<b>Bakteri Kaynağı</b>
Alcalase®	Novozymes	<i>B. licheniformis</i>
FNA	Genencor	<i>B. amyloliquefaciens</i>
Savinase®	Novozymes	<i>B. clausii</i>
Purafect™	Genencor	<i>B. lentus</i>
KAP	Kao	<i>B. alkalophilus</i>
Everlase™	Novozymes	<i>B. clausii</i>
Purafect OxP™	Genencor	<i>B. lentus</i>
FN4	Genencor	<i>B. lentus</i>
BLAP S	Henkel	<i>B. lentus</i>
BLAP X	Henkel	<i>B. lentus</i>
Esperase®	Novozymes	<i>B. halodurans</i>
Kannase™	Novozymes	<i>B. clausii</i>
Properase™	Genencor	<i>B. alkalophilus</i> PB92

**Çizelge 1.1.** Dünya çapında üretilen enzim tabanlı deterjanlar ve enzim kaynağı olan bakteri türleri (Maurer 2004).



### 1.7.2. Deri sanayisinde proteazlar

Bakteriyel proteazlar, derinin kollajen olmayan yapılarının seçimli hidrolizinde, globulinler ve albuminler gibi fibril yapıda olmayan proteinlerin uzaklaştırılmasında, deriden kılların ayrılmasında ve derinin yumuşatılmasında kullanılmaktadır. Günümüzde deri prosesi; ıslatma, sepileme, kireçlik, kireç giderme, sama ve kıl giderme gibi bazı adımlar içerir. Ancak bu işlemler boyunca yüksek oranda kimyasal madde ve atık su ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda, ham derilerdeki doğal yağın giderilmesinde enzimlerden yararlanılarak işlem etkinliğinin artırılması ve yağ gidermede kullanılan kimyasal maddelerin azaltılarak deri sanayinin çevreyi daha az kirletmesi amaçlanmıştır (Öztürk 2004). Yapılan çalışmalara göre, zararlı kimyasallara alternatif olarak enzimlerin kullanımı, çevresel kirliliği azaltmada, deri kalitesini arttırmada başarılı olmuş ve deri sanayisindeki uygulamalar için daha ekonomik bir kullanım sağlamıştır (Afşar 2008).

Proteazlar, hayvan postlarını deriye dönüştürmede ıslatma, kireçleme, kıldan arındırma, yünden arındırma ve ayırma aşamalarında sıklıkla kullanılmakta ve yapılan araştırmalara göre kimyasal maddelere göre daha yüksek aktivite göstermektedirler. Geleneksel sama işlemi, deri üretim proseslerinden kireç giderme işlemi sonrasında alkali proteazların kullanımı ile gerçekleştirilmektedir. Ham deri yapısında bulunan globüler proteinler parçalanmakta ve strüktür açılımı sağlanmaktadır (Mukhtar ve Haq 2008).

Günümüzde tıp, farmakoloji ve gıda sanayinde büyük ölçüde kullanım alanı bulan enzimler, aslında deri sanayinde dericilik sanatının başladığı günden bu yana kullanılagelmiştir. Ancak, enzimlerden hazır ticari preparat olarak yararlanılmaya 1909 yılında Otto Röhm'ün pankreas enzimini izole etmesi ve bu preparatı sama maddesi olarak kullanıma sunması ile başlanmıştır (Uhlig 1998). Sonraki dönemlerde bitkisel, hayvansal, bakteri ve fungus kültürlerinden izole edilebilen çeşitli tür ve nitelikteki enzimlerden deri sanayinde; yumuşatma, kireçlik, kıl ve yağ giderme, pikle ve kromlu deri strüktürünün açılması, etleme ve kromlu deri atıklarının saflaştırılması ve atık suların temizlenmesine kadar çok sayıda proste kullanım alanı bulmuş, kullanımları giderek yaygınlaşmıştır (Uhlig 1998, Aehle 2004). Özellikle Bacillus sp. tarafından üretilen proteaz enzimi ticari olarak önem kazanmıştır (Çizelge 1.2).

Enzim uygulanması, derilerin dikiş ve günlük kullanımdan kaynaklanan darbelere dayanıklılığını etkilediğinden kullanım miktarı ve süresine oldukça dikkat edilmelidir.

Türler	Optimum pH	
<i>Bacillus</i> sp. (AH-101)	12.0-13.0	Deri endüstrisinde
<i>Bacillus subtilis</i>	8.5	Deri sanayisinde ıslatma aşamasında

**Çizelge 1.2.** Deri sanayisinde kullanılan bazı *Bacillus* türleri (Mukhtar ve Haq 2008).

### 1.7.3. Gıda sanayisinde proteazlar

Gıda endüstrisinde proteazların kullanımı oldukça eski zamanlara dayanmaktadır. Günümüzde proteazlar rutin olarak peynir yapımı, fırıncılık, soya hidrolizatlarının hazırlanması ve et yumuşatma gibi çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Enzimler tarafından üretilen protein hidrolizatları genellikle acı bir tada sahiptir. Aminoasit türüne ve peptidin uzunluğuna göre bu hidrolizatların acılığı az veya çok olabilir. Acı peptidler, hidrofobik aminoasit içeriğinin yüksek olmasıyla, tatlı peptidler ise hidrofilik aminoasit içeriğinin yüksek olmasıyla karakterize edilirler. Kazein ve hemoglobinden üretilen hidrolizatlar; et, balık ve jelatinden elde edilen hidrolizatlardan daha acı olmaktadır (Aehle 2004).

Gıda endüstrisinde en fazla kullanılan proteaz enzimi ise papaindir. En önemli iki uygulama alanı, biranın soğukta saklanması ve yapay olarak etin gevrekleştirilmesidir. Etin gevrekleştirilmesinde karşılaşılan başlıca problem, enzimin ette dağılımının, et parçalanmaksızın sağlanmasındaki güçlüdür. Enzim bir veya birden fazla kas doku bileşenini parçaladığı için, enzimin düşük konsantrasyonlarda kullanılmasına özellikle dikkat edilmesi gerekmektedir (Fadıloğlu ve Erkmen 2004).

Buğday unu fırıncılıkta en önemli bileşendir. Fırın hamurlarının özelliklerini belirleyen gluten maddesi, suda çözünmeyen bir proteindir. *Aspergillus oryzae*'den elde edilen endo ve eksoproteinazlar sınırlı bir proteoliz ile buğday glutenini modifiye etmek için kullanılmaktadır. Fungal proteazlar, beyaz ekmek ve poğaçaların yapımında da başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Fungal proteazların aşırı miktarları, ekmeği hamurumsu bir hale getirmektedir. Enzim ilavesi özellikle sert ve elastiki hamurlar için uygundur. Hamura yapılan enzimatik muamele, hamurun elle veya makine ile üretimini kolaylaştırır, böylece ürünlerin daha geniş bir aralıkta üretilmesini sağlar. Proteazların ilavesi ile artan somun hacimlerinde karışma zamanını yaklaşık %25 oranında azaltmaktadır. Özellikle *Bacillus subtilis* proteazları kek, bisküvi ve kraker yapımında kullanılmaktadır. Bu proteazlar hamurların yumuşamasını geciktirmek için kullanılır ve özellikle kraker üretiminde çok önemlidir (Fadiloğlu ve Erkmen 2004, Çelik 2006). Bu alanda asidik mantar proteazlar amilazlarla birlikte kullanılarak ürünün tadına ve aromasına da etki etmektedir (Uhlig 1998, Krajewska 2003).

Aspartik proteaz grubuna dahil olan, sığır kimosin (rennin) uzun zamandır peynir yapımı sırasında sütün kesilmesi veya pıhtılaşması için kullanılmaktadır. Kaynağı nedeniyle sığır kimosin pahalı bir malzeme olduğundan alternatif olarak domuzdan elde edilen pepsin de kullanılmaktadır, ancak pepsinin yüksek proteolitik aktivitesi peynir özü için istenmeyen bir durumdur. Bu yüzden, süt kesme enziminin çeşitli mikrobik kaynakları araştırılmıştır. Sığır kimosin'in içerdiği aktiviteye yakın olan peynir mayalarının mikrobik kaynakları, *Rhizomucor miehei*, *Mucor pusillus* ve *Endothia parasitica*'dır. İlk iki organizma, termofilik mantar, üçüncüsü ise bir mayadır. Mikrobik kaynaklar ile sığır kimosin arasındaki farklılıkları en aza indirmeye çalışmalarına rağmen, farklar sığır kimosinin peynir yapımı için tercih edilmesine sebep olmaktadır (Orhan 2003).

Yüksek içerikte iyi kaliteli protein içerdiklerinden dolayı soya fasulyeleri zengin bir besin kaynağı olarak yüzyıllardır kullanılmaktadır. Proteazlar birçok soya ürünü ve soya sosu hazırlamak için kullanılmaktadır. Fungal alkalen ve nötral proteazlar soya sosu prosesinde önemli bir rol oynamaktadır. Soya proteinlerinin proteolitik modifikasyonu onların fonksiyonel özelliklerini düzeltmeye yarar. pH 8.0'de alkalaz ile soya proteinleri muamelesi yüksek çözünürlük, iyi protein ürünü ve düşük acılıkta çözünür hidrolizatlar ile sonuçlanmaktadır (Çelik 2006).

Proteolitik enzimler yağ elde edilmesinde de uygulama alanına sahiptirler. Örneğin Nijerya kavun çekirdeğinden yağ eldesinde proteolitik enzimler kullanılmaktadır. Kavun çekirdeği %30 yağ, %50 protein içermekte ancak yağın tamamı bilinen çözünenlerle ekstrakte edilememektedir. Çekirdeklere proteolitik enzimlerin uygulanması ile ekstrakte olabilen yağ miktarını artmaktadır. Ayrıca proteazlar meyve sularını, alkolsüz içkileri kuvvetlendirmede ve proteince zengin diyet amaçlı yiyeceklerin üretiminde kullanılmaktadırlar (Çelik 2006).

#### **1.7.4. Kozmetik ve ilaç sanayisinde proteazlar**

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

Proteazların geniş spesifitesi ve çeşitliliği tedavi edici ajanların gelişiminde büyük bir avantaj olarak kullanılır. Subtilisin ya da kollejenaz yanık ve yara tedavisinde, antibiyotiklerin geniş bir aralıkta kullanımıyla kombine edilerek kullanılmaktadır. *E. coli*'den izole edilen asparajinaz lenfositik lösemilerin çeşitli formlarında kan akışından asparajini elimine etmek için kullanılmaktadır (Rao ve ark. 1998, Kurdy ve Simonenko 1994, Gupta ve ark. 2002). Şeker hastalarında yaraların geç iyileşmesine karşı proteaz absorban örtü tedavisinde metalloproteaz inhibitörleri kullanılarak, yaraların kronik halden akut hale geçmesi sağlanmıştır (Lobmann ve ark. 2005). Yine proteaz inhibitörü ilaçlar kullanılarak başta HIV olmak üzere, virüs kaynaklı hastalıkların tedavisi yapılmaktadır (www.hatam.hacettepe.edu.tr, 2009).

#### **1.7.5. Tekstil sanayisinde proteazlar**

Tekstil sanayisinde proteazlar, protein esaslı ürünlerin enzimatik ön terbiyesinde kullanılmaktadır. Kumaş üretimi için gerekli olan maddeler farklı farklı lif yapısındadır. Yün, ipek, angora, kaşmir doğal protein lifleri iken, soya fasulyesi ve mısır lifleri, kazein rejenere protein liflerindedir (Duran ve ark. 2007). Protein esaslı liflerin özelliklerini aminoasitlerin cinsi, miktarı ve yerleşme

şekli belirlemektedir. Bu özelliklere göre yün esaslı mamüllere papain, pronaz ve pepsin ile müdahale edilerek liflerin esnekliği sağlanmış, doğal kirlerden arındırılmış ve daha beyaz bir renk elde edilmiştir. Bu işlemler proteolitik enzimlerle, kimyasal maddelere göre hem zamandan tasarruf ettirmiş hem de çok daha iyi sonuçlar vermiştir (Karmakar 1999).

Yün gibi ipeğin de tekstilde kullanılabilmesi için proteazlarla müdahale edilmesi gerekmektedir. Ham ipek ince, kesiksiz protein esaslı bir liftir. Ancak ham ipekte fibroin ve serisin adı verilen protein yapısında maddeler bulunmaktadır. Serisin maddesi ipeğin kaygan ve parlak bir görünümde olmasını engellediğinden istenmeyen bir maddedir ve proteolitik enzimlerle giderilmesi gerekmektedir. Bu amaçla en çok pepsin, tripsin ve papain enzimleri kullanılmaktadır (Duran ve ark. 2007).

#### **1.7.6. Gümüş eldesinde proteazlar**

Alkalin proteazlar, kullanılmış X-ışını filmleri ya da fotoğraf filmlerinden gümüş eldesi amacıyla gerçekleştirilen proseslerde geniş kullanım alanına sahiptir. Kullanılmış filmler jelatin tabakalarında ortalama olarak %1.5-2 gümüş içermektedir. Gümüşün geri kazanılabilmesi için ise, jelatin tabakasının filmden ayrılması gerekmektedir. Geleneksel uygulamalarda, filmin yakılarak gümüşün geri kazanılması çevre kirliliğine yol açtığından, jelatin tabakanın enzimatik hidrolizi tercih edilmekte ve bu yolla gümüşün yanında polyester filmin de geri kazanımı sağlanmaktadır. Bu işlemde bakteriyel proteazların yanında pankreatik proteazlar kullanılabilir (Horikoshi 1999).

#### **1.7.7. Atık işleme prosesinde proteazlar**

Proteazlar, gıda endüstrisinden gelen ve evlerden çıkan atıkların işlenmesinde uygulama alanına sahiptir. Ayrıca, proteazların doğada atık olarak bol miktarda bulunan boynuz, kıl, tırnak ve saç gibi lifli proteinleri de yararlı biyokütle haline dönüştürebilmektedirler. Bu konuda yapılan çalışmalarda, 1989 yılında Venugopal ve çalışma arkadaşları *B. megaterium* hücrelerini kalsiyum aljinat üzerine immobilize etmiş ve immobilize hücrelerle hücre dışı proteazları sararak balık etinin çözündürülmesini sağlamıştır (Venugopal ve ark. 1989). 1992 yılında Dalev ve Simeonova deri endüstrisindeki temel atıkları işlemek

üzere *B. subtilis*'ten ürettikleri alkalen proteazla, atıklardan hayvansal tutkal gibi yararlı ürünler üretmişlerdir (Dalev ve Simenova 1992). Ayrıca, Dalev 1994 yılında *B. subtilis*'ten üretilen alkalen proteazların, kümes hayvanlarının kesim yerlerindeki kuş tüyü atıklarının işlenmesindeki kullanımını açıklamıştır (Dalev 1994). Kümes hayvanlarının ağırlığının %5'ini oluşturan tüyler ve sert keratin yapının tamamen parçalanması sonucu oluşan ürün önemli bir protein kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Bu ürün yüksek protein içeriği nedeniyle yem olarak kullanılmaktadır (Anwar ve Saleemuddin 1997, Öztürk 2004).

## 2. MATERYAL ve YÖNTEM

### 2. 1. Materyal

Çalışmada kullanılacak *Bacillus* suşları Türkiye'nin 21 farklı ilinden alınan toprak örneklerinden izole edilmiştir. İzolasyon sonucu en yüksek proteaz aktivitesine sahip *Bacillus* sp.'ler, farklı içerikli ortamlarda üretilmişler ve bunlardan en iyi enzim üretenin saptandığı üreme ortamı ve *Bacillus* sp. tespit edilerek, çalışmaya bu bakteri ile devam edilmiştir.



**Şekil 2.1.** Kullanılan toprak örneklerinin alındığı iller: Adana, Alanya, Amasya, Balıkesir, Bilecik, Burdur, Bursa, Edirne, İstanbul, İzmir, Kayseri, Kırklareli, Konya, Kütahya, Manisa, Mersin, Muğla, Niğde, Trabzon, Tokat ve Tunceli.

## **2.2. Metod**

### **2.2.1. Bakteri izolasyonunda kullanılan kültür ortamları**

İzolasyonda kazein ve yağsız süt tozu (skimmed milk) içeren iki farklı ortam kullanılarak, proteaz aktivitesinin zon oluşumu ile gözlenmesi sağlanmıştır.

Süt tozu içeren ortamın hazırlanmasında, yağsız süt tozu ve diğer tüm maddeler ayrı ayrı iki erlende karıştırılmış ve bu şekilde otoklavlanmıştır. Kazeinli ortamın hazırlanması için ise, kazein suda çözünmediğinden, 0.1 M NaOH içerisinde kaynatılarak çözdürülmüştür. Karışım uygun sıcaklığa getirildikten sonra, 1/3 oranında seyreltilmiş fosforik asit ile karışımın pH'ı 7.0'ye ayarlanmıştır. Daha sonra çözülmüş kazein ve Çizelge 2.1' de belirtilen diğer maddeler karıştırılarak 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlanmıştır. Otoklav işlemi bittikten sonra 50-55°C'ye kadar soğutulan besiyerleri, 180°C'de 1 saat pastör fırınında steril edilen petri kaplarına 15'er mL dökülerek soğumaya bırakılmıştır.

### **2.2.2. Proteaz pozitif bakterilerin izolasyonu**

Çalışmalarda kullanılacak olan proteaz pozitif bakterilerin izolasyonu için, toprakların ince kısımlarından 0.25 g tartılmış ve 10 mL steril fizyolojik tuzlu su içerisinde iyice vorteksenerek karıştırılmıştır. Örnekler, 60°C'de 30 dakika tutularak vejetatif formların ölmesi, ortamda yalnızca sporlu bakterilerin kalması sağlanmış ve tüplerin ağızları kapatılarak soğumaya bırakılmıştır (Lennette ve ark. 1985).

Bakterilerin proteaz üretme kapasitelerinin katı besiyerinde belirlenmesi amacıyla iki farklı besiyeri kullanılmıştır (Çizelge 2.1). Hazırlanan toprak örneklerinden  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  ve  $10^{-9}$  olmak üzere seri dilüsyonlar yapılmış ve petrilere 0.1 mL örnek pipetlenerek yayma yöntemine göre ekim yapılmıştır (Temiz 1994). Ekimi tamamlanan petrilere 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmış, kolonilerin etrafında zon oluşumu izlenmiştir ve bu süre sonunda etrafında açık renkli zon olan koloniler proteaz pozitif olarak belirlenmiş ve açık renkli zonların büyüklükleri cetvel ile ölçülmüştür. Çalışmada 54 adet saf kültür



elde edilmiş olup, bakteriler nütrient brothlu agarlı ortamda kültüre edilerek, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

İçerik	Kazeinli Besiyeri (%) (Sangeethaa ve Phil 2008)	Yağsız Süt Tozlu Besiyeri (%) (Qadar ve ark. 2009)
Pepton	0.5	0.1
Yeast ekstrakt	0.3	-
NaCl	0.5	0.5
Agar	2	2
Kazein	0.5	-
Skimmed Milk	-	1
pH	7.0	7.0

**Çizelge 2.1.** Proteaz pozitif bakterilerin seçiminde kullanılan katı besiyerleri (Sangeetha ve Phil 2008, Qadar ve ark. 2009)

### 2.2.3. *Bacillus*'un taksonomik sınıflandırılması için morfolojik ve fizyolojik özelliklerin belirlenmesi

Elde edilen bakterilerden, en büyük zon çapına sahip bakterilerin saf kültürlerinin morfolojik ve fizyolojik özellikleri incelenerek, *Bergey's Manual of Systematic Microbiology*'den alınan tayin anahtarında göre *Bacillus*'lar belirlenmiştir (Buchanan and Gibbons 1974).

İçerik	Hareketlilik Testi (% g)	Nişastanın Hidrolizi Testi (% g)	Katalaz Testi (% g)	Spor Boyama (% g)	Gram Boyama (%g)
Nişasta	-	0.5	-	-	-
Nutrient Broth	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Agar	1	2	2	1	1
pH	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0

**Çizelge 2.2.** Biyokimyasal testlerde kullanılan besiyerleri (Çotuk 2003).

*Bacillus* cinsini tanımak için 3 adet biyokimyasal test ve 2 adet morfolojik test olmak üzere, toplam 5 adet test yapılmıştır (Çizelge 2.2).

#### **2.2.3.1. Hareketlilik testi**

Hareketlilik testi için agar ve nütrient broth kullanılarak ortam hazırlanmıştır (Çizelge 2.2). Steril petriler, alt taraflarından kalemle çizilerek ikiye bölünmüş ve bakteri ekilecek kısım işaretlenmiştir. Belirlenen bölgeye 0.1 mL pipetlenen üremiş sıvı kültür, çizgiyi geçmeyecek şekilde, drigalski özesi ile iyice yayıldıktan sonra 37°C'de 18 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Temiz 1994).

#### **2.2.3.2. Katalaz testi**

Katalaz testinde katı ve sıvı ortamlar kullanılarak, farklı yöntemlerle test yapılabilmektedir. Çalışmada ise, %0.8 nütrient broth içeren agarlı ortama ekilmiş bakteriler, 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda oluşan koloniler üzerine 1-2 damla %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılmış ve gaz çıkışı olup olmamasına göre değerlendirme yapılmıştır.

#### **2.2.3.3. Nişastanın hidrolizi testi**

Çizelge 2.2'de gösterilen ortama, seri dilüsyon yapılan bakteriler tek koloni oluşturacak şekilde ekilip, 37°C'de, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, besiyerine %0.5 I (iyot) ve % 5 KI (potasyum iyodür) ile hazırlanmış iyot çözeltisi damlatılarak koloniler etrafında açık renkli bölge oluşumu izlenmiştir (Koneman ve ark. 1992).

