

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

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**PROTEAZ ÜRETİCİSİ MİKROORGANİZMALARIN 16S rRNA İLE
MOLEKÜLER TANIMLANMASI VE BU MİKROORGANİZMALARIN
PROTEAZ ENZİMLERİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Karcan IŞIK

HAZİRAN 2017

Biyoloji Anabilim Dalında Karcan IŞIK tarafından hazırlanan **PROTEAZ ÜRETİCİSİ MİKROORGANİZMALARIN 16S rRNA İLE MOLEKÜLER TANIMLANMASI VE BU MİKROORGANİZMALARIN PROTEAZ ENZİMLERİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR** adlı Yüksek Lisans tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN
Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Aysun ERGENE
Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

Üye (Danışman) : Prof. Dr. Aysun ERGENE

Üye :Doç. Dr. Hikmet KATIRCIOĞLU

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

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

PROTEAZ ÜRETİCİSİ MİKROORGANİZMALARIN 16 S rRNA İLE MOLEKÜLER TANIMLANMASI VE BU MİKROORGANİZMALARIN PROTEAZ ENZİMLERİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

IŞIK, Karcan

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi

Danışman: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Haziran 2017, 178 sayfa

Bu çalışmada, proteince zengin olan bir bölgeden alınan toprak örneğindeki proteaz enzimi üreten mikroorganizmalar saflaştırılmış ve bu mikroorganizmaların ürettiği proteaz enzimi ile çalışmalar yapılmıştır. İzole edilen mikroorganizmaların uygun üreme şartları belirlenmiş ve biyokimyasal testleri yapılmıştır. 16S rRNA analizi yapılan mikroorganizmaların 5 tanesi *Bacillus* cinsine ait, 1 mikroorganizma ise *Aeromonas salmonicida* olarak tanımlanmıştır. En uygun enzim üretim şartlarında 82,156 U/mL ile en yüksek enzim aktivitesini gösteren *Aeromonas salmonicida*'dır. Enzim çalışmalarına enzim aktivitesi 60,5 U/mL olan en yüksek 2. aktiviteli ORSK-4 (*Bacillus cereus*) ile devam edilmiştir. Elde edilen proteaz enziminin en uygun çalışma sıcaklığı 27 ile 60 °C arasında, en uygun çalışma pH'sı ise pH: 9.0 olarak belirlenmiştir. Mn^{2+} iyonunun enzim aktivatörü olduğu, benzen ve H_2O_2 'nin enzim aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Enzim EDTA ile % 72,28 oranında inhibe olmuştur. Enzimin moleküler ağırlığı SDS PAGE analizinde 20 ve 30 kDa olarak bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Protease, *Bacillus* sp., üretim şartları, biyokimyasal karakterizasyon, 16S rRNA

ABSTRACT

MOLECULAR IDENTIFICATION OF PROTEASE PRODUCER MICROORGANISMS WITH 16S rRNA AND SOME STUDIES ON PROTEASE

ISIK, Karcan

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Ph. D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Aysun ERGENE

June 2017, 178 pages

In this study, the microorganisms of producing protease enzymes were purified from a soil rich in protein and the protease enzyme produced by these microorganisms has been studied. The optimum growth conditions of isolated microorganisms were determined and biochemical tests were performed. 5 isolates were identified as *Bacillus* species and 1 isolate was identified as *Aeromonas salmonicida* by using 16S RNA gene analyses. *Aeromonas salmonicida* shows the highest enzyme activity with 82,156 U/mL under optimal enzyme production conditions. Enzyme studies continued with ORSK-4 (*Bacillus cereus*) that has the second highest enzyme activity as 60.5 U/mL. The optimum temperature of the obtained protease enzyme was determined to be between 27 and 60 ° C and the optimum pH was 9.0. It is determined that Mn²⁺ ion is the enzyme activator and that the enzyme activity of benzene and H₂O₂ is increased. The enzyme was inhibited 72.28 % with EDTA. The molecular weight of the enzyme has found 20 and 30 kDa by SDS PAGE analysis.