#### **2.2.3.4. Gram boyama**

Gram boyama işlemi Temiz (1994)'in belirttiği yönteme göre yapılmıştır. Buna göre; bakterilerin 18 saatlik taze kültürlerinden, steril öze ile alınarak 1 damla steril distile su ile yayma preparat hazırlanmış ve preparatlar havada

kurumaya bırakılmıştır. Kuruma tamamlandıktan sonra lamalar 3 defa alevden geçirilerek tesbit işlemi yapılmıştır. Daha sonra lamaların üzerine, mikrobiyal film tabakasını kaplayacak şekilde, bol miktarda kristal viole damlatılarak 1 dakika beklenmiştir. Kristal viole yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra lamaların üzerine %0.5 I ve % 5 KI ile hazırlanmış gram iyodin (lugol) dökülerek yine 1 dakika beklenmiştir. Boya, suyla uzaklaştırılmış ve lamalar %95'lik etil alkol ile renk kayboluncaya kadar yıkanmıştır. Ardından, film tabakasının üzerine safranin eklenmiş ve 45 saniye beklenmiş ve boya yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar, havada kurutulmuş ve immersiyon yağı ile 10X100'lük objektifte, Olympus CX31 marka ışık mikroskopunda incelenmiştir. İyi boyanmış olan örneklerde Gram (+) olan mikroorganizmalar koyu mor (menekşe) renkli, Gram (-) olanlar ise açık pembe renkli görünüşleri ile ayırt edilmiştir.

#### **2.2.3.5. Spor boyama**

Endospor boyama işlemi Özkaya-Durlu (2000)'nun belirttiği yönteme göre yapılmıştır. Buna göre; taze kültürleri hazırlanan bakteriler, lam üzerine 1 damla steril distile su ile iyice yayılarak havada kurutulmuş ardından 3 kez alevden geçirilerek fiske edilmiştir. Örnekler malaşit yeşili ile alevde 5 dakika etkiye bırakılmış ve buharlaştıkça boya ilave edilmiştir. Distile su ile yıkanan örnekler 30 saniye safranin ile boyanmış ve distile suyla tekrar yıkanıp havada kurutulduktan sonra bakteri sporlarının morfolojileri, Olympus CX31 marka araştırma mikroskobu kullanılarak incelenmiştir.

#### **2.2.4. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri**

Çalışmada kullanılan bakterilerin saklanması, geliştirilmesi ve proteaz üretim kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla farklı besiyerleri kullanılmıştır (Çizelge 2.3). Buna göre, bakterilerin buzdolabı koşullarında uzun süre dayanmalarını sağlamak için, Çizelge 2.3'de verilen *kültür saklama besiyeri* kullanılmış olup, kültürler 30 günde 1 kez yeniden hazırlanan agarlı besiyerine aşılacak sureti ile korunmuşlardır.

<b>İçerik</b>	<b>Kültür saklama besiyeri (% g)</b>	<b>Bakteri geliştirme besiyeri (% g)</b>
Nutrient Broth	0.8	0.8
NaCl	0.8	-
Agar	2.0	-
pH	7.0	7.0

**Çizelge 2.3.** Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri.

### 2.2.5. Enzim üretimi için uygun besiyeri seçimi

Biyokimyasal ve morfolojik testler sonucunda tespit edilen 4 adet *Bacillus* sp.'den, proteaz üretim kapasitesinin belirlenmesi amacıyla, farklı içerikli 2 adet besi ortamı denenmiş ve en yüksek proteaz üretiminin elde edildiği besiyeri tespit edilmiştir. Kullanılan ortamlar Çizelge 2.4'te belirtilmiştir.

<b>İçerik</b> (% g)	<b>Besiyeri 1</b> (Qadar ve ark. 2009)	<b>Besiyeri 2</b> (Sangeetha ve Phil 2008)
<b>Glukoz</b>	0.1	1
<b>Pepton</b>	1	0.5
<b>Maya özütü</b>	0.02	0.3
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	0.01	-
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	-	0.02
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0.01	0.04
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0.05	-
<b>pH</b>	7.0	7.0

**Çizelge 2.4.** Proteaz üretim ortamının tespitinde kullanılan sıvı besiyerleri (Sangeetha ve Phil 2008, Qadar ve ark. 2009).

### **2.2.6. Bakteri üretim koşulları**

Kültür saklama ortamından (Çizelge 2.3) steril öze ile alınan bakteri kültürü, içerisinde 25 mL bakteri geliştirme besiyeri (Çizelge 2.3) bulunan 100 mL'lik erlene aşılansmış, 37°C'de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 18 saat süre ile üretilmiştir.

Bu bakterinin enzim üretim kapasitesini saptamak amacıyla 18 saatlik bakteri kültürlerinin 600 nm'deki optik yoğunlukları (O.D) spektrofotometre (Beckman Coulter-DU 700) kullanılarak, bir standart elde edebilmek amacıyla, steril fizyolojik tuzlu su ile 0.3'e ayarlanmıştır. Bu şekilde ayarlanan kültür çözeltilerinden, içerisinde 150 mL maksimum enzim üretiminin elde edildiği enzim üretim besiyeri (Çizelge 2.4) bulunan 500 mL'lik erlenlere %1 oranında aşılansmış ve 37°C'de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 72 saat süre boyunca inkübe edilmiştir. Üreme ve enzim aktivite tayinleri 16., 24., 40., 48., 64. ve 72. saatlerde yapılarak bakterinin gelişme grafiği çıkarılmış ve maksimum enzim üretim zamanı saptanmıştır.

### **2.2.7. Bakteri üremesinin ölçülmesi**

Bakteri üremesinin belirlenmesi amacıyla, besiyerinin bulanıklığı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. 2.2.6'da belirtilen yöntemle inkübasyona bırakılan besiyerlerinden, belirlenen saatlerde (16., 24., 40., 48., 64. ve 72. saatler) örnek alınarak, 600 nm dalga boyunda okunmuştur. Proteaz üretiminde kullanılan besiyeri kör olarak kullanılmıştır ve optik yoğunluk (OD) değerlerinin okunmasıyla bakteri üreme miktarı belirlenmiştir.

Elde edilen optik yoğunluk (OD) değişimleri, zamana karşı grafiklenerek gelişme eğrileri çıkarılmıştır.

### 2.2.8. Toplam proteaz aktivitesi (TPA) tayini

Toplam proteaz tayini Anson tarafından önerilen yöntemin bir modifikasyonu ile yapılmıştır (Keay ve Wildi 1970). Bu amaçla, bakteri suşları ön inkübasyon ortamında canlandırıldıktan sonra enzim üretim ortamına ekilmişler ve 37°C'de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip olan inkübatörde üremeye bırakılmışlardır. Daha sonra belirlenen saatlerde (16, 24, 40, 48, 64, 72) alınan 10 mL örnek 6000 devir/dakika'da 15 dakika santrifüjlenerek enzim içeren kısım peletten ayrılmıştır. Üretim ortamından alınan örnekler yerine, aynı miktarda taze besiyeri, steril şartlarda üretim ortamına eklenmiştir.

Proteaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, substrat olarak %2'lik kazein çözeltisi kullanılmıştır. Buna göre, 2 gram kazein 20 mL 0.1 M NaOH ile kaynayınca kadar sürekli karıştırılarak ısıtılmış ve tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan kazein çözeltisinin hacmi 0.05 M fosfat tamponu (pH:7.0) ile 100 mL'ye tamamlanmış ve pH'sı 1/3 oranında seyreltilmiş fosforik asit ile 7.0'ye ayarlanmıştır.

Enzim ve substrat çözeltileri karıştırılmadan önce, substrat çözeltisi 10 dakika süreyle 37°C'de tutularak reaksiyon sıcaklığına getirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan çözeltilerden, tüp içerisine 1'er mL aktarılmış ve 37°C'de 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Süre sonunda tepkime, tüp içerisine, 2 mL 0.4 M Triklor asetik asit (TCA) çözeltisi konarak durdurulmuştur. Bu karışım, 37°C'de 20 dakika bekletildikten sonra 6000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant kısmından alınan 1 mL'lik örneğe, 5 mL 0.4 M NaCO<sub>3</sub> ve 1 mL 1/3 oranında seyreltilmiş folin çözeltisi eklenmiş, karışım vortekslendikten sonra 20 dakika boyunca oda sıcaklığında, karanlıkta bekletilmiştir. Bu süre sonunda çözeltinin optik yoğunluğu, enzim aktivitesinin belirlenmesi için 660 nm'de köre karşı okunmuştur.

Proteaz aktivitesi ölçümlerinde, standart eğri 0-60 µg/mL tirozin içeren çözeltiler ile hazırlanmıştır. Yönteme göre 1 µg/mL tirozin, 2 U/mL enzim aktivitesine karşılık gelmektedir (Keay ve Wildi 1970). Enzim aktivitesi standart koşullarda, 1 µg/mL tirozin açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

## **2.3. Bakteri Gelişimi ve Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Faktörler**

### **2.3.1. Karbon (C) kaynaklarının etkisi**

Mikroorganizmaların üremesinde karbon kaynaklarının önemi göz önüne alınarak farklı karbon kaynakları ile çalışılmıştır. Bu amaçla, enzim üretim ortamında bulunan glikoz yerine, aynı oranda fruktoz, maltoz, sakkaroz ve gliserol karbon kaynağı olarak kullanılmıştır.

Besiyerine katılan tüm karbon kaynakları 121°C'de yapılarında bozulma olacağı için, ayrı olarak, 0.45 µm çaplı mikrofiltrelerle (Orange Science) steril edilmiş ve bu şekilde diğer maddelerle karıştırılmıştır. Bakterilerin aşılması 2.2.8'de belirtildiği gibi yapılmış ve inkübasyon boyunca belirli aralıklarla alınan örneklerde üreme ve proteaz aktivite tayinleri yapılmıştır.

### **2.3.2. Azot (N) kaynaklarının etkisi**

Azot kaynaklarının bakterilerin üreme kapasiteleri üzerine olan etkilerinin araştırılması amacıyla çeşitli azot kaynaklarının, enzim üretimine olan etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, Çizelge 2.4'te verilen enzim üretim ortamında azot kaynağı olarak kullanılan pepton ve maya özütü yerine, organik azot kaynağı olarak, aynı oranlarda skimmed milk, tripton, mısır ıslatma suyu (corn steep-liquor), soya unu ve kazein, inorganik azot kaynağı olarak ise KNO<sub>3</sub> ve (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanılmıştır. Ayrıca N kaynağı olarak maya özütünün etkisini görebilmek amacıyla, pepton yerine maksimum proteaz aktivitesi sağlayan azot kaynağı ile maya özütü bulunan optimum ortamda proteaz aktivitesine bakılmıştır.

Besiyerindeki N kaynaklarının toplam miktarı %10.2 g olarak belirlenmiş olup, besiyeri ile birlikte 121°C'de steril edilmiştir. Üretim 2.2.6'da belirtildiği gibi yapılmış ve inkübasyon boyunca belirli aralıklarla alınan örneklerde üreme ve proteaz aktivite tayinleri yapılmıştır.

### 2.3.3. Metal iyonlarının etkisi

Besiyerinde bulunan metal iyonlarının bakteri gelişmesi ve enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla, Çizelge 2.4'te verilen enzim üretim ortamında bulunan kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) ve magnezyum sülfat ( $\text{MgSO}_4$ ) yerine, bunların aynı oranlarında  $\text{LiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ve  $\text{CuSO}_4$  kullanılmıştır.

Denemelerde, önce  $\text{CaCl}_2$  sabit tutularak  $\text{MgSO}_4$  yerine sırasıyla  $\text{Li}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  kombinasyonları kullanılmış, daha sonra  $\text{MgSO}_4$  sabit tutularak  $\text{CaCl}_2$  yerine sırasıyla  $\text{Li}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  kombinasyonları denenmiştir. Ayrıca metal olarak sadece  $\text{CaCl}_2$  ve sadece  $\text{MgSO}_4$  içeren ortamlarda proteaz aktivite tayini yapılarak, en çok hangi metal iyonunun enzim üretimini etkilediği belirlenmiştir.

Metal iyonları, besiyerine katılmadan önce ayrı ayrı bir miktar distile su içerisinde çözdürülmüş ve bu şekilde ortama katılmış, daha sonra  $121^\circ\text{C}$ ' de steril edilmiştir. Üretim 2.2.8' de belirtildiği gibi yapılmış ve inkübasyon boyunca belirli aralıklarla alınan örneklerde üreme ve proteaz aktivite tayinleri yapılmıştır.

### 2.3.4. Maksimum proteaz üretimi için modifiye ortamın hazırlanması

Enzim üretim ortamı olarak belirlenen besiyerinde (Çizelge 2.4) bulunan karbon kaynakları, azot kaynakları ve metal iyonları değiştirilerek daha yüksek miktarda proteaz üretimi sağlanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla çeşitli karbon, azot ve metal iyonlarından en yüksek proteaz aktivitesini sağlayan maddeler belirlenmiş ve enzim üretim ortamı (Çizelge 2.4) baz alınarak yeni bir modifiye besiyeri oluşturulmuştur.

## 2.4. Enzim Karakterizasyonu

Proteaz enziminin karakteristik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla saf enzimde sıcaklık, termostabilite, pH, pH stabilitesi, enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi gibi çeşitli parametrelerin ölçümleri yapılmış ve enzimin özellikleri hakkında bilgi edinilmiştir.



#### **2.4.1. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi**

Proteaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin araştırılması amacıyla 37, 40, 50, 55, 60, 65, 70 ve 80°C'lerde aktivite tayini yapılmış ve maksimum aktivitenin elde edildiği sıcaklık dereceleri belirlenmiştir. 37°C'de ölçülen enzim aktivitesi %100 olarak kabul edilerek, elde edilen diğer enzim aktivite değerleri, bağlı aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

#### **2.4.2. Termostabilitenin belirlenmesi**

Enzimde termostabilitenin belirlenmesi amacıyla, 1 mL enzim örneği alınmış ve maksimum proteaz aktivitesi görülen sıcaklık derecesinde 30 dakika, 1 ve 2 saat süreyle tutularak aktivite tayinleri yapılmıştır. Aktivite değerleri, 10 dakika inkübasyon sonucu elde edilen değer 100 kabul edilip, buna göre (%) olarak hesaplanmıştır.

#### **2.4.3. pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi**

Farklı pH değerlerinin enzim aktivitesine olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla pH 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 ve 9.0 değerlerine sahip fosfat tamponları ile hazırlanmış substratlarla, proteaz enzimi tepkimeye sokulmuştur. Her bir deneme sonunda maksimum aktivite görülen pH değeri saptanmıştır. pH 7.0'de elde edilen enzim aktivite değeri %100 olarak kabul edilmiş ve diğer sonuçların bağlı aktiviteleri buna göre düzenlenmiştir.

#### **2.4.4. pH stabilitesinin belirlenmesi**

pH stabilitesinin belirlenmesi amacıyla, enzim örneği maksimum aktivite elde edilen pH değerinde, 30 dakika, 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle tutulmuş ve enzim aktivitesine bakılmıştır. Burada, maksimum pH'da 10 dakikalık inkübasyon sonucu elde edilen aktivite değeri 100 olarak kabul edilmiş ve ölçülen diğer sonuçlar buna göre (%) olarak grafiklendirilmiştir.

#### **2.4.5. Metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi**

Çalışmada kullanılan proteaz enzimine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi amacıyla  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{LiSO}_4$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  ve  $\text{ZnSO}_4$  metalleri kullanılmıştır. Metaller, enzim aktivitesi ölçümünde substrat olarak kullanılan kazein çözeltisi hazırlandıktan sonra içerisine 5 mM konsantrasyonda olacak şekilde katılmıştır. Elde edilen sonuçlar, içerisinde hiçbir metal iyonu bulunmayan kontrol çözeltisi ile elde edilen aktivite %100 olarak kabul edilip, buna göre % olarak hesaplanmıştır.

#### **2.5. Enzimin Kısmi Saflaştırılması**

Kısmi saflaştırma ve karakterizasyon için 54 adet bakteriden en yüksek proteaz aktivitesine sahip olan *Bacillus* sp.'den elde edilen proteaz enzim çözeltisi kullanılmıştır. Saflaştırma amacıyla bakteri, modifiye besiyerinde 64 saat süre ile inkübasyona bırakılmış, ardından birbirini takip eden 2 basamakta kısmi olarak saflaştırılmıştır. Kaba enzim ve her bir basamaktaki enzim örneklerinde enzim aktivite ve protein tayinleri yapılmıştır. Protein, standart olarak 'Sığır Serum Albumin' i kullanılarak Lowry ve ark. (1951) metoduna göre belirlenmiştir.

##### **2.5.1. Amonyum sülfat çöktürmesi**

500 mL'lik erlen içerisine 150 mL modifiye ortam eklenmiş ve 64 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda besiyeri, 6000 devir/dakika'da  $+4^\circ\text{C}$ 'de santrifüjlenmiş ve elde edilen enzim çözeltisi steril bir kaptan toplanmıştır. Enzim çözeltisinin üzerine, son konsantrasyon %75 olacak şekilde, toz haline getirilmiş amonyum sülfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) çok yavaş bir şekilde eklenerek manyetik karıştırıcı üzerinde çözündürülmüştür. Bu şekilde hazırlanan karışım  $+4^\circ\text{C}$ 'de, manyetik karıştırıcıda karıştırılarak 1 gece bekletilmiş ve daha sonra karışım 12500 devir/dakika'da  $+4^\circ\text{C}$ 'de 20 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Üstte kalan sıvı kısım ayrılmış ve pelet 50 mL 0.01 M fosfat tamponu (pH:7.0) ile süspanse edilmiştir.

### 2.5.2. Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen süspansiyon 12000 ve üstündeki molekül ağırlıklı maddeleri tutan diyaliz tüpüne konmuş ve tüp sıkıca kapatılarak içerisinde 500 mL, 0.01 M fosfat tamponu olan mezüre konmuştur. Mezürün içine bir balık atılarak karışımın sürekli hareketi sağlanmış ve bu şekilde +4°C'de, tampon 2 defa değiştirilerek bekletilmiştir. Tamponun son kez değiştirilmesine karar verebilmek için, diyalizde olan tampondan bir miktar alınıp üzerine 0.1 N HCl ve doygun BaCl<sub>2</sub> çözeltisinden 1-2 damla damlatılmış ve bulanıklık görülmemesi sonucu diyaliz bitirilmiştir (Trautwein ve Kuhlmann 1982). Elde edilen diyalizatta, protein ve enzim aktivite tayinleri yapılmıştır.

### 2.5.3. Protein miktarının belirlenmesi

Protein miktarının belirlenmesi için de Lowry Metodu kullanılmıştır (Lowry 1951).

Protein standart grafiğinin oluşturulması için, 0.15 g BSA 10 mL distile suda çözülmüştür. Hazırlanan örnekten 1 mL alınıp, hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Konsantrasyonu 0-150 µg/mL olacak şekilde uygun sulandırma yapılarak hazırlanan örneklerin absorbanları 546 nm'de ölçülmüş (Beckman Coulter-UD 700) ve standart eğri grafiği hazırlanmıştır.

Ayıraç A: % 3'lük Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.1 N NaOH' da çözülmüş)

Ayıraç B: % 1'lik CuSO<sub>4</sub> (% 1' lik K-Na -tartarat' da çözülmüş)

Ayıraç C: % 2'lik K-Na-tartarat

Ayıraç D: İhtiyaca göre günlük A, B ve C ayıraçlarından hazırlanır (25:1:1 oranında).

Ayıraç E: 1:1 oranında seyreltilmiş Folin ciocalteus fenol ayıracı

1 mL örnek alınmış, üzerine D ayracından 5 mL eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra 10 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Kör için ise 1 mL distile su ve D ayıracı alınarak aynı işlemler uygulanmıştır. Daha sonra 0.5 mL E çözeltisi eklenerek vortekslendikten sonra karanlıkta 20 dakika beklenmiş ve köre karşı, 546 nm'de okunarak sonuçlar elde edilmiştir.

## 2.6. Enzimin Moleküler Ağırlığının Tespiti

Enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi için Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır (Laemmli 1970).

### 2.6.1. Çözeltilerin ve jelin hazırlanması

**a)** Polimer matriksi kurmak için akrilamid ve N, N'-metilen-bisakrilamid kullanılmıştır. Bunun için; 28.8 g akrilamid ve 1.2 g bis akrilamid tartılıp distile su ile toplam 100 mL içerisinde çözdürülmüş ve Whatman No:1 filtre kağıdından süzülerek, kahverengi bir şişede 0-5°C'de muhafaza edilmiştir. Bu çözelti 2 ay süreyle bozulmadan saklanabilmektedir (Sarıkaya 1995). Akrilamid çok güçlü bir nörotoksik madde olduğundan çalışılırken eldiven ve maske kullanılmalıdır.

**b)** Tris-HCl (1.5 M, pH: 8.6)

Çözeltiyi hazırlamak için 3.025 g Trizma Base ve 0.2 g SDS tartılmış ve bir miktar suda çözüldükten sonra çözeltinin pH'sı konsantre HCl ile 6.8' e getirilerek hacim 100 mL' ye tamamlanmıştır.

**c)** %10'luk Amonyum Per Sülfat (APS)

10 g APS tartılmış ve hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

**d)** Yürütme Tamponu (Running Buffer)

Trizma Base	1.21 g
Glisin	5.76
SDS	1.0
Distile Su	1000 mL

**f)** Örnek Tamponu

0.5 M Tris-HCl pH: 6.8	2.56 mL
Gliserol	4.0 mL
SDS	1.0 g
Distile Su	1.5 mL
2-Merkaptoetanol	2.0 mL
Bromfenol mavisi	Spatül ucu

Bu çözelti 4 defa konsantre bir çözelti olduğundan kullanım sırasında seyreltilmelidir.

**g) Boyama Çözeltisi**

1.5 g Coomassie-brilliant R-250 mavisini 250 mL isopropil alkolde çözülmüş, daha sonra üzerine 100 mL asetik asit ve 650 mL distile su eklenmiştir.

**h) Yıkama Çözeltisi**

İsopropil alkol	250 mL
Asetik asit	100 mL
Distile su	650 mL

**Jelin Hazırlanması:**

SDS-PAGE için 2 tip jel hazırlanır.

**1) %10'luk Ayırma Jeli**

%30 Akrilamid-bisakrilamid	5.78 mL
Distile Su	7.13 mL
1.5 M Tris-HCl pH:8.6	4.33
%10 APS	86.7 µL
TEMED	8.16 µL

**2) %4'lük Sıkıştırma Jeli**

%30 Akrilamid-bisakrilamid	0.546 mL
Distile Su	1.953 mL
0.5 M Tris-HCl pH:6.8	0.833 mL
%10 APS	20 µL
TEMED	3.33 µL

Jellerin hazırlanmasında dikkat edilmesi gereken en önemli nokta TEMED' in eklenmesidir. TEMED polimerleştirici ajan olduğundan, eklendikten sonra pipet ile iyice karıştırılmalı ve vakit kaybetmeden çözelti cam plakalar arasına dökülmelidir.

Örnekler hazırlandıktan sonra, cam plakalar elektroforez (Bio-Rad) mandalına yerleştirilmiş ve sızma olmayacak şekilde iyice sabitlenmiştir. Ayırma jeli, mikropipet yardımıyla cam plakaların arasına yavaşça dökülmüş ve üzerine isopropil alkol dökülerek, üst yüzeyin düzgün bir şekilde donması beklenmiştir.

Donma tamamlandıktan sonra alkol distile su ile iyice yıkanmış ardından kurutma kağıdı ile kalan su plakaların arasından alınmıştır. Daha sonra sıkıştırma jeli de aynı yöntemle plakaların arasından dökülmüş, donması beklenmeden elektroforez tarağı yerleştirilmiştir. Donma tamamlandıktan sonra tarak çıkarılmış ve kuyucukların düzgün bir şekilde oluşması sağlanmıştır.

### **2.6.2. Örneklerin hazırlanması ve elektroforez koşulları**

Proteaz enziminin moleküler ağırlığının belirlenmesi amacıyla 10 farklı protein içeren (SigmaMarker S8445) çözelti standart olarak kullanılmıştır. Kaba enzim, amonyum sülfat çöktürmesinde elde edilen supernatant ve pelet ile diyaliz sonrası örneklerinden 75 µL, ependorf tüplerine konularak üzerlerine 25 µL örnek tamponu (bkz. 2.6.1. f) eklenerek hacim 100 µL'ye tamamlanmıştır. Tüm tüpler 5 dakika süreyle kaynar suda bekletilmiştir. Protein çözeltisi (markır) için ise; liyofilize halde protein (markır) içeren tüpe 1 mL örnek tampon ilave edilerek hazırlanmış olup, aynı işlemler uygulanmıştır.

Daha önce hazırlanmış olan jel, elektroforez tankına oturtularak alt ve üst hazneleri yürütme tamponu (bkz. 2.6.1. e) ile doldurulmuştur. Tankın her iki tarafına da konulmuş olan jellerdeki kuyucukların içerilerine, mikropipet yardımıyla 20 µL örnek konmuş ve tanka akım verilerek elektroforez işlemi başlatılmıştır. İzleme boyası jelin 1 cm altında kalacak hale geldiğinde ise elektroforez işlemi bitirilmiştir. Jele, örneklerin düzgün bir sırada ilerlemesi için önce 20 mA, örnekler ayırma jeline geçtikten sonra ise 30 mA sabit akım verilmiştir. Elektroforez işlemi yaklaşık 2,5 saat sürmüştür.

### **2.6.3. Boyama ve boyanın uzaklaştırılması**

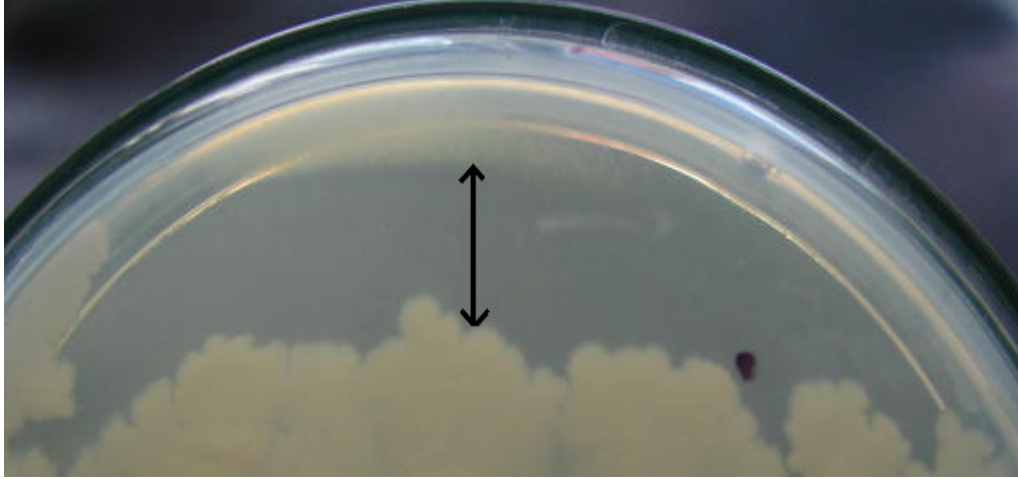
Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra üst plaka jeli yırtmayacak şekilde çıkarılmıştır. Sıkıştırma jeli bir spatül yardımıyla, ayırma jelinden ayrılmış, markır yüklenen kuyucuğun kenarı bir çentik atılarak jel işaretlenmiştir. Dikkatli bir şekilde, yırtmadan çıkarılan jel, içerisinde boyama çözeltisi (2.6.1. g) bulunan plastik kaba konarak 1 gece boyunca bekletilmiştir.

Boyanan jel, içinde yıkama çözeltisi (2.6.1. h) bulunan başka bir kaba alınarak boya uzaklaştırılmıştır. Örneklerin molekül ağırlıkları, standart proteinler baz alınarak belirlenmiştir.

### 3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

#### 3.1. Proteaz Pozitif Bakterilerin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan 21 farklı toprak örneğinden, proteaz pozitif 54 adet bakteri izole edilmiş olup, proteaz pozitif bakterilerin izole edilmesi için kullanılan iki besiyerinden (Çizelge 2.1), yağsız süt tozu içeren ortamın çok daha net bir zon oluşumu sağladığı görülmüştür. Proteaz pozitif özellik gösteren izolatin besiyerindeki görüntüsü Şekil 3.1’de verilmiştir.



**Şekil 3.1.** Proteaz pozitif izolatin besiyerindeki görüntüsü.

İzole edilen bakterilerin proteaz üretim kapasitelerini belirlemek amacıyla, agar üzerinde oluşturdukları açık renkli zonlar cetvel ile ölçülmüştür (Çizelge 3.1). Zon çaplarının ölçülmesi sonucu, en yüksek aktiviteye sahip N-3, N-10, N-18, N-35, N-36 ve N-40 numaralı 6 adet bakteri belirlenmiş ve bu bakteriler arasından *Bacillus* cinsinin belirlenmesi için biyokimyasal ve morfolojik testler yapılmıştır.

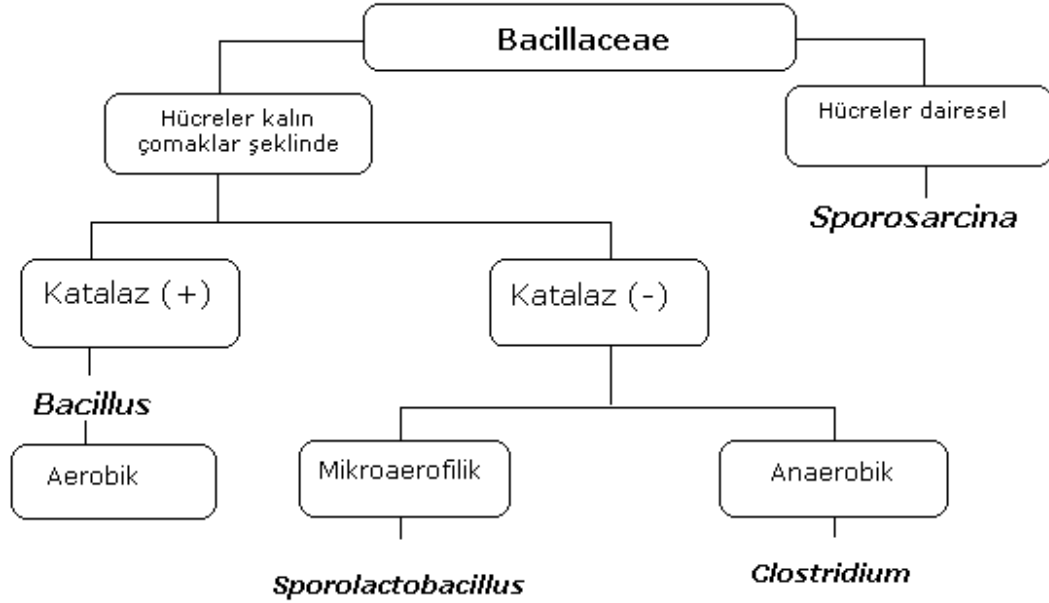
Bakteri No	Zon Çapı (cm)	Bakteri No	Zon Çapı (cm)
<b>1 (Amasya)</b>	0.5	<b>28 (Konya)</b>	0.6
<b>2 (Amasya)</b>	0.3	<b>29 (Alanya)</b>	0.4
<b>3 (Bilecik)</b>	<b>0.7</b>	<b>30 (Mersin)</b>	0.2
<b>4 (Kırklareli)</b>	0.2	<b>31 (Adana)</b>	0.3
<b>5 (Alanya)</b>	0.4	<b>32 (İzmir)</b>	0.5
<b>6 (Konya)</b>	0.5	<b>33 (İzmir)</b>	0.6
<b>7 (Konya)</b>	0.6	<b>34 (İzmir)</b>	0.6
<b>8 (Alanya)</b>	0.5	<b>35 (Tunceli)</b>	<b>0.8</b>
<b>9 (Kayseri)</b>	0.6	<b>36 (İstanbul)</b>	<b>0.8</b>
<b>10 (Kayseri)</b>	<b>0.8</b>	<b>37 (Edirne)</b>	0.6
<b>11 (Manisa)</b>	0.6	<b>38 (Edirne)</b>	0.4
<b>12 (Konya)</b>	0.6	<b>39 (Muğla)</b>	0.6
<b>13 (Kütahya)</b>	0.4	<b>40 (Bilecik)</b>	<b>0.9</b>
<b>14 (Balıkesir)</b>	0.5	<b>41 (Muğla)</b>	0.4
<b>15 (Balıkesir)</b>	0.6	<b>42 (İstanbul)</b>	0.6
<b>16 (Adana)</b>	0.2	<b>43 (Burdur)</b>	0.3
<b>17 (Adana)</b>	0.4	<b>44 (Burdur)</b>	0.4
<b>18 (Adana)</b>	<b>0.8</b>	<b>45 (İstanbul)</b>	0.6
<b>19 (Adana)</b>	0.6	<b>46 (Mersin)</b>	0.5
<b>20 (Niğde)</b>	0.5	<b>47 (Bursa)</b>	0.3
<b>21 (Niğde)</b>	0.2	<b>48 (Bursa)</b>	0.2
<b>22 (Trabzon)</b>	0.3	<b>49 (Bursa)</b>	0.2
<b>23 (Trabzon)</b>	0.5	<b>50 (Adana)</b>	0.3
<b>24 (Konya)</b>	0.6	<b>51 (Trabzon)</b>	0.5
<b>25 (Bilecik)</b>	0.6	<b>52 (Tunceli)</b>	0.5
<b>26 (Mersin)</b>	0.5	<b>53 (Kütahya)</b>	0.6
<b>27 (Mersin)</b>	0.4	<b>54 (Niğde)</b>	0.3

**Çizelge 3.1.** Toprak örneklerinden izole edilen bakterilerin zon çapları.



### 3.2. Biyokimyasal Ve Morfolojik Testler

Genel olarak *Bacillus* cinsini belirlemek amacıyla aşağıdaki tayin anahtarı kullanılmaktadır (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2.** *Bacillus* sp. izolatlarının taksonomik özellikleri (Buchanan ve Gibbons 1974).

#### 3.2.1. Biyokimyasal testler

##### 3.2.1.1. Katalaz testi

Katalaz bir enzim olup çoğunlukla aerobik mikroorganizmalar tarafından oluşturulurlar. Bu enzim ortamdaki hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) su ve oksijene ayırmaktadır. 2.2.3.2'ye göre yapılan katalaz testi sonunda, katı bakteri kültürlerine  $H_2O_2$  damlatıldığında, serbest oksijenin gaz kabarcıkları halinde gözlenmesi, hidrojen peroksitin ayrışmasını dolayısıyla da katalaz varlığını gösterdiğinden tüm bakteriler katalaz (+) olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3.** Belirlenen kolonilerde serbest oksijenin kabarcıklar halinde görünümü.

### 3.2.1.2. Nişasta hidroliz testi

*Bacillus* türleri özellikle  $\alpha$ -amilaz enzimi üretimi açısından çok önemlidirler ve çoğu türü nişastayı hidroliz edebilme yeteneğindedir (Priest 1977). 2.2.3.3'e göre yapılan test sonucunda, iyot varlığında nişasta, besiyerinde mavi-siyah bir renk vermiştir. Bu durum nişastayı parçalayan enzimin bulunmadığının bir göstergesi olup, eğer nişasta hidroliz edilmişse koloni etrafında açık renkli bir zon oluşumunun görülmesi pozitif bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. Denenen tüm bakterilerin nişasta hidroliz (+) oldukları görülmüştür (Şekil 3.4).



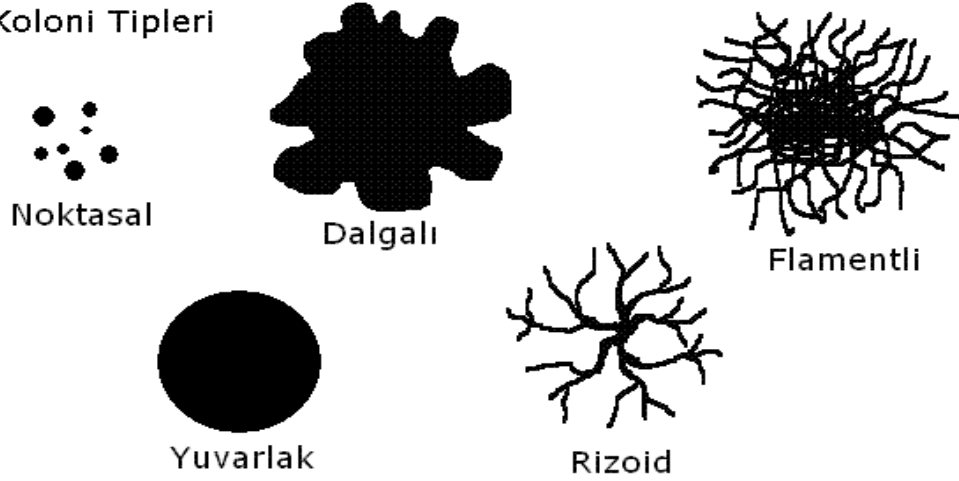
**Şekil 3.4.** Nişasta hidrolizi sonucunda iyotla boyanmış ve boyanmamış bölgeler.

### 3.2.2. Morfolojik testler

#### 3.2.2.1. Koloni yapısı ve bakterilerin şekli

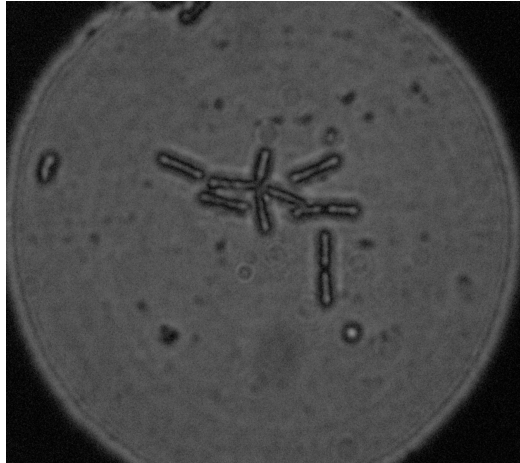
Bakteriler, farklı karakteristik koloni tiplerine sahiptirler (Şekil 3.5).

#### Koloni Tipleri



**Şekil 3.5.** Bakteriye koloni tipleri (www.slic2.wsu.edu.tr, 2009).

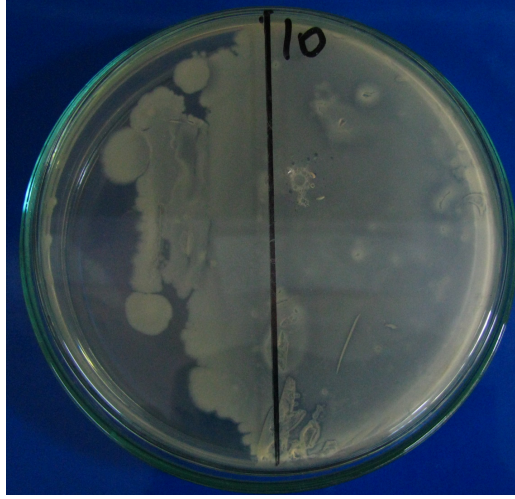
Çalışmamızda elde ettiğimiz bakterilerin noktasal, flamentli ve dalgali koloni tipi özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Mikroskopik incelemeler (Olympus CX31) sonucunda ise bakterilerin hepsinin çubuk (basil) şeklinde olduğu görülmüştür (Şekil 3.6).



**Şekil 3.6.** N-40 bakterisinin 100X objektifte görünümü (Olympus CX31).

### 3.2.2.2. Hareketlilik testi

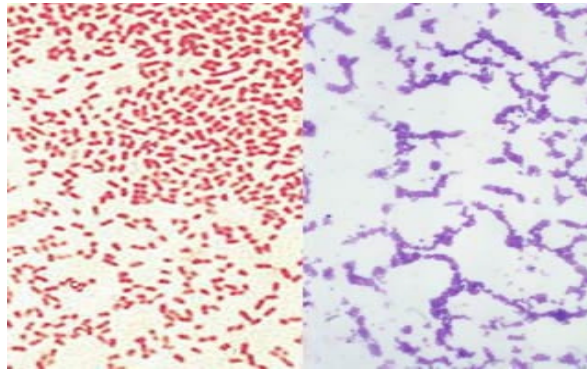
2.2.3.1'e göre yapılan hareketlilik testi sonucunda 4 adet bakteri hareketli (Şekil 3.7), 2 adet bakteri ise hareketsiz olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.2).



**Şekil 3.7.** Petri kutusundaki yumuşak agarlı besiyerinde hareketlilik kontrolü.

### 3.2.2.3. Gram boyama

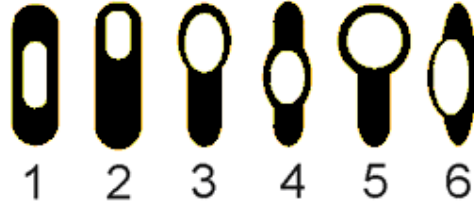
Bakterilerin tanımlanmasında önemli bir aşama olan gram boyama 2.2.3.4'e göre yapılmış olup, ilk boya olarak kullanılan kristal viyoleyi hücre içinde tutabilen bakteriler gram (+) olarak kabul edilmiş olup, denemeye alınan tüm bakteriler mor menekşe bir renk göstererek gram (+) olarak değerlendirilmişlerdir (Şekil 3.8).



**Şekil 3.8.** Gram (+) ve gram (-) bakterilerin görünümü (www.nmpdr.org).

### 3.2.2.4. Spor boyama

Spor oluşumu Bacillaceae familyasının tipik özelliğidir. Endospor oluşumu bu familyanın üyeleri olan *Bacillus* ve *Clostridium* cinsi bakterilerde görülmektedir. Denemeye alınan bakterilerde spor boyama 2.2.3.5' e göre yapılmış olup, tüm bakterilerin sporlu oldukları ve sporun hücre içindeki konumunun terminal (uç) bölgede olduğu saptanmıştır (Şekil 3.9, 2 nolu örnek). İncelemeler Olympus CX31 marka ışık mikroskopunda, 100X objektifte, immersiyon yağı ile yapılmıştır. Ancak fotoğraflar net bir şekilde elde edilememiştir.



**Şekil 3.9.** Bakterilerde görülen spor tipleri. 1-4. Merkezi, 2-3-5. Terminal, 6. Lateral endosporlar (<http://www.answers.com>, 2009).

TESTLER	N-3	N-10	N-18	N-35	N-36	N-40
Koloni Şekli	Dalgalı	Dalgalı	Flamentli	Dalgalı	Flamentli	Flamentli
Şekil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil
Gram Boyama	+	+	+	+	+	+
Spor Boyama	+	+	+	+	+	+
Endospor Pozisyonu	T	T	T	T	T	T
Hareketlilik	+	+	+	-	-	+

**Çizelge 3.2.** *Bacillus* cinsinin belirlenmesinde kullanılan morfolojik testler ve test sonuçları.

Yapılan biyokimyasal ve morfolojik testler sonucunda tüm bakterilerin *Bacillus* cinsine ait olduğu ancak hareketlilik testi sonucunda 2 adet bakterinin hareketsiz sonuç göstermesine rağmen, bunların da *Bacillus* oldukları değerlendirilmiştir, çünkü bu bakterilerde de spor oluşumu gözlenmiştir. Dolayısıyla bu 2 bakterinin *Bacillus*'ların bazı hareketsiz türleri içine dahil olduğu düşünülmüştür. Çalışma sonucunda 6 adet bakteriden sadece 4 tanesi proteaz üretimi için denemeye alınmıştır.