Key words: Protease, *Bacillus* sp., culture conditions, biochemical characterization, 16S rRNA

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması esnasında hiçbir yardımcı esirgemeyen ve bizim gibi genç araştırmacılara büyük destek olan, tüm bilimsel deney imkanlarını sonuna kadar bizlerin hizmetine sunan, danışmam hocam, Sayın Prof. Dr. Aysun ERGENE'ye, tezimin bir çok aşamasında yardımcıyı gördüğüm bana destek olan arkadaşım Fatma Şeyma DUMAN'a, tez örneklerinin toplanmasında ve deney aşamalarında yardımcı olan Tayfun COŐKUN ve Murat ÇAKMAK'a ve son olarak bana her zaman her konuda desteklerini esirgemeyen canım aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
SİMGE VE KISALTMALAR	xviii
1.GİRİŞ	1
1.1. Proteazlar.....	1
1.1.1. Proteazların Sınıflandırılması	3
1.1.1.1. Ekzopeptidazlar.....	4
1.1.1.1.1. Aminopeptidazlar	4
1.1.1.1.2. Karboksipeptidazlar.....	5
1.1.1.2. Endopeptidazlar.....	6
1.1.1.2.1. Serin Proteazlar	6
1.1.1.2.2. Aspartik Proteazlar	8
1.1.1.2.3. Sistein (Tiol) Proteazlar.....	8
1.1.1.2.4. Metalloproteazlar.....	9
1.1.2. Proteazların Kullanım Alanları	10
1.1.2.1. Deterjan Endüstrisi.....	10
1.1.2.2. Deri Sanayi.....	11
1.1.2.3. Kimyasal Endüstri.....	11
1.1.2.4. Tıbbi Kullanımlar.....	12
1.1.2.5. Atık Yönetimi	12
1.1.2.6. Yem ve Gıda Endüstrisi	13
1.1.2.7. Gümüş Geri Kazanımı	13
1.1.2.8. İpek Temizliği	14

1.1.3. Alkali Proteazların Üretimi.....	14
1.1.3.1. Verimin İyileştirilmesi	14
1.1.3.2. Fermantasyon Ortamının Optimizasyonu	15
1.1.3.2.1. Azot Kaynağı.....	16
1.1.3.2.2. Karbon Kaynağı	16
1.1.3.2.3. Metal İyonu İhtiyacı	17
1.1.3.2.4. pH ve Sıcaklık	17
1.1.3.2.5. Havalandırma ve Çalkalama.....	17
1.1.3.3. Büyüme ve Proteaz Üretimi Arasındaki İlişki	18
1.1.4. Alkali Proteazların Saflaştırılması	18
1.1.4.1. Enzimin Geri Alınması	18
1.1.4.2. İzolasyon ve Saflaştırma	19
1.1.4.2.1. Konsantrasyon	19
1.1.4.2.2. Çöktürme	19
1.1.4.2.3. İyon değişim kromatografisi (IEC)	20
1.1.4.2.4. Afinite Kromatografisi	20
1.1.4.2.5. Sulu İki Fazlı Sistemler	20
1.1.5. Proteaz Üretici Mikroorganizmaların Moleküler Tanımlanması.....	21
1.1.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	21
1.1.5.1.1. PZR Optimizasyonu	22
1.1.5.2. ARDRA Yöntemi.....	23
2. MATERYAL VE METOT.....	24
2.1. MATERYAL.....	24
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri	24
2.1.1.1. Proteaz Üreticisi Belirleme Besiyeri (skimmilk'li).....	24
2.1.1.2. N1 Agar Besiyeri	25
2.1.1.3. Proteaz Üretim Besiyeri (Enzim Besiyeri).....	25
2.1.1.4. Nutrient Broth (NB) Besiyeri.....	26
2.1.1.5. Biyokimyasal Testler için Kullanılan Besiyerleri	26
2.1.1.5.1. Dev-Triptofan Broth.....	26
2.1.1.5.2. MR-VP. Broth	26
2.1.1.5.3. Simmons Sitrat Agar	27