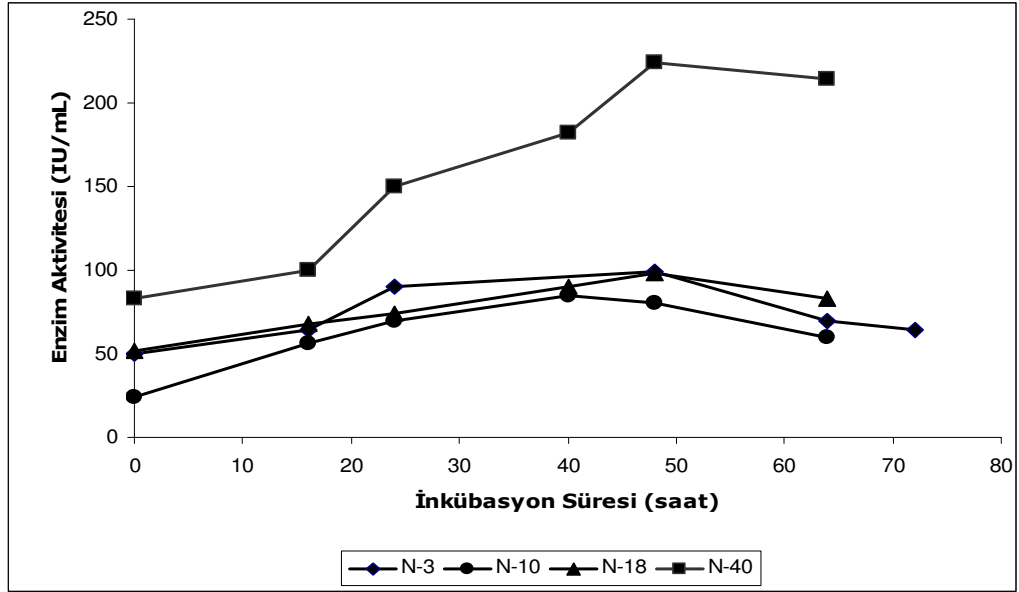
### 3.3. Proteaz Üretim Ortamının Belirlenmesi

Denemeye alınan 4 adet *Bacillus* sp.'den maksimum enzim üretimi amacıyla 2.2.5' te belirtilen besiyerleri ve kültür şartlarında bakteriler üretilmiştir. 16, 24, 40, 48, 64 ve 72. saatlerde yapılan aktivite tayini sonuçlarına göre en yüksek enzim aktivitesinin *Besiyeri 1*'de (Çizelge 2.4) görüldüğü tespit edilmiştir. Ayrıca denemeye alınan 4 adet bakteriden, Bilecik İli'nden alınan topraktan izole edilen N-40 no'lu bakterinin en yüksek proteaz aktivitesine ve üreme kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.3, Şekil 3.10).

İnkübasyon Süresi	N-3		N-10		N-18		N-40	
	U/mL	OD <sub>600</sub>	U/mL	OD <sub>600</sub>	U/mL	OD <sub>600</sub>	U/mL	OD <sub>600</sub>
16. saat	50	0.6	24	0.3	52	0.7	83	0.6
24. saat	64	0.6	56	0.5	68	0.9	100	0.7
40. saat	90	0.8	70	0.9	74	1.0	150	0.8
48. saat	99	0.9	85	1.3	90	1.2	182	0.9
64. saat	70	1.0	80	1.1	98	1.1	224	1.1
72. saat	64	1.1	60	0.8	83	0.7	214	1.0

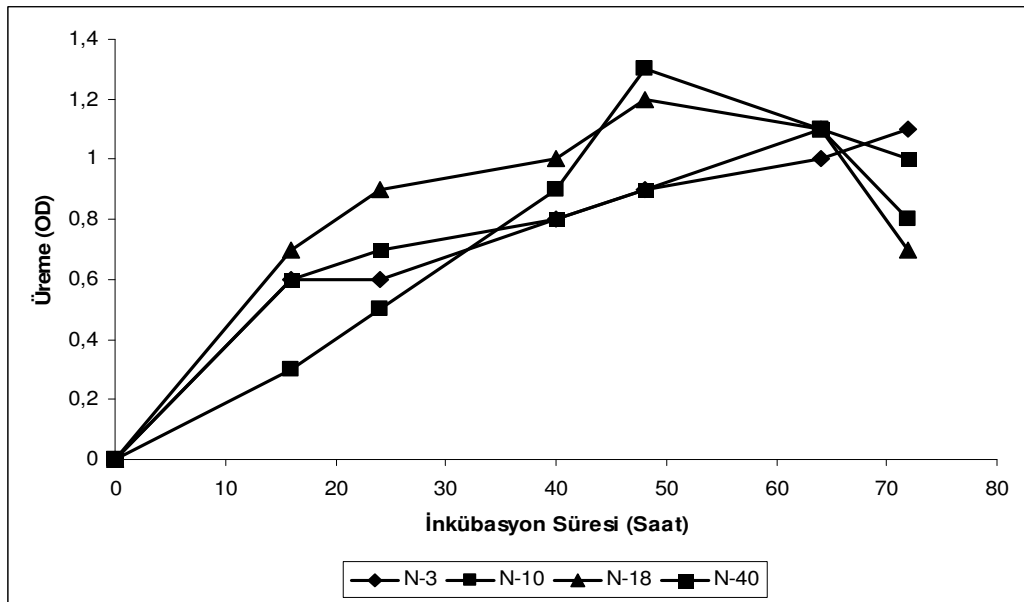
**Çizelge 3.3.** 1 no'lu besiyerinde üretilen 4 bakterinin enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.

N-3 ve N-10 bakterileri 48. saatte maksimum enzim aktivitesine ulaşırlarken, N-18 ve N-40 bakterilerinin 64. saatte maksimum aktiviteye ulaştıkları saptanmıştır (Şekil 3.10). N-10 bakterisinin 48. saatte gösterdiği proteaz üretim kapasitesi 1.3 ile en yüksek düzeyde kaydedilmiştir.



**Şekil 3.10.** Bakterilerin *Besiyeri 1'* de proteaz üretim kapasitelerinin karşılaştırılması.

Enzim üretimi genel olarak bakteri üremesi ile paralel olup, maksimum enzim üretimine logaritmik fazda ya da logaritmik fazın sonundaki durağan fazda ulaşıldığı belirlenmiştir (Şekil 3.11).



**Şekil 3.11.** N-3, N-10, N-18 ve N-40 no' lu bakterilerin zamana bağlı üreme değerleri.

Bundan sonraki çalışmalara *Besiyeri 1* ve *Bacillus* sp. N-40 olarak isimlendirilen bakteri ile devam edilmiştir.

### 3.4. Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Faktörler

Bakterilerin enzim üretim kapasiteleri, buldukları ortama bağlı olduğundan, ortam şartlarının değiştirilmesi enzim üretim miktarına etki etmektedir. Bu nedenle, *Besiyeri 1*'de karbon (C), azot (N) ve metal iyonları kaynakları değiştirilmiş, değişen ortam şartlarının *Bacillus* sp. N-40'ın proteaz üretim kapasitesine olan etkileri belirlenmiştir.

Çalışmalarda her deney iki kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

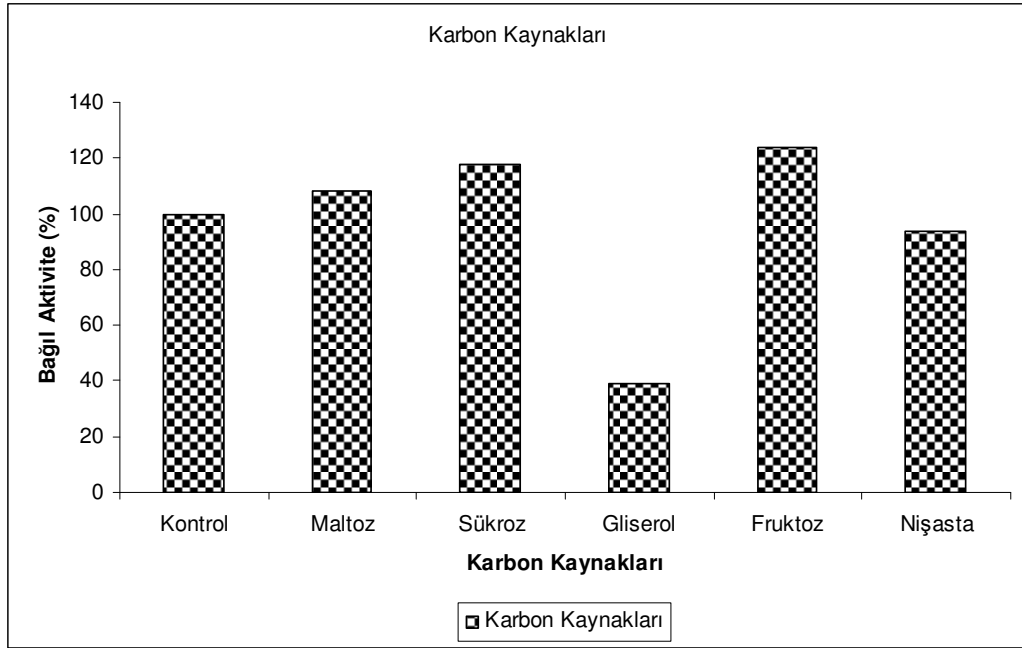
#### 3.4.1. Karbon kaynaklarının etkisi

Üreme ortamında bulunan karbon kaynaklarının bakteri gelişmesi ve enzim üretimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla maltoz, sükroz, gliserol, fruktoz ve nişasta içeren besiyeri ve aynı oranda bakteri 72 saat süreyle üretilmiş ve 16, 24, 40, 48, 64 ve 72. saatlerde alınan örneklerde TPA ve üreme değeri tayinleri yapılmıştır (Çizelge 3.4, Şekil 3.12).

üretim (saat)	Kontrol ( <i>Besiyeri 1</i> )			Maltoz			Sükroz			Gliserol			Fruktoz			Nişasta		
	U/mL	OD <sub>600</sub>	B. Akt. (%)	U/mL	OD <sub>600</sub>	B. Akt. (%)	U/mL	OD <sub>600</sub>	B. Akt. (%)	U/mL	OD <sub>600</sub>	B. Akt. (%)	U/mL	OD <sub>600</sub>	B. Akt. (%)	U/mL	OD <sub>600</sub>	B. Akt. (%)
16.	83	0.6	37.1	42	1.1	19	135	0.7	60	69	0.1	31	60	0.9	27	51	0.6	23
24.	100	0.7	45	64	0.9	29	178	0.9	79	80	0.1	36	68	0.8	30	143	0.7	64
40.	150	0.8	67	112	0.8	50	182	0.8	81	82	0.2	37	101	1.2	45	152	0.6	68
48.	182	0.9	81.2	136	0.8	61	190	1.0	85	85	0.2	38	117	1.4	52	154	0.5	69
64.	224	1.1	100	242	1.5	108	265	1.1	118	86	0.3	39	278	1.5	124	210	0.5	94
72.	214	1.0	96	236	1.3	105	258	0.9	115	80	0.3	36	264	1.4	118	197	0.3	88

**Çizelge 3.4.** Farklı karbon kaynaklarının *Bacillus* sp. N-40'ın enzim üretimi ve üreme üzerine etkileri.





**Şekil 3.12.** Farklı karbon kaynaklarının *Bacillus* sp. N-40' in enzim aktivitesi üzerine etkileri.

Çizelge 3.4 ve Şekil 3.12'nin incelenmesinden de anlaşılacağı üzere, denemeye alınan her 5 farklı karbon kaynağında maksimum enzim aktivitesi ve üremeye 64. saatte ulaşıldığı görülmektedir. *Bacillus* sp. N-40'in karbon kaynağı tercih sırası sırasıyla Fruktoz > Sükroz > Maltoz > Kontrol > Nişasta > Gliserol olarak belirlenirken, maksimum bakteri üremesinin sırasıyla Fruktoz = Maltoz > Sükroz=Kontrol > Nişasta > Gliserol varlığında olduğu görülmektedir. Fruktozlu ortamın (278 IU/mL) kontrole (224 IU/mL) (*Besiyeri 1*) göre %24, sükrozlu ortamın (265 IU/mL) ise %18'lik bir artış gösterdiği belirlenirken, gliserollü ortamda (86 IU/mL) %61.6'lık bir kayıp gözlenmiştir.

### 3.4.2. Azot kaynaklarının etkisi

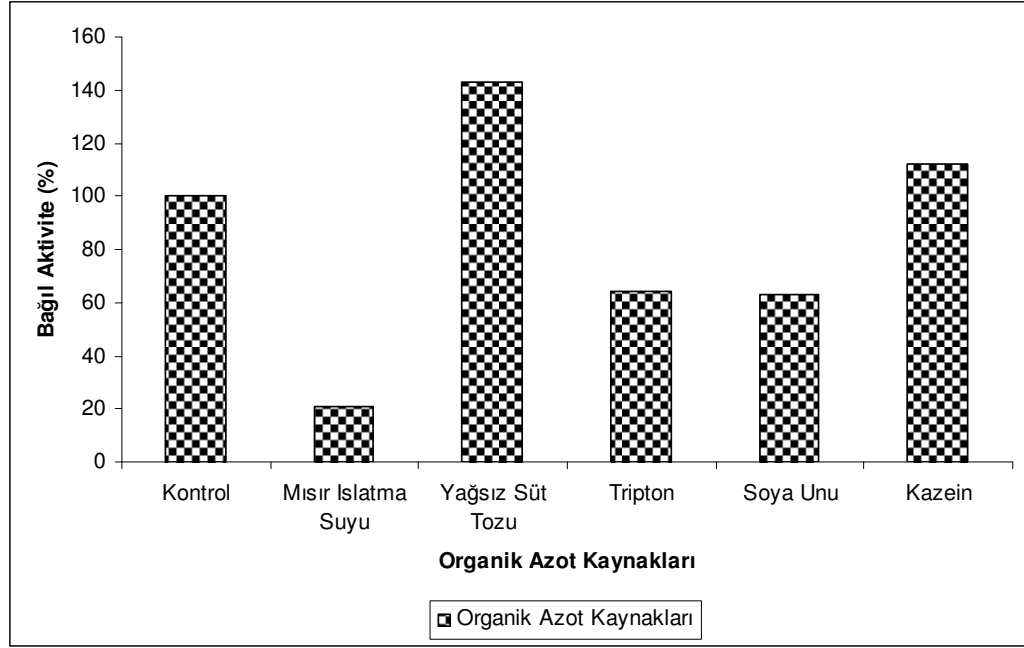
Azot kaynaklarının bakteri üremesi ve enzim üretimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla kontrol (*Besiyeri 1*) ortamındaki pepton ve yeast extract yerine sırasıyla Corn steep liquor, skimmed milk, tripton, soya unu ve kazein; inorganik azot kaynağı olarak  $KNO_3$  ve  $(NH_4)_2SO_4$  kullanılmıştır. Farklı azot kaynakları içeren besiyerinde, bakteri 72. saate kadar üretilmiş, 16, 24, 40, 48, 64 ve 72. saatlerde alınan örneklerde üreme değerleri ölçülmüş ve enzim aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar çizelge ve grafik olarak ayrı ayrı verilmiş

olup, buralarda da görülebileceği gibi en yüksek enzim aktivitesi organik azot kaynaklarının varlığında 64. ve 72. saatlerde yağsız süt tozu varlığında elde edilmiştir (Çizelge 3.5, Şekil 3.13). Önemli bir sonuç ise kazeinli ortamdan elde edilmiş olup, bakteri 24. saatte %12'lik bir artışla 64. saatteki kontrole göre maksimum enzim aktivitesi göstermiştir.

Üretim (saat)	Kontrol			Mısır Islatma Suyu			Yağsız Süt Tozu			Tripton			Soya Unu			Kazein		
	U/mL	OD <sub>600</sub>	B.Akt. (%)	U/mL	OD <sub>600</sub>	B.Akt. (%)	U/mL	OD <sub>600</sub>	B.Akt. (%)	U/mL	OD <sub>600</sub>	B.Akt. (%)	U/mL	OD <sub>600</sub>	B.Akt. (%)	U/mL	OD <sub>600</sub>	B.Akt. (%)
16.	83	0.6	37.1	30	0.06	13.4	161	0.6	72	130	0.8	58	56	0.5	25	208	1.0	93
24.	100	0.7	45	40	0.12	18	212	0.8	95	132	0.9	59	71	0.6	32	250	0.9	112
40.	150	0.8	67	46	0.28	21	266	1.1	119	136	1.0	61	106	0.3	47	248	0.8	111
48.	182	0.9	81.2	38	0.35	17	270	1.4	121	140	1.3	63	114	0.2	51	234	0.7	104
64.	224	1.1	100	36	0.42	16	320	1.7	143	144	1.5	64	142	0.2	63	232	0.7	104
72.	214	1.0	96	30	0.24	13	302	1.6	135	132	1.3	59	104	0.1	46	228	0.6	102

**Çizelge 3.5.** Organik azot kaynaklarının *Bacillus* sp. N-40'ın TPA ve üreme miktarı üzerine etkileri.

Bakterinin her bir organik azot kaynağını sırasıyla Skimmed milk > Kazein > Tripton > Soya Unu > Corn steep liquor şeklinde tercih ettiği görülmüştür. Belirtilen tercih sıraları incelendiğinde, kullanılan azot kaynakları içerisinde yağsız süt tozunun (320 IU/mL) kontrole (224 IU/mL) (*Besiyeri 1*) göre %43'lük bir verim artışı sağladığı saptanmıştır. Mısır ıslatma suyu (46 IU/mL) (Corn Steep Liquor) varlığında ise kontrole (224 IU/mL) göre enzim aktivitesinde %80'lik bir düşüş olduğu bulunmuştur.



**Şekil 3.13.** Organik azot kaynaklarının *Bacillus* sp. N-40' in enzim üretim kapasitesi üzerine etkileri.

İnorganik azot varlığında ise enzim aktivitesinde önemli düşüşler saptanmış olup, inorganik azot kaynaklarının *Bacillus* sp. N-40'tan elde edilen proteaz enzimin üretimi üzerine pozitif bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 3.6).

Üretim (saat)	Kontrol		KNO <sub>3</sub>		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
	U/mL	OD <sub>600</sub>	U/mL	OD <sub>600</sub>	U/mL	OD <sub>600</sub>
16.	83	0.6	4	0.03	0.2	0.02
24.	100	0.7	5	0.02	0.4	0.02
40.	150	0.8	5.4	0.02	0.8	0.07
48.	182	0.9	6	0.02	1	0.10
64.	224	1.1	4.2	0.01	4.2	0.13
72.	214	1.0	4	0.01	4.8	0.14

**Çizelge 3.6.** İnorganik azot kaynaklarının *Bacillus* sp. N-40' in TPA ve üreme miktarı üzerine etkileri.

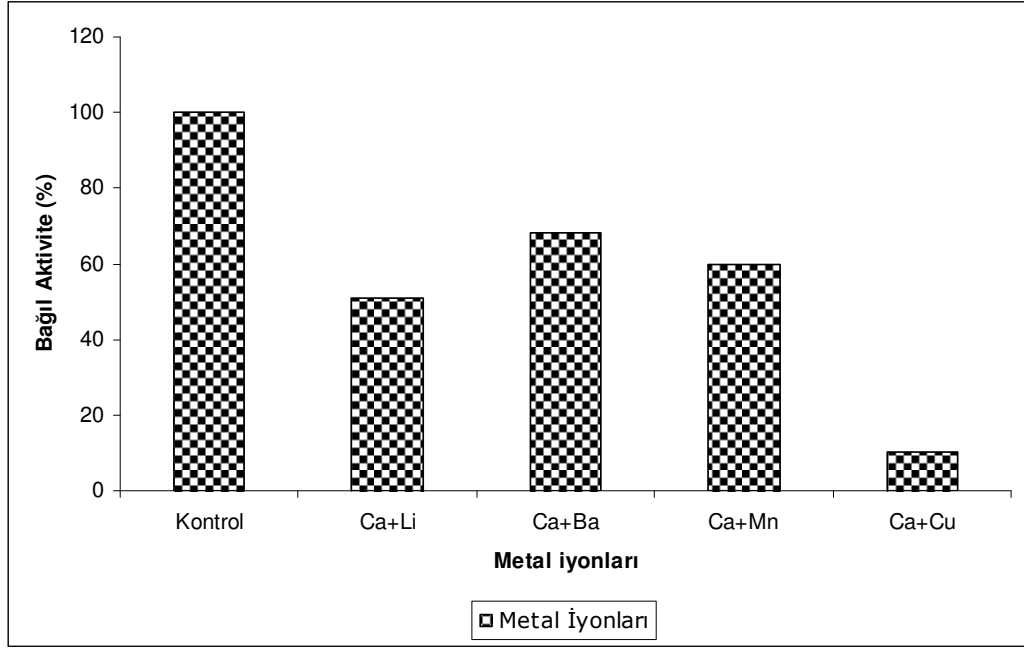
Bakteri üremesi üzerine organik azot kaynaklarının etkisi incelendiğinde, bu tercihin farklı bir şekilde sıralandığı görülmektedir. Buna göre; Yağsız süt tozu > Tripton > Kontrol > Kazein > Soya Unu > Mısır ıslatma suyu olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.5 ve 3.6). İnorganik azot kaynaklarının etkisi incelendiğinde ise, üremenin yok denecek kadar az olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.6).

### 3.4.3. Metal iyonlarının etkisi

Metal iyonlarının bakteri üremesi ve enzim üretimi üzerine etkisini araştırmak üzere yapılan çalışmalarda  $\text{CaCl}_2$  ve  $\text{MgCl}_2$  ile farklı metal tuzlarının kombinasyonları, *Besiyeri 1'* e katılmıştır. Bu amaçla,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  ve  $\text{LiSO}_4$  kullanılmıştır. *Bacillus* sp. N-40 suşu 72. saate kadar üretilmiş ve üretim sırasında 16, 24, 40, 48, 64 ve 72. saatlerde alınan örneklerde üreme değerleri saptanmış ve enzim aktiviteleri tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar grafik ve çizelge olarak ayrı ayrı belirtilmiştir (Çizelge 3.7, 3.8, Şekil 3.14,3.15).

üretim (saat)	Kontrol ( $\text{Ca}^{+2}+\text{Mg}^{+2}$ )			$\text{Ca}^{+2}+\text{Li}^{+1}$			$\text{Ca}^{+2}+\text{Ba}^{+2}$			$\text{Ca}^{+2}+\text{Mn}^{+2}$			$\text{Ca}^{+2}+\text{Cu}^{+2}$		
	U/mL	OD <sub>600</sub>	B.Akt. (%)	U/mL	OD <sub>600</sub>	B.Akt. (%)	U/mL	OD <sub>600</sub>	B.Akt. (%)	U/mL	OD <sub>600</sub>	B.Akt. (%)	U/mL	OD <sub>600</sub>	B.Akt. (%)
16.	83	0.6	37.1	30	0.5	13.3	60	0.4	27	28	0.9	12.5	10	0.01	4.5
24.	100	0.7	45	36	0.6	16	70	0.5	31	50	0.9	22	15	0.01	6.7
40.	150	0.8	67	52	0.8	23	80	0.6	36	66	1.2	29	16	0.01	7
48.	182	0.9	81.2	76	0.8	34	106	0.7	47	90	1.4	40	20	0.01	8.9
64.	224	1.1	100	114	0.7	51	152	0.6	68	134	1.4	60	22	0.01	10.0
72.	214	1.0	96	60	0.6	27	90	0.6	40	80	1.2	36	15	0.01	6.7

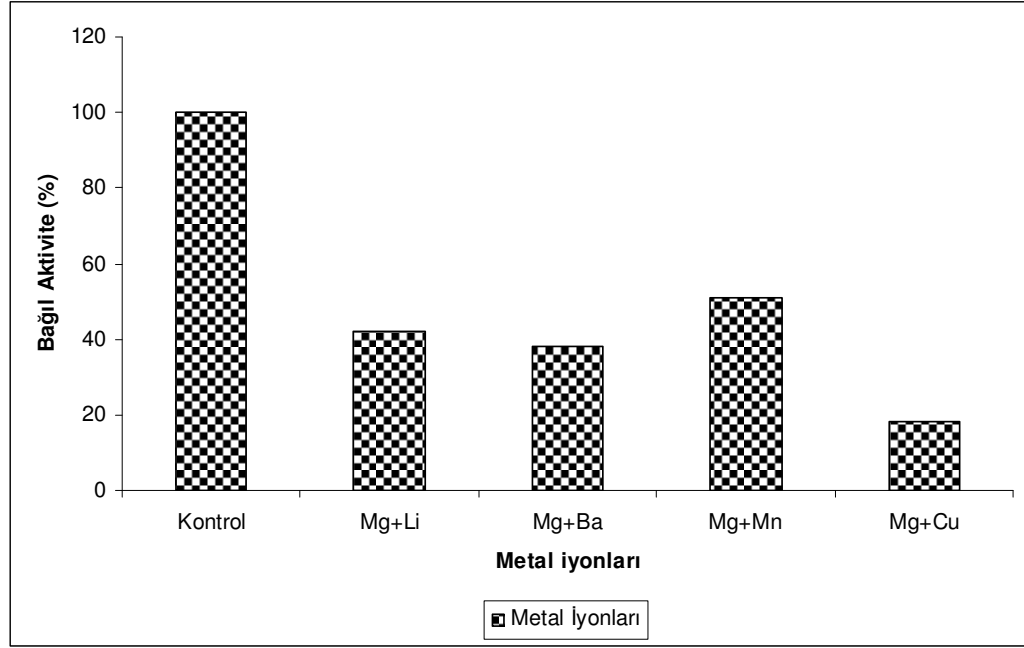
**Çizelge 3.7.**  $\text{Ca}^{+2}$  ve çeşitli metal iyonları kombinasyonlarının TPA ve bakteri üremesi üzerine etkilerinin, kontrol ortamıyla karşılaştırılması.



**Şekil 3.14.**  $\text{Ca}^{+2}$  ve çeşitli metal iyonları kombinasyonlarının *Bacillus* sp. N-40 bakterisinin enzim üretim kapasitesi üzerine etkileri.

Üretim (saat)	Kontrol			$\text{Mg}^{+2}+\text{Li}^{+1}$			$\text{Mg}^{+2}+\text{Ba}^{+2}$			$\text{Mg}^{+2}+\text{Mn}^{+2}$			$\text{Mg}^{+2}+\text{Cu}^{+2}$		
	U/mL	OD <sub>600</sub>	B.Akt. (%)	U/mL	OD <sub>600</sub>	B.Akt. (%)	U/mL	OD <sub>600</sub>	B.Akt. (%)	U/mL	OD <sub>600</sub>	B.Akt. (%)	U/mL	OD <sub>600</sub>	B.Akt. (%)
<b>16.</b>	83	0.6	37.1	35	1.1	16	40	0.7	18	50	1.0	22	20	0.01	9
<b>24.</b>	100	0.7	45	40	1.1	18	43	0.7	19	52	1.1	23	25	0.01	11
<b>40.</b>	150	0.8	67	43	1.2	19	47	0.8	21	55	1.2	25	33	0.01	15
<b>48.</b>	182	0.9	81.2	48	1.2	21	56	0.9	25	66	1.3	29	39	0.01	17
<b>64.</b>	224	1.1	100	93	1.1	42	86	1.0	38	115	1.5	51	41	0.01	18
<b>72.</b>	214	1.0	96	44	1.0	20	56	1.1	25	60	1.4	27	35	0.01	16

**Çizelge 3.8.**  $\text{Mg}^{+2}$  ve çeşitli metal iyonları kombinasyonlarının TPA ve bakteri üremesi üzerine etkilerinin, kontrol ortamıyla karşılaştırılması.



**Şekil 3.15.** Mg<sup>+2</sup> ve çeşitli metal iyonları kombinasyonlarının *Bacillus* sp. N-40 bakterisinin enzim üretim kapasitesi üzerine etkileri.

Ayrıca, besiyerindeki metal tuzları (CaCl<sub>2</sub> ve MgCl<sub>2</sub>) ayrı ayrı besi ortamına eklenmiş ve aktivite tayinleri yapılmıştır (Çizelge 3.9).

Üretim (saat)	Kontrol (Ca <sup>+2</sup> +Mg <sup>+2</sup> )		Ca <sup>+2</sup>		Mg <sup>+2</sup>	
	U/mL	OD <sub>600</sub>	U/mL	OD <sub>600</sub>	U/mL	OD <sub>600</sub>
16.	83	0.6	50	0.5	38	0.9
24.	100	0.7	80	0.5	41	1.1
40.	150	0.8	97	0.7	46	1.1
48.	182	0.9	101	0.8	52	1.2
64.	224	1.1	112	0.8	60	1.2
72.	214	1.0	128	0.7	44	1.1

**Çizelge 3.9.** Ca<sup>+2</sup> ve Mg<sup>+2</sup>' un ayrı ayrı kullanıldığı ortamlarda TPA ve bakteri üremesi.

Yapılan denemelerde maksimum enzim aktivitesine tüm metal iyonları için 64. saatte ulaşıldığı saptanmıştır (Çizelge 3.7, 3.8 ve 3.9). Maksimum aktivitenin gözlemlendiği metal tuzlarından elde edilen değerler, kontrol olarak kullanılan *Besiyeri 1'* den elde edilen değerler ile karşılaştırıldığında oldukça düşük aktivite değerleri bulunmuştur. Denemede kullanılan  $\text{Ca}^{+2}$ +metal tuzları kontrol dışında, kendi aralarında enzim aktivitesi için sıralanacak olursa,  $\text{Ca}^{+2}+\text{Ba}^{+2} > \text{Ca}^{+2}+\text{Mn}^{+2} > \text{Ca}^{+2}+\text{Li}^{+1} > \text{Ca}^{+2}+\text{Cu}^{+2}$  olarak bulunurken (Şekil 3.14);  $\text{Mg}^{+2}$ +metal tuzları,  $\text{Mg}^{+2}+\text{Mn}^{+2} > \text{Mg}^{+2}+\text{Li}^{+1} > \text{Mg}^{+2}+\text{Ba}^{+2} > \text{Mg}^{+2}+\text{Cu}^{+2}$  olarak farklılık göstermektedir (Şekil 3.15).

Tercih sıralarına bakıldığında enzim üretiminde  $\text{Ca}^{+2}+\text{Ba}^{+2}$ ' un ilk sırada yer aldığı,  $\text{Ca}^{+2}+\text{Cu}^{+2}$  ve  $\text{Mg}^{+2}+\text{Cu}^{+2}$ ' nun varlığında ise enzim üretiminde önemli düşüşler elde edildiği görülmüştür.  $\text{Ca}^{+2}$  varlığında proteaz aktivitesinin,  $\text{Mg}^{+2}$  a göre önemli bir yer tuttuğu gözlenmiştir. Yaptığımız çalışmada, besi ortamında tek başına  $\text{Ca}^{+2}$  ve tek başına  $\text{Mg}^{+2}$ ' u ayrı ayrı kullandığımızda,  $\text{Ca}^{+2}$ ' un  $\text{Mg}^{+2}$ ' a oranla %87 daha fazla enzim aktivitesi elde edilmiştir. Tek başına  $\text{Ca}^{+2}$ ' un ise, fazla bir etkisinin olmayıp, her iki metal iyonunun kombine edilerek verilmesinin enzim üretimini arttırdığı, kontrolle kıyaslama yapıldığında görülmektedir.

#### **3.4.4. Maksimum proteaz üretimi için modifiye ortamın oluşturulması**

Enzim üretim ortamı olarak belirlenen besiyerinde (Çizelge 2.4) bulunan karbon kaynakları, azot kaynakları ve metal iyonları değiştirilerek daha yüksek miktarda proteaz üretimi sağlanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla en yüksek proteaz üretiminin elde edildiği karbon kaynağı olarak fruktoz, azot kaynağı olarak skimmed milk ve metal iyonlarından  $\text{Mg}^{+2}+\text{Ca}^{+2}$  iyonları kullanılarak modifiye ortam oluşturulmuştur (Çizelge 3.10).

<b>İçerik</b>	<b><i>Besiyeri 1</i></b> <b>(Qadar ve ark. 2009)</b> <b>(% g)</b>	<b>Modifiye Ortam</b> <b>(% g)</b>
<b>Glukoz</b>	1	-
<b>Pepton</b>	10	-
<b>Maya özütü</b>	0.2	-
<b>Fruktoz</b>	-	1
<b>Skimmed Milk</b>	-	10.2
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	0.1	0.1
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0.1	0.1
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0.5	0.5
<b>pH</b>	7.0	7.0

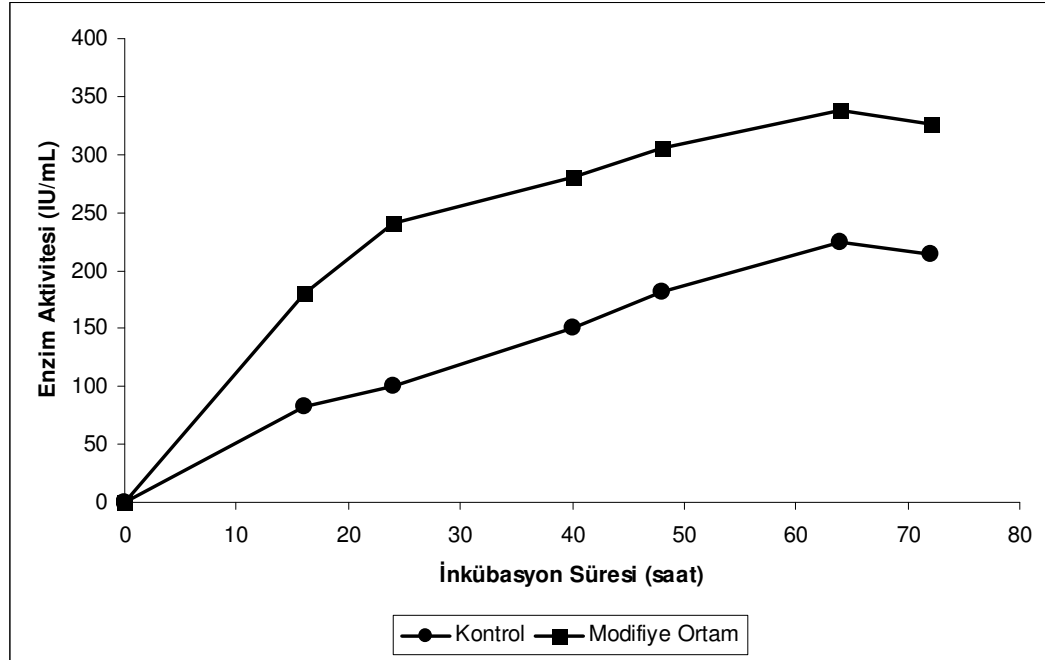
**Çizelge 3.10.** Kontrol olarak kullanılan besiyeri ve yeni modifiye besiyerinin içerikleri.

Çizelge 3.10'da görüldüğü gibi tarafımızdan modifiye edilen ortamda kontrole (*Besiyeri 1*) göre yüksek verimde proteaz üretimi gerçekleştirilmiş olup, 64. saatte aktivitede %51 oranında artış sağlanmıştır (Çizelge 3.11, Şekil 3.16). Bakterinin maksimum enzim üretimine 64. saatte ulaştığı, üremenin ise 72. saatte gözlemlendiği saptanmıştır (Çizelge 3.11, Şekil 3.16).



üretim (saat)	Kontrol (Qadar ve ark. 2009)			Modifiye Ortam		
	U/mL	OD <sub>600</sub>	B.Akt. (%)	U/mL	OD <sub>600</sub>	B.Akt. (%)
16.	83	0.6	37.1	180	0.9	80
24.	100	0.7	45	240	1.1	107
40.	150	0.8	67	280	1.3	125
48.	182	0.9	81.2	306	1.4	137
64.	224	1.1	100	338	1.6	151
72.	214	1.0	96	326	1.7	146

**Çizelge 3.11.** Modifiye ortamda TPA ve bakteri üremesinin kontrol ortamlarla (*Besiyeri 1*) karşılaştırılması.



**Şekil 3.16.** Kontrol (*Besiyeri 1*) ve Modifiye ortamlarda *Bacillus* sp. N-40'ın zamana karşı enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.

### 3.5. Enzim Karakterizasyonu

Enzimin karakterize edilmesi amacıyla 2.2.6'da belirtildiği şekilde yapılan üretim sonucunda, santrifüjasyonla ayrılan enzim çözültüsü kaba enzim olarak kullanılmıştır. Kaba enzim çözültüsü üzerine sıcaklık ve termostabilite, pH ve pH stabilitesi ile farklı metal iyonlarının etkilerine bakılmıştır. Ayrıca kısmi olarak saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı jel elektroforez yöntemi (Laemmli 1974) ile tayin edilmiştir.

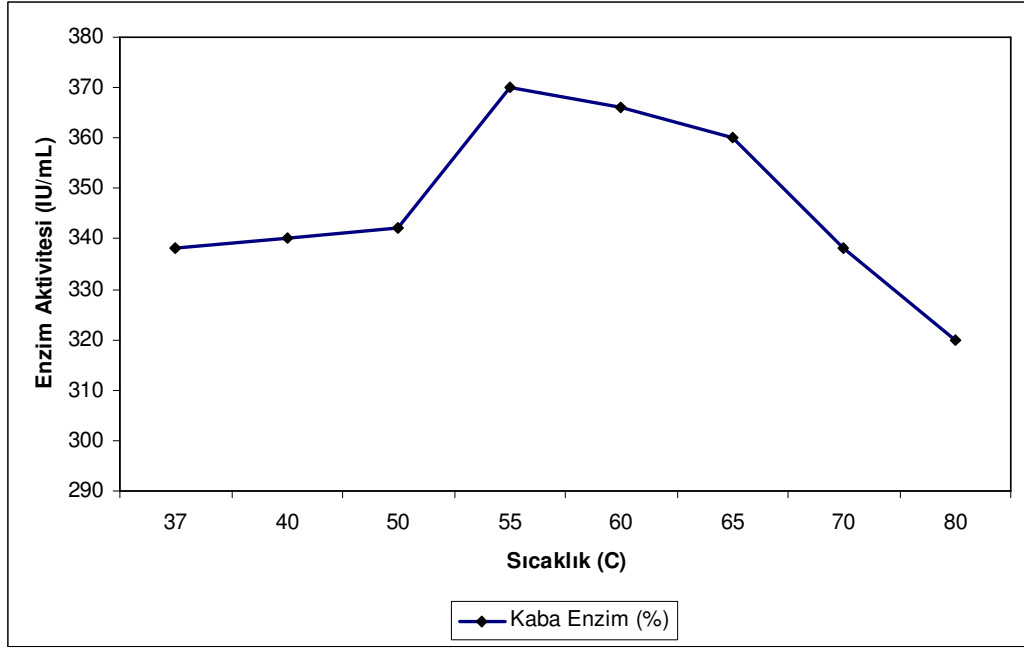
#### 3.5.1. Sıcaklığın ve termostabilitenin enzim aktivitesi üzerine etkisi

Enzim üzerine sıcaklık derecelerinin etkilerini belirlemek üzere 37, 40, 50, 55, 60, 65, 70 ve 80°C'lerde aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar kontrol olarak kullanılan sıcaklık derecesinden (37°C) elde edilen ve 100 olarak kabul edilen aktivite değerlerine göre % olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.12, Şekil 3.17).

Sıcaklık (°C)	Kaba Enzim (U/mL)	Kaba Enzim (%)
37 (Kontrol)	338	100
40	340	100.6
50	342	101.1
55	370	109.5
60	366	108.2
65	360	106.5
70	338	100
80	320	94.6

**Çizelge 3.12.** Proteaz enzimi üzerine sıcaklığın etkisi.

Elde edilen sonuçlara göre kaba enzimin 55°C'de maksimum aktivite gösterdiği saptanmıştır. Ancak 40 ve 70°C'ler arasındaki aktivite değerleri birbirlerine çok yakın bulunmuştur. Bu da enzimin geniş bir sıcaklık aralığında aktif olduğunu göstermektedir.



**Şekil 3.17.** Farklı sıcaklık değerlerinde, saptanan bağıl enzim aktivite sonuçları.

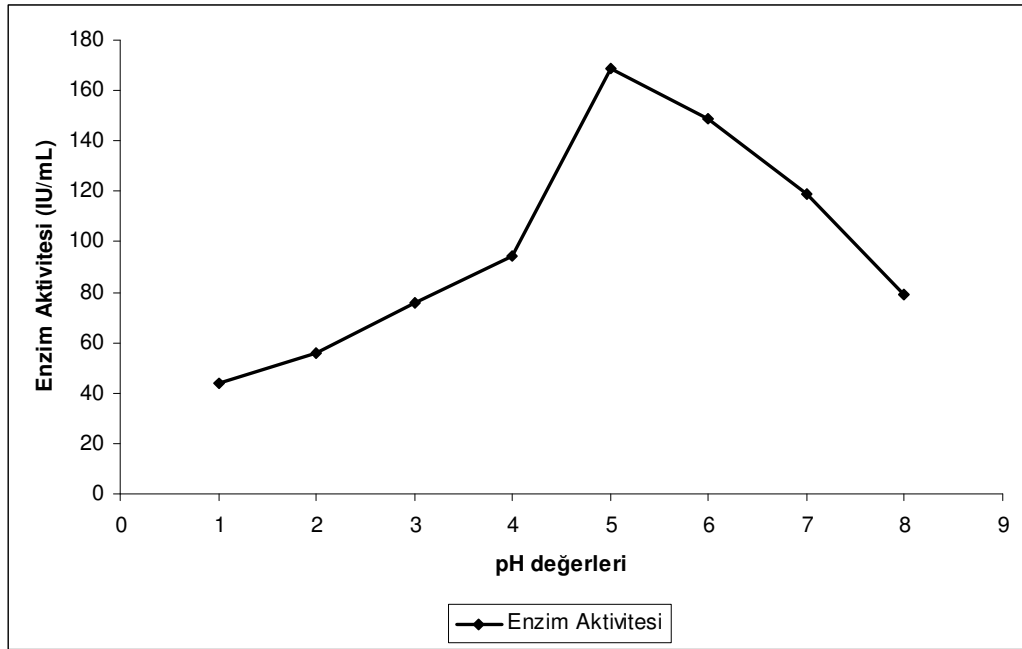
Enzimin 80°C'de yüksek aktiviteye sahip olması da enzimin termostabil olacağını göstermiştir. Ancak enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık derecesi olan 55°C' de enzim örneğinin stabilitesine bakılmış ve enzim substrat çözeltisi su banyosunda 30 dakika, 1 saat, 2 saat ve 3 saat süre ile tutulmuş ve 3 saat sonunda aktivitenin %77 oranında korunduğu saptanmıştır.

### 3.5.2. pH'nın ve pH stabilitesinin enzim aktivitesi üzerine etkisi

Proteaz enziminin optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla enzim 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 ve 9.0 pH'larda hazırlanan substrat çözeltilerinde aktivite tayinleri yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sırasında kontrol olarak kullanılan pH' da (pH 7.0) elde edilen sonuç %100 olarak kabul edilmiş ve diğer sonuçlar buna göre % olarak hesaplanmıştır. Çizelge 3.13 ve Şekil 3.18'de de görüldüğü gibi enzimin optimum pH değerinin 7.0 olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda enzimin alkali taraftaki aktivitesinin asidik tarafa göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Ancak pH 9.0'da aktivitede % 53.3 oranında bir kayıp görülmüştür.

pH Değerleri	Enzim Aktivitesi (IU/mL)
4	44
5	56
6	76
6.5	94
7	169
7.5	149
8	119
9	79

**Çizelge 3.13.** Enzim üzerine pH etkisinin belirlenmesi.



**Şekil 3.18.** Farklı pH değerlerine göre saptanan bağıl enzim aktivite sonuçları.

Enzimin pH stabilitesini belirlemek amacıyla enzim pH 7.0'de 4 saat boyunca 37°C'deki su banyosunda tutulmuş ve 4 saat sonunda aktivitesini %100 oranında koruduğu saptanmıştır.