2.1.1.5.4. Nişasta Hidroliz Besiyeri.....	28
2.1.1.5.5. Jelatin Hidroliz Besiyeri.....	28
2.1.2. Kullanılan Çözeltiler.....	29
2.1.2.1. Steril % 0.9'luk Serum Fizyolojik.....	29
2.1.2.2. Biyokimyasal Testlerde Kullanılan Çözeltiler.....	29
2.1.2.2.1. Kovacs' Ayıracı.....	29
2.1.2.2.2. Metil Red Ayıracı.....	29
2.1.2.2.3. % 5'lik α -Naftol.....	29
2.1.2.2.4. % 40'luk KOH.....	30
2.1.2.2.5. % 3'lük H ₂ O ₂	30
2.1.2.2.6. % 5'lik Malaşit Yeşili.....	30
2.1.2.3. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar.....	30
2.1.2.3.1. 50 mM (pH:8.0) Tris-EDTA tamponu.....	30
2.1.2.3.2. % 10'luk SDS çözeltisi.....	30
2.1.2.3.3. 5 M NaCl çözeltisi.....	31
2.1.2.3.4. CTAB/NaCl Tamponu.....	31
2.1.2.3.5. Kloroform/İzoamil Alkol Karışımı.....	31
2.1.2.3.6. Kloroform/İzoamil/Fenol Karışımı.....	31
2.1.2.3.7. % 70'luk Etil Alkol.....	31
2.1.2.4. PZR Elektroforez Çözeltilerinin Hazırlanması.....	32
2.1.2.4.1. 10X TBE (Tris-Borik Asit, EDTA) Tamponu.....	32
2.1.2.4.2. 6X Yükleme Tamponu.....	32
2.1.2.4.3. EtBr Çözeltisi.....	32
2.1.2.4.4. % 1'lük Agaroz Jel.....	32
2.1.2.5. Proteaz Aktivitesi Hesaplamada Kullanılan Tampon ve Çözeltiler... 32	
2.1.2.5.1. 50 mM (pH:9.0) Glisin NaOH Tamponu.....	32
2.1.2.5.2. TCA Çözeltisi.....	33
2.1.2.5.3. 0.5 M Na ₂ CO ₃ çözeltisi.....	33
2.1.2.5.4. 50 mM Fosfat Tamponu.....	33
2.1.2.6. Bradford Çözeltisinin Hazırlanması.....	33
2.1.2.7. SDS-PAGE' de kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	33
2.1.2.7.1. Stok % 30'luk Akrilamid-Bisakrilamid Karışımı.....	33
2.1.2.7.2. 1,5 M (pH: 8.8) Tris-HCl tamponu.....	34

2.1.2.7.3. 0,5 M (pH: 6.8) Tris-HCl tamponu	34
2.1.2.7.4. % 10'luk Amonyumperoksidisülfat (APS)	34
2.1.2.7.5. % 10'luk SDS Çözeltisi.....	34
2.1.2.7.6. % 10'luk Ayırma Jeli	34
2.1.2.7.7. % 4'lük Yükleme Jeli	35
2.1.2.7.8. Örnek Yükleme Tamponu	35
2.1.2.7.9. 5X Elektroforez Yürütme Tamponu.....	35
2.1.2.7.10. Tespit (fiksasyon) Çözeltisi.....	35
2.1.2.7.11. Fiksatif Yıkama Çözeltisi.....	36
2.1.2.7.12. Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyası	36
2.1.2.7.13. Boya Giderici Çözelti.....	36
2.2. METOT	37
2.2.1. Toprakta Bakteri İzolasyonu.....	37
2.2.2. İzole Edilen İzolatların En Uygun Üreme Sıcaklığı Ve Üreme pH'sının Belirlenmesi	37
2.2.3. İzole Edilen İzolatların Biyokimyasal Testleri	38
2.2.3.1. İMVeC Testleri	38
2.2.3.2. Nişasta Hidroliz Testi.....	38
2.2.3.3. Jelatin Hidroliz Testi	39
2.2.3.4. Katalaz Testi.....	39
2.2.3.5. Gram Boyama	39
2.2.3.6. Spor Boyama.....	40
2.2.4. İzolatların Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi.....	40
2.2.5. İzole Edilen Mikroorganizmaların 16S rRNA Analizi ile Moleküler Tanımlanması	41
2.2.5.1. DNA İzolasyonu.....	41
2.2.5.2. 16S rRNA Geninin Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemiyle Çoğaltılması.....	42
2.2.5.2.1. PZR Optimizasyonu	43
2.2.5.3. 16S rRNA Sekans Analizi ile Bakterilerin İdentifikasyonu ve Filogenetik Analiz	43
2.2.5.4. Mikroorganizmaların ARDRA Yöntemi ile Birbirinden Ayrılması ..	43
2.2.5.4.1. HaeIII (BsuRI) Restriksiyon Enziminin Kesim Prosedürü	44