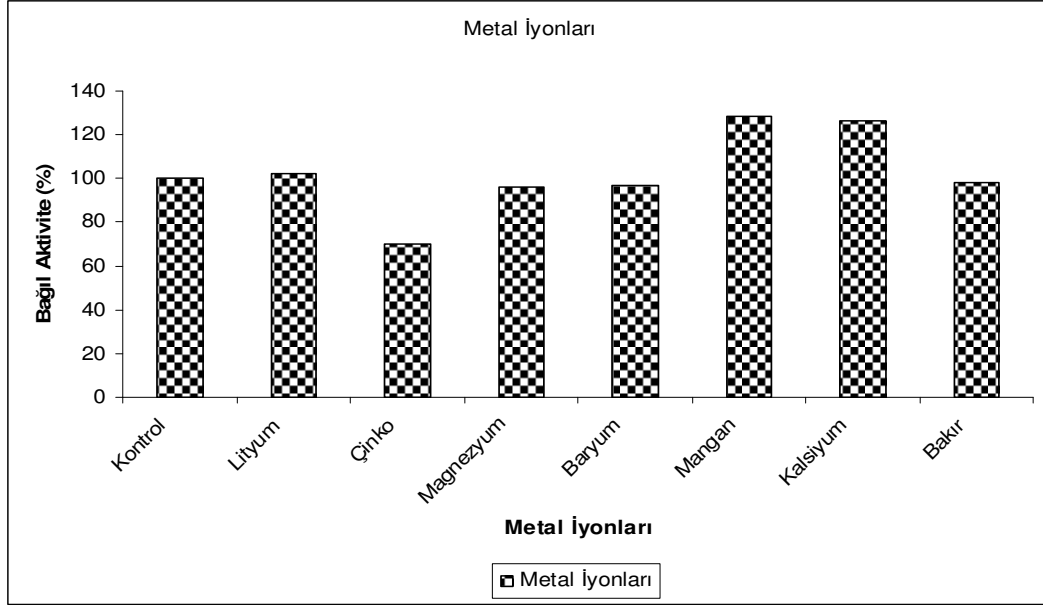
### 3.5.3. Çeşitli metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi

Proteaz enzimine metal iyonlarının etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{LiSO}_4$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  ve  $\text{ZnSO}_4$  metalleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar içerisinde hiçbir metal iyonu bulunmayan substrat çözeltisi ile elde edilen aktivite %100 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.14).

<b>Metal İyonları (5 mM)</b>	<b>Kaba Enzim (%)</b>
Kontrol	100
$\text{Li}^{+2}$	102.4
$\text{Zn}^{+2}$	69.6
$\text{Mg}^{+2}$	95.9
$\text{Ba}^{+2}$	97.5
$\text{Mn}^{+2}$	128
$\text{Ca}^{+2}$	126.2
$\text{Cu}^{+2}$	97.5

**Çizelge 3.14.** Metal iyonlarının enzim üzerine etkisinin belirlenmesi.

Şekil 3.19'da görüldüğü gibi  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Mn}^{+2}$  in enzim aktivitesini sırasıyla %26 ve %28 oranında arttırdığı saptanmıştır. Kullanılan metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde inhibitör bir etki yapmadığı saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre proteaz enzimi üzerine metal iyonlarının tercih  $\text{Mn}^{+2} > \text{Ca}^{+2} > \text{Li}^{+1} > \text{Ba}^{+2} = \text{Cu}^{+2} > \text{Mg}^{+2} > \text{Zn}^{+2}$  olarak bulunmuştur (Çizelge 3.14, Şekil 3.19).



**Şekil 3.19.** Çeşitli metal iyonları varlığında kaba enzim aktivitesinin bağıl olarak değişimi.

### 3.6. Enzimin Kısmi Saflaştırılması

Enzimin kısmi saflaştırılması ve karakterize edilmesi için modifiye ortamda üretilmiş olan *Bacillus* sp. N-40 suşundan elde edilen enzim çözeltisi kullanılmıştır. Bu amaçla sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz uygulanmıştır.

Amonyum sülfat çöktürmesi amacıyla %75'lik amonyum sülfat kullanılmış ve 1 gece süren çöktürmenin ardından TPA tayini ve Lowry (Lowry ve ark. 1951) metodu ile toplam protein miktar tayinleri yapılmıştır (Çizelge 3.15).

<b>Safılaştırma Basamağı</b>	<b>Hacim (mL)</b>	<b>Toplam Protein (mg)</b>	<b>Toplam Aktivite (U)</b>	<b>Spesifik Aktivite (U/mg)</b>	<b>Verim* (%)</b>	<b>Saflık** (kez)</b>
Kültür Ortamı	100	100	33800	338	100	1
Amonyum Sülfat Çöktürmesi (%75)	50	30	13800	460	40.83	1.36
Diyaliz	40	14	10000	714	29.59	2.11

**Çizelge 3.15.** Proteaz enziminin safılaştırma basamakları.

\*Verim, toplam aktivite üzerinden hesaplanmıştır.

\*\* Saflık, spesifik aktivite üzerinden hesaplanmıştır.

Çizelge 3.15'in incelenmesinden de anlaşılabilceği gibi safılaştırmanın çeşitli basamaklarında toplam protein miktarı, toplam aktivite ve % verim basamak basamak azalmış, buna karşın spesifik aktivite ve saflık gittikçe artmıştır. Burada, diyaliz sonrası enzim 2.11 kez safılaştırılabildiği halde, toplam aktivitenin %70.4'ünün kaybolduğu gözlenmiştir.

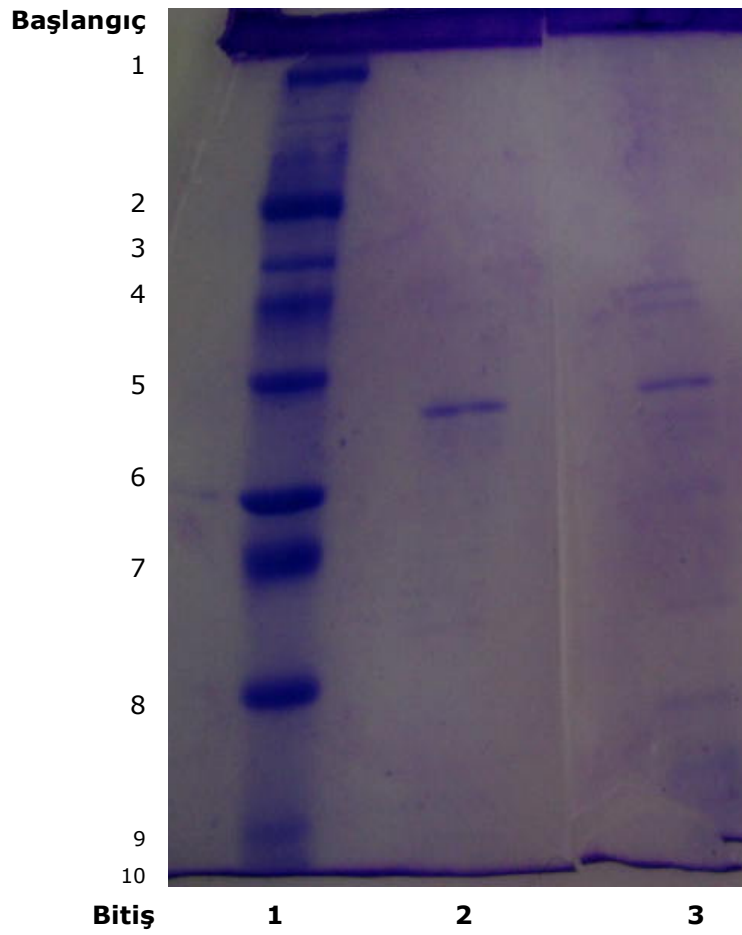
### 3.7. Enzimin moleküler ağırlığının tespiti

Kısmi olarak safılaştırılan enzim örneğinin moleküler ağırlığını belirlemek amacıyla, elektroforez jeline enzim örneği yanında moleküler ağırlıkları bilinen standart protein çözeltisi de uygulanmış ve elektroforez işleminde oluşan bandların (Şekil 3.20) Rf değerlerinden yararlanılarak aşığıda verilen formüle göre enzim ve standart protein çözeltisinin göreceli hareketlilik değerleri hesaplanmıştır.

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

Moleküler ağırlıkları bilinen standart proteinlerin göreceli hareketlilik değerleri ile molekül ağırlıkları yarı logaritmik kağıda işlenmiş ve böylece standart bir eğri elde edilmiştir (Şekil 3.21). Elde edilen grafiğin analizi yapılarak, örneğin moleküler ağırlığı saptanmıştır (Şekil 3.21).

Şekil 3.20’de görülebileceği gibi koyu bir band halinde görülen proteinin moleküler ağırlığının yaklaşık olarak 52 kDa olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.20’de görülen 3 no’lu kaba enzim örneğinde birkaç band görülmektedir. Amonyum sülfat ve diyaliz sonrasında ise bu bantların kısmi olarak saflaştırma ile giderildiği ve tek band olarak elde edildiği görülmektedir (Şekil 3.20, 2. Diyalizat).



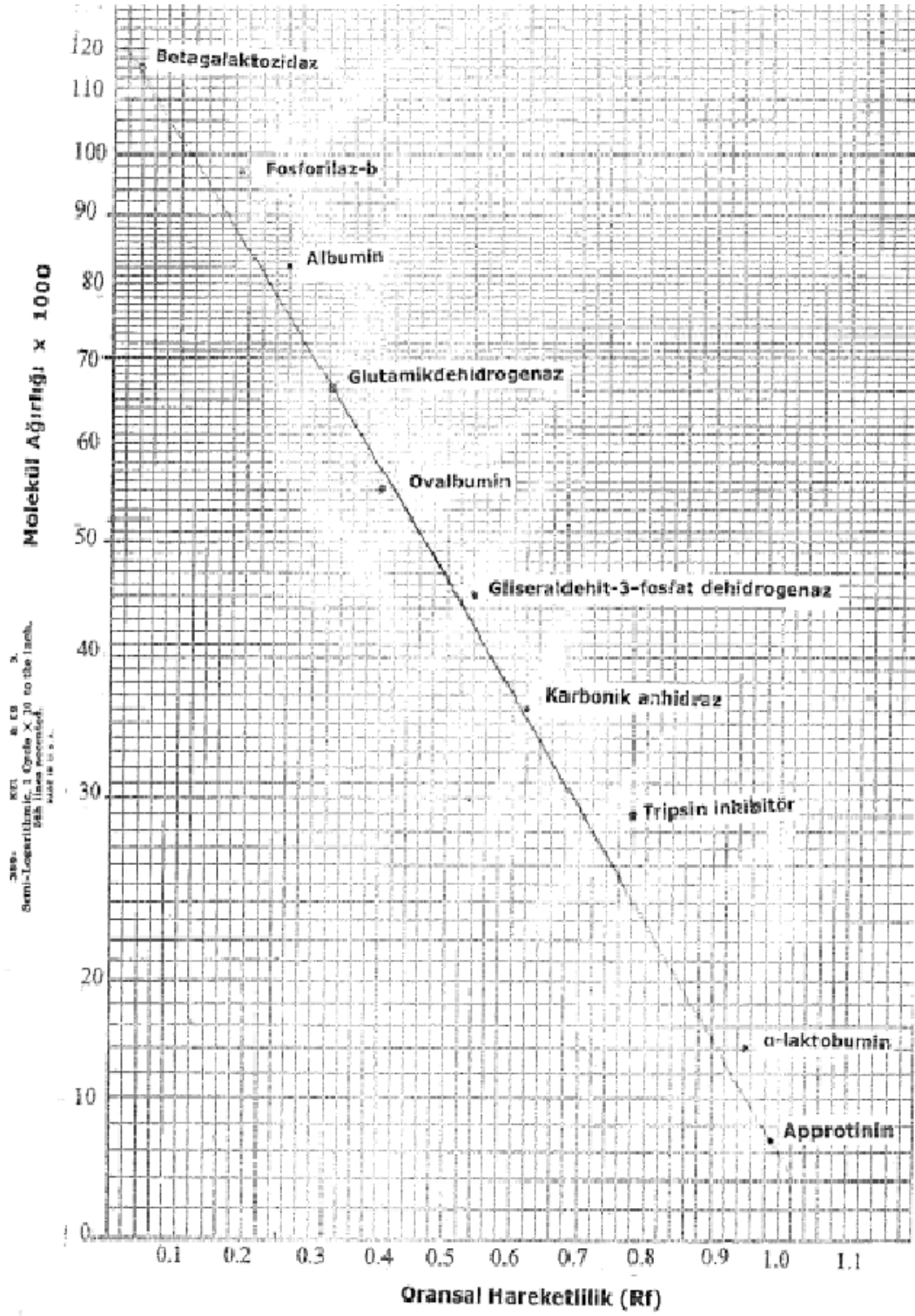
**Şekil 3.20.** SDS-Page sonrası elde edilen jelde protein bantlarının görünümü.

**1.** Standart Proteinler, **2.** Diyalizat, **3.** Kaba Enzim.



<b>Standart Proteinler</b>	<b>Aldıkları yol (cm)</b>	<b>Göreceli Hareketlilik Değeri (Rf)</b>	<b>Molekül Ağırlığı (kDa)</b>
<b>1-Betagalaktozidaz</b>	0.4	0.04	116
<b>2-Fosforilaz-b</b>	2.0	0.19	97
<b>3-Albumin</b>	2.8	0.26	84
<b>4-Glutamikdehidrogenaz</b>	3.3	0.31	66
<b>5-Ovalbumin</b>	4.3	0.40	55
<b>6-Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz</b>	5.8	0.54	45
<b>7-Karbonik anhidraz</b>	6.6	0.62	36
<b>8-Tripsin inhibitör</b>	8.3	0.78	29
<b>9-<math>\alpha</math>-laktobumin</b>	10.2	0.95	14
<b>10-Aprotinin</b>	10.5	0.98	6.5
<b><u>Enzim Örneği</u></b>			
<b>2- Diyalizat</b>	4.7	0.44	52
<b>İzleme Boyası</b>	10.7	-	-

**Çizelge 3.16.** Standart proteinler, enzim örnekleri, çözeltilerin Rf değerleri ve molekül ağırlıkları.



**Şekil 3.21.** Standart proteinlerin Rf değerleri ve molekül ağırlıklarına göre oluşturulan standart eğri.

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enzimler, endüstride hemen her alanda kullanılabilmekte ve bu alanların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Endüstride kullanılan proteaz kaynakları kolay üretim şartlarından dolayı genellikle bakterilerdir. Bu nedenle, birçok bilim adamı doğal kaynaklardan bakteri izolasyonuna gitmekte ve böylece yeni türlerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır.

Proteaz enzimi, dünya çapında kullanım alanı açısından büyük bir potansiyele sahip olup, çoğunlukla mikroorganizmalardan ve özellikle de *Bacillus* cinsinden elde edilmektedir. Belirli bir mikroorganizma tipi, aynı enzimi farklı ortamlarda farklı oranlarda üretebilmektedir. Bu nedenle, enzim üretim ortamı değiştirilerek, enzim üretim kapasitesinin artırılması yoluna gidilmesi, yüksek enzim üretimi için alternatif bir yoldur.

Yapılan çalışmada Türkiye topraklarından proteaz üreten toplam 54 adet bakteri izole edilmiştir. Bu türlerin toplam proteaz aktivitelerine göre elenmesi işleminde ilk olarak katı besiyerleri denenmiştir. Kazeinli ve skimmed milk agarlı ortamlarda yapılan çalışmalarda en iyi proteaz pozitiflik tespitini gösteren zon oluşumu, skimmed milkli agarlı ortamdan elde edilmiştir. Carlisle ve Falkinham (1989), skimmed milkli, agarlı plaklara *Bacillus* sp. kültürlerini 'damlatma' ve 'sürme' yöntemleriyle ekip, koloni etrafında oluşan zonları milimetrik olarak ölçüp grafiklerken, Nadeem ve ark. (2008) topraktan izole ettikleri *Bacillus* cinsi bakterileri skimmed milk içeren agarlı plaklara 'yayma' metodu ile ekerek, 37°C' de 18 saat inkübasyona bırakmış ve oluşan zon çaplarına göre, bakterilerin proteaz aktivitesi miktarını belirlemişlerdir. Çalışmamızda ise, bakterilerin toplam proteaz enzimi varlığını belirlerken, skimmed milk içeren agarlı ortamda 'yayma' metodu kullanılmış ve 18 saat 37°C' de inkübasyon sonucu oluşan zonlar cetvelle ölçülerek, en yüksek proteaz pozitif özelliğe sahip olan 6 adet bakteri seçilmiştir.

Bu bakterilerin, *Bacillus* cinsi olup olmadığını belirlemek üzere yapılan çalışmalarda 6 bakterinin de *Bacillus*'un karakteristik özelliklerini gösterdiği, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'e (Buchanan ve Gibbons 1974) göre yapılan morfolojik ve biyokimyasal testler sonucunda tespit edilmiştir. Sıvı besiyerinde yapılan enzimatik ölçümlerde, bu 6 bakteriden en yüksek proteaz

aktivitesine sahip olan 1 adet bakteri seçilmiş ve Bilecik toprağından izole ettiğimiz bu bakteri *Bacillus* sp. N-40 olarak adlandırılmıştır.

Keay ve ark. (1972) ve Manachini ve ark. (1988) *Bacillus* sp. proteazlarının genellikle bakterilerin logaritmik gelişme evresinden sonra maksimum verime ulaştığını bildirmişlerdir. *Bacillus* sp. N-40'ın üreme eğrisine bakıldığında ise, benzer olarak, bakterinin logaritmik fazın sonlarına doğru, üremeye paralel olarak 64. saatte maksimum enzim sentezine ulaştığı görülmüştür.

Üretim ortamının içeriğı proteaz üretimini arttırıcı bir etkiye sahiptir (Shaheen ve ark. 2008). Bu amaçla yeni izole ettiğimiz *Bacillus* sp. N-40 bakterisinin proteaz üretim kapasitesini arttırmak için üretim ortamında farklı karbon, azot ve metal iyonları kaynakları denenmiş ve elde edilen sonuçlara göre yeni bir modifiye ortam tasarlanmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmada fruktozlu ortamın, kullanılan diğer karbon kaynaklarına göre enzim üretiminde en iyi karbon kaynağı olduğu ve %24'lük bir verim artışı sağladığı belirlenmiştir. Fruktozu %18 ile sükroz ve %8 ile maltoz takip etmiştir. En düşük aktivite ise %61.6'lık verim kaybı ile gliserollü ortamda gözlenmiştir.

Banna (2006) elde ettiğimiz sonuca benzer olarak, *Bacillus* sp.'nin proteaz üretimi üzerine etkili olan karbon kaynaklarından en yüksek aktiviteyi %10 verimle fruktozun sağladığını belirtirken, Sati ve Bist (2006), farklı bir mikroorganizma kaynağında, *Tetracladium marchalianum'* un üretim ortamında çeşitli karbon kaynaklarının etkilerine bakmışlar ve en yüksek aktiviteyi %39'luk verimle fruktozun sağladığını belirtirken, sükrozun ikinci en yüksek proteaz aktivitesini sağladığını ve verimin %7 olduğunu saptamışlardır.

Ashnaei ve ark. (2007), *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas fluorescens'* in enzim üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisine bakmışlar ve en yüksek aktiviteyi, her iki mikroorganizma üzerinde de yeast extract ile birlikte sükroz varlığında aldıklarını bildirirken, Ahmed ve ark. (2008), *Streptomyces avermectinus* NRRL B-8165'un proteaz üretimi üzerine en yüksek aktiviteyi, üretim ortamında %7 oranında sükroz varlığında elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Puri ve ark. (2002), alkalen proteaz üreten bir *Bacillus* sp. üzerine, içerisinde glikoz da bulunan çeşitli karbon kaynaklarının etkisini incelemiş ve en yüksek aktiviteyi nişastanın varlığında sağlamışlardır. Benzer olarak Nascimento ve ark. (2004) ve Falahatpishe ve ark. (2007), topraktan izole ettikleri *Bacillus* sp.'ler üzerine yaptıkları incelemede en yüksek proteaz aktivitesini nişasta varlığında elde etmişlerdir. Yüksekdağ ve ark. (2004), *B. subtilis* ve *B. megaterium* üzerinde yaptıkları araştırmada ise, en yüksek proteaz aktivitesi sağlayan karbonun glikoz olduğunu belirtirken, Safey ve Abdul (2004), *B. subtilis* ile yaptığı çalışmada, en yüksek proteaz eldesini laktoz varlığında, Fincan ve Okumuş (2007), yine *Bacillus* sp. üzerine yaptıkları çalışmada, en yüksek proteaz eldesini nişasta ve galaktoz varlığında elde etmişlerdir.

Buradan anlaşıldığı gibi karbon kaynaklarının proteaz üretimine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda kullanılan mikroorganizma çeşidi ve karbon kaynağının, maksimum enzim üretimine çok büyük etkileri bulunmaktadır. Bu yargıyı destekleyen başka araştırmalar da bulunmakta olup, örneğin Jamuna ve Ramakrishna (1992) tarafından yapılan bir araştırmada, sükroz kullanılması halinde nişasta ve glukoz oranla daha fazla enzim oluşumu saptanırken, Nadeem ve ark. (2008)'nin alkalen proteaz üreten bir *B. licheniformis* üzerine yaptıkları araştırmada, en yüksek proteaz aktivitesinin nişasta varlığında olduğu tespit edilmiştir. Naidu ve Devi (2005)'nin araştırmalarına göre ise *Bacillus* cinsinde proteaz üretiminde en uygun karbon kaynaklarının laktoz, nişasta ve sükroz olduğu saptanmıştır.