2.2.5.4.2. TaqI Restriksiyon Enziminin Kesim Prosedürü	44
2.2.5.4.3. AluI Restriksiyon Enziminin Kesim Prosedürü	45
2.2.6. Mikroorganizmaların Proteaz Enzimi Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi	45
2.2.6.1. Proteaz Aktivitesinin Ölçülmesi	45
2.2.6.2. Tirozin Standart Grafiği	46
2.2.6.3. Enzim Üretimi İçin Optimum Sıcaklık, pH ve Sürenin Belirlenmesi	46
2.2.7. Farklı Üreme Ortamlarının Proteaz Aktivitesine Etkisi.....	47
2.2.7.1. Kullanılan Enzim Besiyeri İçerik Değişikliklerinin Aktiviteye Etkisi	47
2.2.7.2. Organik Bileşik Olarak Sadece Azot Kaynağı Kullanılan Besiyerlerinin Enzim Aktivitesi	47
2.2.7.3. Farklı Karbon Kaynaklarının Proteaz Aktivitesine Etkisi	48
2.2.7.4. Farklı İnorganik Azot Kaynaklarının Proteaz Aktivitesine Etkisi	48
2.2.7.5. Optimize Edilmiş Modifiye Besi Yerinde Enzim Aktivitesi	48
2.2.7.6. Et-Kazein Besi Yerinde Enzim Aktivitesi	49
2.2.8. Rekabetin Proteaz Enzimi Üzerine Etkisi.....	50
2.2.9. Aşılama Miktarının Aktiviteye Etkisi	50
2.2.10. Bazı <i>Bacillus</i> Cinsi Mikroorganizmalar ile İzole Edilen İzolatın Proteaz Aktivitesinin Karşılaştırılması.....	50
2.2.11. Proteaz Enziminin Kararlılığı	50
2.2.11.1. Enzimin Optimum Çalışma Sıcaklığının Saptanması	51
2.2.11.2. Enzimin Optimum Çalışma pH'sının Saptanması	51
2.2.11.3. Enzim Aktivitesine Metal İyonları, Sürfektanlar, İnhibitörler, Deterjan, Organik çözücüler, Oksidan ve Farklı Substratların Etkisi	51
2.2.11.3.1. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi.....	51
2.2.11.3.2. İnhibitörlerin Proteaz Aktivitesine Etkisi.....	52
2.2.11.3.3. Organik Çözücülerin Proteaz Aktivitesine Etkisi	52
2.2.11.3.4. Sürfektanların, Deterjanların ve Oksidanların Proteaz Aktivitesine Etkisi.....	52
2.2.11.3.5. Farklı Substratların Proteaz Aktivitesine Etkisi	53
2.2.12. Bradford Yöntemi ile Protein miktarlarının hesaplanması	53
2.2.12.1. Bradford Standart Grafiği	53

2.2.13. Üretilen Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması	54
2.2.13.1. Amonyum sülfat($(NH_4)_2SO_4$) Çöktürmesi ile Kısmi Saflaştırma	54
2.2.13.2. Diyaliz ile Kısmi Saflaştırma	55
2.2.13.3. DEAE iyon Değiştirici Kromotografi İle Kısmi Saflaştırma	56
2.2.14. SDS-PAGE ile Proteaz Enziminin Moleküler Büyüklüğünün Belirlenmesi	56
3.BULGULAR	58
3.1. Toprakta Bakteri İzolasyonu	58
3.2. İzolatların En Uygun Üreme Sıcaklığının ve pH Değerinin Belirlenmesi	58
3.3. İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları	67
3.4. İzolatların Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi	68
3.5. İzole Edilen Mikroorganizmaların 16S rRNA Analizi İle Moleküler Tanımlanması	71
3.5.1. DNA İzolasyonu	71
3.5.2. 16S rRNA Geninin Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemiyle Çoğaltılması	71
3.5.3. PZR Optimizasyonu	72
3.5.3.1. ORSK-2 İzolatının Bağlanma Sıcaklığı ve Son $MgCl_2$ Konsantrasyonlarının Optimizasyonu	72
3.5.3.2. ORSK-4 İzolatının Bağlanma Sıcaklığı ve Son $MgCl_2$ Konsantrasyonlarının Optimizasyonu	73
3.5.3.3. ORSK-5 İzolatının Bağlanma Sıcaklığı ve Son $MgCl_2$ Konsantrasyonlarının Optimizasyonu	74
3.5.3.4. ORSK-7 İzolatının Bağlanma Sıcaklığı ve Son $MgCl_2$ Konsantrasyonlarının Optimizasyon Sonuçları	75
3.5.3.5. ORSK-9 İzolatının Bağlanma Sıcaklığı ve Son $MgCl_2$ Konsantrasyonlarının Optimizasyon Sonuçları	76
3.5.3.6. ORSK-9 İzolatının Bağlanma Sıcaklığı ve Son $MgCl_2$ Konsantrasyonlarının Optimizasyon Sonuçları	77
3.5.4. İzolatların 16S rRNA Geninin Nükleotit Dizisinin Çıkartılması ile Moleküler Olarak Tanımlanması	78

3.5.4.1. ORSK-2 İzolatının 16S rRNA ile Moleküler Tanımlanması.....	79
3.5.4.2. ORSK-4 İzolatının 16S rRNA ile Moleküler Tanımlanması.....	81
3.5.4.3. ORSK-5 İzolatının 16S rRNA ile Moleküler Tanımlanması.....	83
3.5.4.4. ORSK-7 İzolatının 16S rRNA ile Moleküler Tanımlanması.....	85
3.5.4.5. ORSK-9 İzolatının 16S rRNA ile Moleküler Tanımlanması.....	87
3.5.4.6. ORSK-11 İzolatının 16S rRNA ile Moleküler Tanımlanması.....	89
3.5.5. Mikroorganizmaların ARDRA Yöntemi İle Birbirinden Ayrılması.....	91
3.5.5.1. ORSK-2 (<i>Bacillus mojavensis</i>) İzolatının ARDRA Profili.....	91
3.5.5.2. ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>) İzolatının ARDRA Profili.....	92
3.5.5.3. ORSK-5 (<i>Bacillus licheniformis</i>) İzolatının ARDRA Profili	93
3.5.5.4. ORSK-9 (<i>Bacillus thuringiensis</i>) İzolatının ARDRA Profili	94
3.5.5.5. ORSK-11 (<i>Bacillus toyonensis</i>) İzolatının ARDRA Profili	95
3.5.5.6. <i>B. cereus</i> ATCC 10876'ün Referans ARDRA profili.....	96
3.5.5.7. <i>B. subtilis</i> ATCC 6633'ün Referans ARDRA profili	97
3.5.5.8. İzolatların Farklı Kesim Enzimlerle Kesim Yürütmeleri.....	98
3.5.5.8.1. Alu I Enzimi	98
3.5.5.8.2. Hae III Enzimi	99
3.5.5.8.3. Taq I Enzimi	100
3.6.1. Proteaz Aktivitesinin Ölçülmesi	100
3.6.2. Tirozin Standart Grafiği.....	101
3.6.3. Proteaz Enzimi Üretiminde Kullanılan Besiyeri.....	102_Toc486705362
3.6.4. Optimum Enzim Üretim Sıcaklığının, pH'sının ve Gününün Belirlenmesi	102
3.6.4.1 ORSK-2 (<i>Bacillus mojavensis</i>) İzolatının Optimum Enzim Üretim Şartlarının Belirlenmesi.....	102
3.6.4.2. ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>) İzolatının Optimum Enzim Üretim Şartlarının Belirlenmesi.....	104
3.6.4.3. ORSK-5 (<i>Bacillus licheniformis</i>) İzolatının Optimum Enzim Üretim Şartlarının Belirlenmesi.....	106
3.6.4.4. ORSK-7 (<i>Aeromonas salmonicida</i>) İzolatının Optimum Enzim Üretim Şartlarının Belirlenmesi.....	108
3.6.4.5. ORSK-9 (<i>Bacillus thuringiensis</i>) İzolatının Optimum Enzim Üretim Şartlarının Belirlenmesi.....	110