Karbon kaynakları ile yapılan çalışmalardan farklı sonuçların elde edilmesi, kullanılan mikroorganizma çeşidine, karbon kaynaklarına ve ortamdaki diğer bileşenlerin etkileşimlerine bağlı olarak değişmektedir. Dolayısıyla bu da göstermektedir ki, mikroorganizmaların kullandığı metabolik yollar farklı olabilmektedir.

Azot kaynaklarının bakteri üremesi ve enzim üretimi üzerine olan etkilerini araştırmak üzere yapılan çalışmada organik azot kaynakları içerisinde en yüksek verim %43 ile skimmed milk ile sağlanırken, kazeinin de enzim aktivitesini arttırdığı görülmüştür. İnorganik azot kaynaklarının varlığında ise, proteaz üretiminin yok denecek kadar az olduğu belirlenmiştir. Organik azot kaynaklarının, inorganik azot kaynaklarına nazaran daha etkili olduğu ifade

edilmiştir (Shaheen ve ark. 2008). Benzer sonuçlar diğer bilim adamları tarafından da ifade edilmiştir. Bunlardan Ward (1985b), *Flavobacterium pectinovorum* üzerine yaptıkları araştırmada en yüksek aktiviteyi skimmed milk varlığında olduğunu saptamışlardır. Ferrero ve ark. (1996), *Bacillus licheniformis* üzerine yaptıkları araştırmada, kazeinin enzim üretiminde uyarıcı etkisi olduğunu ve kazeinin bakteri tarafından hem azot hem de karbon kaynağı olarak kullanılabileceğini saptarken, Joo ve ark. (2002) *Bacillus horikoshii*'nin alkalen proteaz üretimini en çok soya unu ve kazeinin arttırdığını bildirirken, Shaheen ve ark. (2008) da, *Bacillus subtilis* üzerinde yaptığı proteaz üretiminin artırılması çalışmalarında, aynı şekilde kazein ve soya unu varlığında yüksek aktivite elde ettiğini belirtmişlerdir. Ahmed ve ark. (2008), alkalen proteaz üreten bir *Streptomyces avermectinus* ile yaptıkları araştırmada, enzim üretimini arttıran azot kaynağının soya ve buğday unu olduğunu saptarlarken, çalışmamızda soya ununun proteaz üretiminde %37 oranında aktivite kaybına neden olduğu bulunmuştur.

Gabdrakhmanova ve ark. (1999) *B. intermedius* için, Kembhavi ve ark. (1993) ise sıcak su kaynaklarından izole ettikleri *B. subtilis* için, en yüksek proteaz aktivitesi sağlayan azot kaynağının pepton olduğunu belirtmişlerdir.

Falahatpishe ve ark. (2007), *Bacillus* sp.'nin proteaz üretimine en büyük katkısı yeast extract ve çeşitli aminoasitlerin sağladığını belirtirken, Safey ve Abdul (2004), *Bacillus subtilis*'ten proteaz üretiminde valin aminoasidinin en iyi sonucu verdiğini belirtmişlerdir.

Nascimento ve Martins (2004) *Bacillus* sp.'nin proteaz üretiminde en etkili inorganik azot kaynağının amonyum nitrat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>) olduğu belirtilirken, Safey ve Abdul (2004), en yüksek proteaz aktivitesini amonyum sülfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) varlığında elde etmişlerdir. Çalışmamızda ise inorganik azot kaynağı olarak potasyum nitrat ile amonyum sülfat (KNO<sub>3</sub> , (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) kullanılmış olup, potasyum ve amonyum tuzları varlığında enzim üretiminde azalma gözlenmiştir. Yaptığımız çalışmada inorganik azot kaynakları varlığında proteaz üretiminin fazla olmamasının nedeni, besiyortamında bulunan diğer bileşenlerle amonyum tuzlarının negatif etkileşime girdiği düşünülebilir. Ayrıca, bu durum bakterinin ortamdaki amonyumdan faydalanma yeteneğinin olmadığını göstermektedir. Böyle bir sonuç Shaheen ve ark. (2008) tarafından da ifade edilmiştir. Tüm bu

sonuçlara göre, amonyuma spesifik represyon mekanizmasının karmaşık bir yapısı olduğu ifade edilmektedir (Shaheen ve ark. 2008). Bu sonuçlar bakteri süşunun farklı azot kaynakları varlığında, farklı enzim üretim kapasitelerine sahip olduklarını göstermiştir.

Metal iyonlarının bakteri gelişimi ve enzim üretimi üzerine etkisini araştırmak üzere yapılan çalışmalarda çeşitli metal iyonlarının kombinasyonları kullanılmış ve metal iyonlarından  $Mg^{+2}+Ca^{+2}$  kombinasyonu varlığında en yüksek enzim üretimi sağlanmıştır. En düşük enzim aktivitesi ise ortamda  $Cu^{+2}$  iyonları varlığında belirlenmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara benzer olarak Gabdrakhmanova ve ark. (1999), *Bacillus intermedius* üzerine yaptıkları çalışmalarda en yüksek enzim üretimini sağlayan iyonların  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  ve  $Co^{+2}$  olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca Qadar ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada ortama eklenen metal iyonlarından enzim üretimi üzerine en etkili olanın  $Ca^{+2}$  olduğunu saptamışlardır. Fincan ve Okumuş (2007) ise *Bacillus* sp.'den proteaz eldesi çalışmalarında en yüksek aktiviteyi  $Ca^{+2}$ ,  $Ba^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  varlığında elde etmişler, ancak çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçtan farklı olarak  $Cu^{+2}$ 'in enzim aktivitesini fazla etkilemediğini, asıl inhibitör etkiyi  $Hg^{+2}$ 'nin sağladığını bildirmişlerdir.

Shafee ve ark. (2005) *Bacillus cereus* ile yaptıkları bir çalışmada, proteaz üretimine etki eden en önemli iyonu mangan ( $Mn^{+2}$ ) olarak belirlerken, benzer olarak Coolbear ve ark. (1992) termofilik bir *Bacillus* türünde en yüksek proteaz aktivitesi sağlayan metal iyonunun  $Mn^{+2}$  olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda ise  $Mn^{+2}$ , enzim üretim miktarını arttırmada kalsiyum ve magnezyumdan sonra 3. sırada bulunmaktadır.

Birçok araştırmacı, proteaz enzimi üretimi üzerine yaptıkları çalışmalarda en düşük enzim aktivitesini  $Cu^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Ag^{+2}$ ,  $K^{+1}$  ve  $Zn^{+2}$  iyonları varlığında elde etmişlerdir (Dahot 1994, Nascimento ve Martins 2004, Vidyasagar ve ark. 2009).

Metal iyonlarının kombine halde değil de tek başlarına üretim ortamına katıldıklarında, enzim aktivitesi üzerine olan etkilerini belirlemek amacıyla, çalışmamızda sadece  $Ca^{+2}$  ve sadece  $Mg^{+2}$  bulunan ortamlarda ayrı ayrı proteaz

aktivitesi tayinleri yapılmış ve sadece  $Ca^{+2}$  bulunan ortamda  $Mg^{+2}$  a göre %87 oranında daha yüksek bir enzim aktivitesi sağlanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre  $Ca^{+2}$ 'un enzim üretimi üzerinde büyük bir etkisinin olduğu belirlenmiştir. Bu bulguyu destekleyen bazı çalışmalara göre, Moravcová ve Chaloupka (1989) *B. megaterium*'da proteaz oluşumuna kültür ortamına eklenen  $Ca^{+2}$ 'un neden olduğu, dolayısıyla  $Ca^{+2}$ 'un bakteri duvarında yer aldığı ve hücre duvarındaki kalsiyumun bakterinin metabolizması ve fizyolojisinde önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Ayrıca Doyle ve ark. (1980) yaptıkları çalışmalarda bakteri hücre duvarının yapısında bulunan peptidoglukan ve teikoik asit yapısına giren kalsiyum iyonlarının, bakteri üremesinde artış sağladığını bildirmişlerdir.

Tüm bunlar göstermektedir ki, bakterilerin proteaz oluşturması için kültür ortamında bir veya birkaç etkili metal iyonunun mutlaka bulunması gerekmektedir. Buna göre, hem enzim aktivitesi hem de enzimin stabilizasyonu için, ortamda etkili bir veya birden fazla metal iyonunun bulunması gerekmektedir (Manning ve ark. 1961).

Çalışmamızda en yüksek enzim üretiminin gözlemlendiği C, N ve metal kaynakları kullanılarak modifiye edilen ortamda *Bacillus* sp. N-40 suşu enzim üretimi açısından değerlendirilmiş olup, proteaz enziminin aktivitesi 338 U/mL olarak bulunmuştur. Modifiye ortamda yapılan enzim üretiminde, kontrole göre % 51 oranında bir verim sağlanmıştır.

Çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz ve yüksek verim sağladığımız modifiye ortamda üretilen enzimin üzerine sıcaklık ve termostabilite, pH ve pH stabilitesi ile çeşitli metal iyonlarının etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *Bacillus* sp. N-40 bakterisinin ürettiği proteaz enzimi için optimum sıcaklık değeri 55°C, optimum pH değeri ise 7.0 olarak saptanmıştır. Diğer yandan, enzimin alkali pH değerlerinde aktifliğini koruması sebebiyle, enzim alkalofilik bir enzim olarak belirlenmiştir. Enzimin geniş bir sıcaklık ve pH aralığında aktivite göstermiş olup, 55°C'de 3 saat inkübasyonu sonucunda, aktivitesinin %100'ünü koruduğu belirlenmiştir. Ayrıca, enzimin 80°C'de aktif olması enzimin termostabil karakterde olduğunu göstermiştir.



Yossan ve ark. (2006), bir *Bacillus* üzerine yaptıkları incelemelerde, bakterinin optimum pH değerinin 10, sıcaklık değerinin ise 45°C olduğunu belirtirken, Qadar ve ark. (2009), bir *Bacillus* sp.'den elde ettikleri proteazın maksimum aktiviteyi pH 7.0 ve 35°C'de gösterdiğini saptamışlardır.

Shaheen ve ark. (2008), çalıştıkları *Bacillus subtilis* proteazının pH 11 ve 50°C'de maksimum aktiviteye sahip iken, yine bir *Bacillus subtilis* ile çalışan Safey ve ark. (2004), elde ettikleri proteazın pH 7.0'de ve 40°C'de aktif olduğunu bildirmektedirler.

Naidu ve Devi (2005), *Bacillus*'tan elde edilen proteazın pH 9.0 ve 55°C'de aktif olduğunu, Joo ve ark. (2002), *Bacillus horikoshii*'den üretilen proteazın pH 9.0 ve 50°C'de maksimum aktivite gösterdiğini, Jasvir ve ark. (1999), *Bacillus* sp.'den elde ettikleri proteazın pH 11.0 ve 60°C'de aktif olduğunu, Mehrotra ve ark. (1999) ise, yine bir *Bacillus* proteazının optimum pH değerinin 10.5 ve optimum sıcaklık değerinin 40°C olduğunu rapor etmişlerdir.

Görüldüğü gibi literatürde *Bacillus* türlerinden elde edilen proteazlar ile ilgili çok çeşitli sonuçlar bildirilmektedir ve bu da bize *Bacillus* türlerinin çok çeşitli özelliklerde proteazlara sahip olduklarını göstermektedir.

pH değişimleri enzimlerin konformasyonunda değişikliğe yol açmaktadır, çünkü enzimler farklı pH'larda değişik iyonik gruplar oluştururlar (Cheetham 1995). Bu da bize, farklı pH'larda enzim aktivitesinin neden büyük değişiklikler gösterdiğini açıklamaktadır (Sarkar ve ark. 1998). Mao ve ark. (1992) ise enzim üretiminin sıcaklık ve pH değerleri ile belirlenip, kontrol edilebileceğini saptamışlardır.

Tarafımızdan modifiye edilen ortamda üretilen proteaz enziminin karakterize edilmesi amacıyla, kaba proteaz enzimi üzerine  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ve  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  metal tuzlarının etkilerine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre enzim en yüksek aktiviteyi  $\text{Mn}^{+2}$  varlığında göstermektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuca benzer olarak Griffin ve Fogarty (1973)'nin *Bacillus polymyxa*'dan elde ettikleri proteaz enzimi üzerine çeşitli metal iyonlarının etkilerine baktıklarında, en yüksek aktiviteyi manganın sağladığını görmüşler ve aktif merkezlerinde  $Mn^{+2}$  bulunan metallo enzimlerin yüksek sıcaklık ve pH'larda aktivite gösterdiklerini belirtmişlerdir. Akrigg (1978),  $Mn^{+2}$ 'in özellikle *Bacillus* cinsinin sporulasyon mekanizmalarında etkili olduğunu bildirmektedir.

Adinaraya ve ark. (2005), *Bacillus subtilis*'ten, Yossan ve ark. (2006) *Bacillus megaterium*'dan, Nascimento ve Martins (2004) ise *Bacillus* sp.'den elde ettikleri proteazın  $Mn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ , ve  $Mg^{+2}$  varlığında yüksek aktivite gösterdiğini belirtirken, Seifzadeh et al. (2008) kalsiyumun *Bacillus* sp.'den elde ettikleri proteaz enziminin aktivitesi üzerine etkisinin olmadığını rapor etmiştir.

Çalışmamızda, kaba proteazın aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi olan metal iyonunun  $Zn^{+2}$  olduğu belirlenmiş ve genellikle inhibitör olarak belirtilen  $Cu^{+2}$  iyonunun enzim üzerine inhibitör etkisinin olmadığı görülmüştür. Benzer olarak Vidyasagar ve ark. (2009), *Chromohalobacter*'den elde ettikleri proteaz enziminin  $Zn^{+2}$  varlığında inhibe olduğunu bildirirken, Fincan ve Okumuş (2007), *Bacillus* sp.'den elde ettikleri enzimin  $Cu^{+2}$  varlığında aktivitesini kaybetmediğini, ancak  $Hg^{+2}$  varlığında inhibe olduğunu belirtmektedirler.

Yaptığımız çalışmada, *Bacillus* sp. N-40'ın modifiye ortamda ürettiği ve kısmi olarak saflaştırdığımız proteaz enziminin moleküler ağırlığı 52 kDa olarak saptanmıştır.

Çeşitli araştırmacıların yaptığı çalışmalarda, farklı moleküler ağırlıklara sahip *Bacillus* proteazları görülebilmektedir. Yossan ve ark. (2006), *Bacillus megaterium*'dan izole ettikleri alkalin proteazın moleküler ağırlığını 27 kDa bulurken, Seifzadeh ve ark. (2008) *Bacillus* sp.'den saflaştırdıkları proteazın molekül ağırlığını 47 kDa, Falahatpishve ve ark. (2007) ise yine bir *Bacillus* sp. proteazının molekül ağırlığını 24.7 kDa olarak saptamışlardır.

Ayrıca Moon et al. (1994) *Bacillus subtilis*'ten saflaştırdıkları alkalin proteazın molekül ağırlığını 28 kDa olarak belirlerken, Banik ve Prakash (2004) *Bacillus*

*cereus*'tan saflaştırdıkları proteaz enziminin de molekül ağırlığının 28 kDa olduğunu bildirmişlerdir. Öztürk ve ark. (2009) Van Gölü'nden izole ettikleri ve *Bacillus licheniformis* BA17 olarak adlandırdıkları bakteriden saflaştırdıkları alkalin proteazın moleküler ağırlığını 19.7 kDa olarak belirlemişlerdir.

Görüldüğü gibi, proteazları moleküler ağırlıkları açısından genellemek oldukça zor olmaktadır. Aynı türün farklı varyeteleri içerisinde, farklı molekül ağırlığına sahip proteazlar olabildiği gibi, farklı türlerde aynı molekül ağırlığına sahip proteazlar da saptanmıştır.

Sonuç olarak, kendi kaynaklarımızdan izole edip *Bacillus* sp. N-40 olarak isimlendirdiğimiz bakteriden yüksek verimde enzim üretimi sağlanmış olup, enzim karakterize edilmiştir. Bu enzimin sıcaklık ve pH stabilitesinin yüksek olduğu belirlendiğinden, enzimin çeşitli endüstriyel alanlarda kullanım olanakları bulacağı ve böylece dış ülkelere satın alınan proteaz enziminin ülkemizde geniş çapta üretilmesi ve böylece ülke ekonomisine katkıda bulunulması mümkün olabilecektir. Ayrıca, bu mikroorganizmanın insan sağlığına etkilerinin araştırılması ile *Bacillus* sp. N-40'ın GRAS (Generally recognized as safe) mikroorganizma olduğu saptanırsa, elde edilen proteazın gıda sanayisinde de kullanılması önem kazanacaktır.

**KAYNAKLAR**

ADINARAYA, K., J., BEZAWADA, E., POLURI, 2005. Production of alkaline protease with immobilized cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in various matrices by entrapment technique. AAPS Pharm. Sci. Tech. P: 25- 28.

AEHLE, W., 2004. Enzymes in Industry Production and Applications, Wiley-VCH, Weinheim. 28:335- 340.

AFŞAR, A., 2008, A Research on Increasing The Effectiveness Of Degreasing Process By Using Enzymes. Microbiol. Res. P: 45-53.

AHMED, S., RAMADAN, A., M.A. EI-SHAYEB, A. SALEH, 2008. Optimization, Immobilization of Extracellular Alkaline Protease and Characterization of its Enzymatic Properties. Microbiol. Res. P:25-30.

AKRIGG, A., 1978. Purification and properties of a manganese-stimulated deoxyribonuclease produced during sporulation of *Bacillus subtilis*. Biochemical Journal 172, P:69-76.

ANWAR, A., M., SALEEMUDDIN, 1997. Alkaline Proteases: A Review, Bioresource Technology, 64:175-183.

ASHNAEİ, P., TEHRANI, S., AHMADZADEH, M., BEHBOUDI, K., 2007. Effect of carbon and nitrogen sources on growth and biological efficacy of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* against *Rhizoctonia solani*, the causal agent of bean damping-off. Commun Agric Appl Biol Sci.72(4):951-6.

AOKI, K., K., MIYAMATO, S., MURAKAMI, R., SHINKE, 1995. "Anaerobic Synthesis of Extracellular Proteases by The Soil Bacterium *Bacillus* sp. AM-23: Purification and Characterization of The Enzymes", Soil Biology and Biochemistry, vol. 27, no. 11, P: 1377-1382.

AUNSTRUP, K., 1973. Industrial production of proteolytic enzymes. B. Spencer (Editor), Industrial aspects of biochemistry. Federation of European Biochemical Societies. 30 (1):23-46.

AYHAN, K. 2000. Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını, Sim Matbaacılık Ltd. Ankara. P:43-44.

BABE, L.M., CRAIK C.S., 1997. Viral Proteases: Evolution of diverse structural motifs to optimize function, Cell, vol. 91, P: 427-430.

BALK, M., 1991. Bazı *Bacillus*ların ekstraselüler proteazlarının özellikleri ve üretim koşullarının optimizasyonu. Yüksek lisans tezi. Ankara, S: 20-25.

BANERJEE, U.C., R.K., SANI, W., AZMI, 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. Process Biochemistry, 35:213-219.

BANIK, R.M., PRAKASH, M. 2004. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*, Microbiol. Res. 159: 135-140.

BANNA, M.N., 2006. Effect of carbon source on the antimicrobial activity of *Corynebacterium kutscheri* and *Corynebacterium*. Microbiol. Res. 159: 48-55.

BANWART, G.J., 1983. Basic Food Microbiology Avi. Publishing Company Inch. P: 118- 120.

BELL , J., 2006. Davies Laboratory, Proteases, NIDDK/NIH. University of Richmond.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Ed., Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, P:559.

BERKELEY, R.C.W, N., LOGAN, 1997. *Bacillus*, *Alicyclobacillus* and *Paenibacillus*. In: Emmerson A.M., Hawkey P.M., Gillespie S.H. (Editors). Principles and practice of Clinical Bacteriology. Chichester: Wiley, 185 p. Biotechnol., 45: 327-332.

BLAKE, C.C., D.F., KOENIG, G.A., MAIG, A.C., MAIG, V.R., SARMA, 1965. Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional fourier synthesis at 2 angstrom resolution. Nature 22 (206): 757-761.

BUCHANAN, R.E., N.E., GIBBONS, 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. (Eighth edition), The Williams and Wilkins Co., Baltimore, P:747-842.

CARLISLE, G.E., J.O., FALKINHAM, 1989. Enzyme activities and antibiotic susceptibility of colonial variants of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. Appl Environ Microbiol., 55(11): 3026-3028.

CHEETHAM, P.S.J. 1995. Principles of industrial biocatalysis and bioprocessing. In: Handbook of Comprehensive Biotechnol., 3:789-818.

COOLBEAR, T., WHITTAKER, J., DANIEL, R. M., 1992. The effect of metal ions on the activity and thermostability of the extracellular proteinase from a thermophilic *Bacillus*, strain EA.1. Biochem. J. 287, 367-374.

ÇELİK, N. 2006, *Bacillus clausii* GMBAE 42' den saflaştırılan Alkalın Proteazın termal inaktivasyon kinetiğinin belirlenmesi ve  $\text{Cu}^{+2}$  iyonları ile termostabilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, KOCAELİ. P: 11-56.

ÇOTUK, A., 2003. Genel mikrobiyoloji laboratuvar yöntemleri. Nobel Tıp Kitabevleri.

D'REAUMUR, RAF.,1752. Observations sur la digestion des oiseaux. Histoire de l'academie royale des sciences. 1752: 266, 461.

DAHOT, M. U., 1994. PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF ALKALINE PROTEASE FROM *PENICILLIUM EXPANSUM*. Journal of Islamic Academy of Sciences 7:2, 100-105.

DALEV, P.G., 1994. Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. Bioresource technology 48 (3): 265-267.

DALEV, P.G., SIMENOVA, L.S., 1992. An enzyme biotechnology for the total utilisation of leather wastes. *Biotech. letters*, 14:531-534.

DESHPANDE, V.V, 2005. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* . *Process Biochemistry* 40: 3152 – 3158.

DİNÇBAŞ, S., 2009. Alginat kapsüllerinde tutuklanan *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase enziminin farklı nişasta kaynaklarını hidrolizleme yeteneğinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, BURSA, S: 6-8.

DOYLE, R. J., MATTHEWS, S., STREIPS, U.N., 1980. Chemical basis for selectivity of metal ions by the *Bacillus subtilis* cell wall. *J Bacteriol.* 143(1): 471–480.

DURAN, K., E., BOZACI, H.A., KARAHAN, 2007. Protein Esaslı Mamüllerin Enzimatik Ön Terbiyesi, Ege Üniversitesi Tekstil Mühendisliği Bölümü. Tekstil ve Konfeksiyon Araştırma Uygulama Merkezi Yayını, P: 17-3.

EDWARDS, D.R, M.M., HANDSLEY, C.J., PENNINGTON, 2008. The ADAM metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* 29 (5): 258–89. *Enzyme biotechnology.* (Ed.): A. Wiseman. Ellis Harwood, U.K., P: 88.

FADİLOĞLU, S., O., ERKMEN, 2004. Gıda sanayinde enzimlerin önemi. Gaziantep Üniversitesi, Bilimsel yayınlar kataloğu. s: 1-16.

FALAHATPISHE, H., MAHMOUD, J., NASER, B., NADIA, M., 2007. Production and purification of a protease from an alkalophilic *Bacillus* sp. 2-5 strain isolated from soil. *IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY*, Vol. 5, No. 2.

FANKHAUSER, D.B., 2007. Fankhauser's Cheese Page. *Enzyme biotechnology*, P:1-25.

FERRERO, M.A., CASTRO, G.R., ABATE, C.M., BAIGORI, M.D., SINGERIZ, F., 1996. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Jour. Of Microbiol.* 35:1-2.

FİNCAN, S., OKUMUŞ, V., 2007. *Citrullus lanatus* L. (Karpuz) ve *Cucumis melo* L. (Kavun) Kabuğu Kullanılarak Katı-Faz Fermentasyon Tekniği (SSF) ile Toprakta İzole Edilen *Bacillus* sp.' den Alkalın Serin Proteaz Eldesi. D.Ü.Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Dergisi 9, 104-114.

GABDRAKHMANOVA, L., INNOKENTII, V., VISHNIAKOV, M., SHARIPOVA, N., BALABAN, S., KOSTROV, I., LESHCHINSKAYA, 1999. Biosynthesis and localization of glutamyl endopeptidase from *Bacillus intermedius*. *Microbios.*, P:97-108.

GARRITY, G.M., 2004. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition, Release 5.0, Springer-Verlag, New York. P:529-531.

GENCKAL, H., TARI, C. 2006. Alkaline protease production from *Bacillus* sp. isolated from natural habitat. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 703-710.

GENÇKAL, H. 2004., Studies on Alkaline Protease Production from *Bacillus* sp. Yüksek Lisans Tezi , İzmir Institute of Technology, P: 26-55.

GESSESE, A. , 1999. Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable  $\alpha$ -amylase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme microbial technology* 25: 433-438.

GRIFFIN, P. J., FOGARTY, W. M., 1973. Production of an amylolytic enzyme by *Bacillus polymyxa* in batch culture. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 23:301-308.

GRIPON, J.C., 2003. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Academic Press, P: 410-406.

GUPTA, R., BEG, Q. K., KHAN, S., CHAUHAN, B., 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbial Biotechnology* 60: 381 -395.

HENNINGSSON, F., P., WOLTERS, H.A., CHAPMAN, G.H., CAUGHEY, G., PEJLER, 2005. Mast cell cathepsins C and S control levels of carboxypeptidase A and the chymase, mouse mast cell protease 5. *Biol Chem*, 384:1527-1531.



- HOFFMANN-OSTENHOF, O. , 1954. Enzymologie , Springer , 13: 25-27.
- HOLT, J.G., N.R. KRIEG, P.H.A. SNEATH, J.T. STALEY, S.T. WILLIAMS. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition. 559 p.
- HORIKOSHI, K., 1996. Alkaliphiles from an industrial point of view. FEMS Microbiology Reviews, P:18-259.
- HORIKOSHI, K., 1999. Enzymes of alkalophilies. In: Microbial Enzyme and isolation, production and characterization. Appl. Microbiol. 12:34-39.
- JAMES, E.B., F.O., DAVID. 1986. Biochemical Engineering Fundamentals. McGraw Hill Book. Company 2nd, P:157-175.
- JAMUNA, R., RAMAKRISHNA, S.V., 1992. Continuous synthesis of thermostable  $\alpha$ -amylase by *Bacillus* cells immobilized in calcium alginate. Enzyme Microbiol. Techn. 14: 36-41.
- JASVIR, S., GILL, N., DEVASAYAM, G., SAHOO, D.K., 1999. Studies on alkaline protease produced by *Bacillus* sp. NG312. Appl Biochem Biotechnol. 76(1):57-63.
- JOO, H. S., C. GANESH, KUMAR, A., GUN-CHUN. P., 2002. Optimization of the production of an extra cellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. Appl Biochem Biotechnol. (2):35-48.
- KALISZ, H.M., 1988. Microbial enzymes. Advances in Biochemical engineering, Biotechnology, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 36:3-61.
- KARMAKAR S.R., 1999. Chemical Technology in The Pretreatment Process of Textiles, Elsevier Science B.V. P:18-24.
- KASAVI, C., 2006. Kovalent bağlanma ve fiziksel adsorbsiyon metodları ile proteaz enziminin immobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, İSTANBUL.
- KEAY, L., S.B., WILDI, 1970. Proteases of the genus *Bacillus*. I. Neutral Proteases. Biotechnology. Bioengn. 12:179-212.

KEAY, L., M.H. MOSELEY, R.G. ANDERSON, R.J. O'CONNOR, B.S. WILDI, 1972. Production and isolation of microbial proteases, B.L. Wingard (Editör) Enzyme Engineering. Biotechnology and Bioengineering Symposium. New York. 3:63-92.

KEMBHAVI, A.A., KULKARNI, A., PANT, A., 1993. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No. 64. Applied Biochemistry and Biotechnology. P:83-92.

KENNY, A.J, 1999. Nomenclature and Classes of Peptidases, In Proteolytic Enzymes Tools and Targets, edited by E.E. Sterchi and W. Stöcker, (Springer-Verlag, Germany, P:1-8.

KHALIL, A. B., H. GHANDI, ANFOKA, H., S., BDOUR, 2003. Isolation of plasmids present in thermophilic strains from hot springs in Jordan. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 19:239-241.

KIRAN, E.Ö., U., ÇÖMLEKÇİOĞLU, N., DOSTBİL, 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, KSU. Journal of Science and Engineering 9(1):12-19.

KONEMAN, E.W., S.D., ALLEN, W.M., JANDA, 1992. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, ed. 4. Philadelphia: JB Lippincott, P:447, 449, 459, 548.

KRAJEWSKA, B., 2003. Application of Chitin and Chitosan Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review, Enzyme and Microbial Technology, 35:126-139.

KUMAR, C.G., H., TAKAGI, 1999. Microbial Alkaline Proteases: From a Bioindustrial Viewpoint , Biotechnology Advances, vol. 17, P: 561-594.

KURDYA, V.A, I.A., SIMONENKO, 1994. Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. Applied Microbiology and Biotechnology, P:41-505.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227:680-685.

LANGMAIER, F., M., MLÁDEK, K., KOLOMAZNÍK, S., SUKOP, 2002. Isolation of elastin and collagen polypeptides from long cattletendons as raw material for the cosmetic industry. CZECH REPUBLIC. P:1-9.

LAXMAN, R.S., SONAWANE, A.P., MORE, S.V., RAO, B.S. RELE, M.V. JOGDAND, V.V., 2005. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* . *Process Biochemistry* 40: 3152 – 3158.

LENETTE, E.H., A. BALOWS, J.W.JR. HAUSLER, J.H. SHADOMY, 1985. *Manual of Clinical Microbiology*. Vol. 4 Amerika. P: 1149.

LOBMANN, R., C., ZEMLIN, M. MOTZKAU, K. RESCHKE, H., LEHNERT, 2005. Proteaz absorban örtü ile tedavi edilmiş diyabetik ayak yaralarında matriks metalloproteinazlar ve büyüme faktörlerinin ekspresyonu. Department of Endocrinology and Metabolism, Published by Magdeburg University Medical School, Germany. P:1-4.

LOGAN N A, TURNBULL P.C.B., 1999. *Bacillus* and recently derived genera. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Editors). *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, P:357-358.

LOWRY, O.H., N.J., ROSEBROUGH, A.C., FORR, R.J. RONDALL, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.*, 193:265-275.

MABROUK, S.S., A.M., HASHEM, A., EL-SHAYEB, M.S., ISMAIL, A.F., , ABDEL-FATTAH, 1998. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresource Technology*, 69:155-159.

MAHLER, R.H., H., CORDES, 1966. *Biological Chemistry*, New York, P: 346- 411.

MANACHINI, P.L.; FORTINA, M.G., 1988. Parini, C. Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thermoruber* a new species of *Bacillus*. *Appl. Microbiol.*, 28: 409-413.

MANNING, G. B., L. L. CAMPBELL, R. J. FOSTER. 1961. Thermostable  $\alpha$ -amylase of *Bacillus stearothermophilus*. II. Physical properties and molecular weight. J. Biol. Chem. 236:2958-2961.

MAO, W., PAN, R., FREDMAN, D., 1992. High production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in a fed-batch fermentation using synthetic medium. J. Indust. Microbiol. 11:1-6.

MAURER, K.H., 2004. Detergent Proteases, El Sevier. Germany, P: 3:25-33.

MEHROTRA, S., P.K., PANDEY, R., GAUR. N.S., DARMWAL, 1999. The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. Bioresour Technol, P:67:201-3.

MOON, S. Y., OH, T. K., RHO, H. M., 1994. Purification and characterization of an extracellular alkaline protease from *B. subtilis* RM615. Korean Biotech. J. 27: 323-329.

MORAVCOVA, J., CHALOUPKA, J., 1989. Characteristics of intracellular proteolytic activities of *Bacillus megaterium* Biomedical and Life Sciences 35: 402-412.

MUKHTAR, H., HAQ, I., 2008. Production of alkaline protease by *Bacillus subtilis* and its application as a depilating agent in leather processing. Institute of Industrial Biotechnology, G.C. University, Lahore 54000, Pakistan

NADEEM, M., QAZI, J.I., BAIG, S., SYED, Q., 2008. Effect of Medium Composition on Commercially Important Alkaline Protease Production by *Bacillus licheniformis* N-246 (4) 388-394.

NAIDU, K. S. B., DEVI, K.L., 2005. Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. African Journal of Biotechnology Vol. 4 (7), P:724-726.

NASCIMENTO, A.C.W., MARTINS, L. L. M., 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. Brazilian Journal of Microbiology. 35:91-96

NELSON, D., M.M., COX, 2005. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri , N. KILIÇ (Editör), 3. Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık, Sayfa: 243-290.

NEURATH, H., 1999. Proteolytic enzymes, past and future. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, P:96:10962-10963.

NOVEL, J.J., W.J., NICKERSON, R.S., ROBINSON, 1963. Screening for a new *Streptomyces* strain capable of efficient keratin degradation Biochim. Acta, P:77,73.

ONAT, T., K. EMERK, 1997. Temel Biyokimya, Saray Medikal Yayıncılık, (2.Baskı), İzmir.

ORHAN, E., 2003. *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* Bakterilerinden Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, P: 24-38.

OTTRUP, H., S.T., JORGENSEN, 2002. The importance of *Bacillus* species in the production of industrial enzymes. In: Berkley, R. ( Ed.) Applications and systems of *Bacillus* and Relatives. Blackwell Science, Malden, Mass. P: 206-208.

ÖZKAYA-DURLU, F., 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Armoni Matbaacılık Ltd. Şti. Ankara. 358 p.

ÖZTÜRK, M.H., 2004. Partial Purification and Characterization of Alkaline Proteases from Isolated *Bacillus* Strains, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

ÖZTÜRK, S., MORGAN, M., DILGIMEN, A. S., DENİZCI, A., ARIKAN, B., 2009. Alkaline serine protease from halotolerant *Bacillus licheniformis* BA17. Annals of Microbiology, 59: 83-90.

POLAINA, J., A.P., MACCABE, 2007. Industrial Enzymes: Structure, Function And Application, Springer Netherlands. P: 747 -842.

PRIEST, F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol, Rev.* 41 (3), P:711-753.

PURI, S., BEG, Q.K., GUPTA,R., 2001. Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. *Cur Microbiol* 44: 286-290.

QADAR, S. A., SHIREEN, E., IQBAL, S., ANWAR, A., 2009. Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG 2 isolated from an industrial effluent. *Indian Journal of Biotechnology*. Vol:8, P:286-290.

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*, vol 62, P: 597-635.

RÖHM, O., 1908. Preparation of hides for the manufacture of leather. U.S. Patent P:886,411.

SAFEY, E. M., ABDUL, U. M., 2004. Production ,Purification, Characterization of Protease Enzyme from *Bacillus subtilis*. *International Conferences For Development And The Environment In The Arab World*, Assiut Univ., P:23-25.

SANGEETHAA, R., PHIL, M., 2008. Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG 2 isolated from an industrial effluent. *The Internet Journal of Microbiology*, (5)-2.

SARIKAYA, E. 1995.  $\alpha$ -amilaz Üreten Bazı *Bacillus* Suşlarının Gelişme Parametreleri, Enzim Özellik ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu. Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı. Ankara Üniversitesi. S: 40-65.

SARKAR, S., B., SREEKANTH, S. KANT, R. BANARJEE, B.C. BHATTACHARYYA, 1998. Production and optimization of microbial lipase. *Bioproc. Engineer.*, 19: 29-32.

SATI, S.C., BIST, S. 2006. Utilization of various carbon sources for the growth of waterborne conidial fungi *Mycologia*, 98 (5). P: 678-681.

SCHALLMEY, M. A.SINGH, O.P. WARD, 2004. Development in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J. Microbiol.* 50:1-17

SCHWIMMER, S., 1981. Source Book of Food Enzymology. AVI, Westport. P:96-118.

SEIFZADEH, S., R.H., SAJEDI, R., SARIRI, Isolation and characterization of thermophilic alkaline proteases resistant to sodium dodecyl sulfate and ethylene diamine tetraacetic acid from *Bacillus* sp. GUS1. *Iranian Journal of Biotechnology*, Vol. 6, No. 4.

SHAFEE, S.N., ARIS, R.N., RAHMAN, M., BASRI, A.B., SALLEH, 2005. Optimization of environmental and nutritional conditions for the production of alkaline protease by a newly isolated bacterium *Bacillus cereus* strain 146. *J Appl Sci Res.*, P:1-8.

SHAHEEN, M., AAMER, A. S., ABDUL, H., FARIHA H., 2008. Influence of culture conditions on production and activity of protease from *Bacillus subtilis*. *Pak. J. Bot.*, 40(5): 2161-2169.

SILVERTHORN, C.F., 2004, Parsons T.L., Biomed, Chromotogr, P:23-27.

SINGH, J., N., BATRA, R.C., SOBTI, 2000. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochemistry.* 36:781-785.

SZECSI, P., C., KOCH, B., FOLTMANN, 1992. Seminal Pepsinogen C is Not Identical With, But is Very Similar to Gastric Pepsinogen , *FEBS Lett*, P:238, 101.

TAKAMINE, J., 1894. Preparing and making taka-koji. U.S.Patent, P:525,820.

TANKSALE, M.A. 2001. Molecular aspects of a fungal alkaline protease, Ph.D. Thesis, University of Pune, India, P:1-209.

TEMİZ, A., 1994. Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri. Ankara. S: 26-120.

TOPAL, Ş., C., PEMBECİ, M., BORÇAKLI, 2000. Türkiye'nin tarımsal mikoflorasının endüstriyel öneme sahip bazı enzimatik aktivitelerinin incelenmesi-I:Amilaz, Proteaz, Lipaz. Turk J. Biol. 24:79-93.

TRAUTWEIN, G. and KUHLMANN, K.P. 1982. immunofluoreszenz, Theorie und Praxis, Hannover, p:52.

UHLIG, H., 1998. Industrial Enzymes and Their Applications, John Wiley & Sons, USA, P: 116-144.

ULUDAG, Y.B., 2000. İmmobilize Glukomilaz ile Maltodekstrinden Glukoz Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli. P: 25-39.

ULUKAYA, E., 2003, Apoptozis Ders Notları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı.

VENUGOPAL, V., M.D., ALUR, D.P., NERKAR, 1989. Solubilization of fish proteins using immobilized microbial cells. Biotechnology and Bioengineering, 3:1098-1103.

VIDYASAGAR, M., PRAKASH, S., MAHAJAN, V., YOGESH, S., 2009. Purification and characterization of an extreme Halothermophilic protease from a halophilic bacterium Chromohalobacter sp. TVSP101. Brazilian Journal of Microbiology 40:12-19.

WARD, O.P, 1985a. "Proteolytic Enzymes" In Comprehensive Biotechnology, Edited by M. Moo-Young, Pergamon Press, Great Britain, P:789-818.

WARD, O.P., 1985b. Proteolytic enzymes. In Comprehensive Biotechnology: M. Moo-Young Editor, Wesport- Connecticut, P:72-74.

WISEMAN, A. , 1987. Hanbook of Enzyme Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The application of Enzymes in Industry : 274 – 373.



YOSSAN, S., REUNGSANG, A., YASUDA, M. 2006. Purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus megaterium* isolated from Thai fish sauce fermentation process. *Science Asia*. 32(4):379-385.

YÜKSEKDAĞ, N., ASLIM, B., BEYATLI, Y., MERCAN, N., 2004. Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus* sp. *African Journal of Biotechnology* Vol. 3 (1), P:63-66.

ZAKARIA, A.Q., 2006. Production and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase by thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *J. Biotechnol* 1:850-857.

ZEMAN, N.W, J.M., MCREA, 1985.  $\alpha$ -Amylase production using a recombinant DNA organism. *Cereal Foods World*, 30 (1):777-780.

<http://www.touregypt.net>, Erişim Tarihi: 2009. Konu: Eski Mısır Medeniyeti'nde şarap ve ekmek yapımı.

[http://merops.sanger.ac.uk/about/about\\_9.htm](http://merops.sanger.ac.uk/about/about_9.htm), Erişim Tarihi: 2005. Konu: Omegapeptidazların etki mekanizmaları hakkında bilgiler.

<http://www.bitkisel-tedavi.com/papaya>, Erişim Tarihi: 2009. Konu: Papaya hakkında bilgiler.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Bromelain>, Erişim Tarihi: 2006. Konu: Bromelain hakkında bilgiler.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Bromelain>, Erişim Tarihi: 2006. Konu: Bromelainin etkili olduğu bazı hastalıklar.

<http://www.piercenet.com>, Erişim Tarihi: 2006. Konu: Fisin'in kullanım alanları.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Pepsin>, Erişim Tarihi: 15 Kasım 2006. Konu: Pepsin enziminin genel özellikleri.

<http://www.microbelibrary.org/microbelibrary/files/>, Erişim Tarihi: 2009. Konu: Gram boyama yapılmış *B. cereus* ve *B. subtilis* kolonilerinin mikroskopik görünümleri.

<http://www.hatam.hacettepe.edu.tr>, Erişim Tarihi: 2009. Konu: Proteaz inhibitörü ilaçlar ve kullanım alanları.

<http://www.nmpdr.org>, Erişim Tarihi: 2009. Konu: Gram (+) ve gram (-) bakterilerin görünümü.

<http://www.slic2.wsu.edu.tr>, Erişim Tarihi: 2009. Konu: Bakteriyal koloni tipleri.

<http://www.answers.com>, Erişim Tarihi: 2009. Konu: Bakterilerde görülen spor tipleri.

<http://www.microbelibrary.org/microbelibrary/files/>, Erişim Tarihi: 2009. Konu: Bakteri boyama yöntemleri.

<http://www.microbelibrary.org/microbelibrary/files/>, Erişim Tarihi: 2009. Konu: Yeni izole edilen mikroorganizma türleri.

**TEŞEKKÜR**

Tez çalışmalarım sırasında her konuda ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, çalışmalarımın tüm aşamalarında beni destekleyerek yönlendiren ve bana her konuda çalışma olanağı veren danışmanım Sayın Doç. Dr. Elif DEMİRKAN' a,

Çalışmamda kullandığım toprak örneklerini getiren bölümümüz öğrencilerine,

Yetersizliklerden dolayı yapamadığımız bazı deneyler için imkan sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi (MAM), Mikroorganizma Biyoteknolojisi Grubu' na, özellikle Prof. Dr. Dilek KAZAN, Dr. Dilek COŞKUNER ÖZTÜRK ve Nurçin ÇELİK ÖZTÜRK' e,

Öğretim hayatım boyunca ve özellikle yüksek lisans çalışmalarım sırasında beni her zaman destekleyen, maddi manevi yardımlarını esirgemeyen sevgili annem Zehra SEVİNÇ ve bir yerlerde beni sevgiyle izlediğini bildiğim babam Saim SEVİNÇ' e,

Tez çalışmalarım boyunca manevi desteğini ve güçlü motivasyonunu sürekli hissettiğim, her zaman yanımda olacağını bildiğim Cihan ÜRÜT' e en içten dileklerle teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

**ÖZGEÇMİŞ**

Nihan SEVİNÇ; 1986 yılında İstanbul'da doğdu. İlköğretimini Gebze Eşref Bey İlköğretim Okulu'nda, ortaöğretim ve liseyi Gebze Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2004 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı ve 2008 yılında mezun oldu. Aynı yıl Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.