3.6.4.6. ORSK-11 (<i>Bacillus toyonensis</i>) İzolatının Optimum Enzim Üretim Şartlarının Belirlenmesi.....	112
3.6.5. Farklı Üreme Ortamlarının Proteaz Aktivitesine Etkisi.....	114
3.6.5.1. Kullanılan Enzim Besiyeri İçerik Değişikliklerinin ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>) Enzim Aktivitesine Etkisi	114
3.6.5.2. Organik Bileşik Olarak Sadece Azot Kaynağı Kullanılan Besiyerinin ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>) Enzim Aktivitesine Etkisi.....	116
3.6.5.3. Farklı Karbon Kaynaklarının ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>) Enzim Aktivitesine Etkisi	117
3.6.5.4. Farklı İnorganik Azot Kaynaklarının ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>) Enzim Aktivitesine Etkisi.....	118
3.6.5.5. Optimize Edilmiş Modifiye Besiyerinde ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>) Enzim Aktivitesi.....	119
3.6.5.6. Et-Kazein Besiyerinde ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>) Enzim Aktivitesi	119
3.6.6. Rekabetin Proteaz Enzimi Üzerine Etkisi.....	120
3.6.7. Aşılama Miktarının ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>) Enzim Aktivitesine Etkisi	120
3.6.8. Bazı <i>Bacillus</i> Cinsi Mikroorganizmalar ile İzole Edilen ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>)’un Proteaz Aktivitesinin Karşılaştırılması	121
3.6.9. İzole edilen ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>)’ten Elde Edilen Proteaz Enziminin Kararlılığı	122
3.6.9.1. Enzimin Optimum Çalışma Sıcaklığının Saptanması	122
3.6.9.2. Enzimin Optimum Çalışma pH’sının Saptanması	123
3.6.9.3. Enzim Aktivitesine Metal İyonları, Sürfektanlar, İnhibitörler, Deterjan, Organik Çözücüler, Oksidan ve Farklı Substratların Etkisi	124
3.6.10. Bradford Yöntemi İle Protein Miktarlarının Hesaplanması.....	129
3.6.10.1 Bradford Standart Grafiği	129
3.6.11. ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>)’ten Elde Edilen Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması ve Protein Miktarları	129
3.6.12. SDS PAGE ile Proteaz Enziminin Moleküler Büyüklüğünün Belirlenmesi	132

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	133
KAYNAKÇA	143



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	<u>Sayfa</u>
3.1. İzole edilen mikroorganizmaların biyokimyasal test sonuçları	67
3.2. İzolatların optimizasyon sonuçları	78
3.3. ORSK-2 izolatının uzaklık matriksi.....	80
3.4. ORSK-4 izolatının uzaklık matriksi.....	82
3.5. ORSK-4 izolatının uzaklık matriksi.....	84
3.6. ORSK-7 izolatının uzaklık matriksi.....	86
3.7. ORSK-9 izolatının uzaklık matriksi.....	88
3.8. ORSK-11 izolatının uzaklık matriksi.....	90
3.9. ORSK-2 (<i>Bacillus mojavensis</i>) izolatının optimum enzim üretim şartları	102
3.10. ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>) izolatının optimum enzim aktiviteleri.....	104
3.11. ORSK-5 (<i>Bacillus licheniformis</i>) izolatının optimum enzim üretim şartları ..	106
3.12. ORSK-7 (<i>Aeromonas salmonicida</i>) izolatının optimum enzim üretim şartları	108
3.13. ORSK-9 (<i>Bacillus thuringiensis</i>) izolatının optimum enzim üretim şartları ..	110
3.14. ORSK-11 (<i>Bacillus toyonensis</i>) izolatının optimum enzim üretim şartları	112
3.15. DEAE İyon değıştirici kromatografi sonrası enzim aktivitesi ve protein miktarları ile spesifik aktivite değeri.....	132

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
1.1. Dünya Enzim Pazarı.....	2
1.2. Proteazların sınıflandırılmasına göre kesim noktaları.....	5
3.1. Saflaştırma sonrası proteaz üreticisi mikroorganizmalar	58
3.2. ORSK-2 izolatının en uygun üreme koşullarının belirlenmesi	61
3.3. ORSK-4 izolatının en uygun üreme koşullarının belirlenmesi	62
3.4. ORSK-5 izolatının en uygun üreme koşullarının belirlenmesi	63
3.5. ORSK-7 izolatının en uygun üreme koşullarının belirlenmesi	64
3.6. ORSK-9 izolatının en uygun üreme koşullarının belirlenmesi	65
3.7. ORSK-11 izolatının en uygun üreme koşullarının belirlenmesi	66
3.8. ORSK-2 izolatının üreme eğrisi.....	68
3.9. ORSK-4 izolatının üreme eğrisi.....	68
3.10. ORSK-5 izolatının üreme eğrisi.....	69
3.11. ORSK-7 izolatının üreme eğrisi.....	69
3.12. ORSK-9 izolatının üreme eğrisi.....	70
3.13. ORSK-11 izolatının üreme eğrisi.....	70
3.14. DNA'ların % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüleri.....	71
3.15. ORSK-2 izolatının bağlanma sıcaklığı ve son MgCl ₂ konsantrasyonları	72
3.16. ORSK-4 izolatının bağlanma sıcaklığı ve son MgCl ₂ konsantrasyonları	73
3.17. ORSK-5 izolatının bağlanma sıcaklığı ve son MgCl ₂ konsantrasyonları	74
3.18. ORSK-7 izolatının bağlanma sıcaklığı ve son MgCl ₂ konsantrasyonları	75
3.19. ORSK-9 izolatının bağlanma sıcaklığı ve son MgCl ₂ konsantrasyonları	76
3.20. ORSK-11 izolatının bağlanma sıcaklığı ve son MgCl ₂ konsantrasyonları	77
3.21. ORSK-2 İzolatının Neighbor-Joining metodu ile oluşturulan dendogramı	79

3.22. ORSK-4 İzolatının Neighbor-Joining metodu ile oluşturulan dendogramı	81
3.23. ORSK-5 İzolatının Neighbor-Joining metodu ile oluşturulan dendogramı	83
3.24. ORSK-7 İzolatının Neighbor-Joining metodu ile oluşturulan dendogramı	85
3.25. ORSK-9 İzolatının Neighbor-Joining metodu ile oluşturulan dendogramı	87
3.26. ORSK-11 İzolatının Neighbor-Joining metodu ile oluşturulan dendogramı	89
3.27. ORSK-2 (<i>Bacillus mojavensis</i>) izolatının Alu I, Hae III ve Taq I enzimleriyle kesilmiş ARDRA Profili.....	91
3.28. ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>) izolatının Alu I, Hae III ve Taq I enzimleriyle kesilmiş ARDRA Profili.....	92
3.29. ORSK-5 (<i>Bacillus licheniformis</i>) izolatının Alu I, Hae III ve Taq I enzimleriyle kesilmiş ARDRA Profili.....	93
3.30. ORSK-9 (<i>Bacillus thuringiensis</i>) izolatının Alu I, Hae III ve Taq I enzimleriyle kesilmiş ARDRA Profili.....	94
3.31. ORSK-11 (<i>Bacillus toyonensis</i>) izolatının Alu I, Hae III ve Taq I enzimleriyle kesilmiş ARDRA Profili.....	95
3.32. <i>B. cereus</i> ATCC 10876 suşunun Alu I, Hae III ve Taq I enzimleriyle kesilmiş ARDRA Profili	96
3.33. <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 suşunun Alu I, Hae III ve Taq I enzimleriyle kesilmiş ARDRA Profili	97
3.34. Alu I kesim enziminin referans suşlar ve tüm izolatlardaki ARDRA Profili ...	98
3.35. Hae III kesim enziminin referans suşlar ve tüm izolatlardaki ARDRA Profili	99
3.36. Taq I kesim enziminin referans suşlar ve tüm izolatlardaki ARDRA Profili .	100
3.37. Tirozin Standart Grafiği	101
3.38. ORSK-2 (<i>Bacillus mojavensis</i>) izolatının optimum enzim üretim şartları	103
3.39. ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>) izolatının optimum enzim üretim şartları.....	105
3.40. ORSK-5 (<i>Bacillus licheniformis</i>) izolatının optimum enzim üretim şartları ..	107

3.41. ORSK-7 (<i>Aeromonas salmonicida</i>) izolatının optimum enzim üretim şartları	109
3.42. ORSK-9 (<i>Bacillus thuringiensis</i>) izolatının optimum enzim üretim şartları ..	111
3.43. ORSK-11 (<i>Bacillus toyonensis</i>) izolatının optimum enzim üretim şartları	113
3.44. Organik enzim besiyeri içerik değişikliklerinin ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>) enzim aktivitesine etkisi	114
3.45. İnorganik enzim besiyeri içerik değişikliklerinin ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>) enzim aktivitesine etkisi	115
3.46. Sadece azot kaynağı kullanılan besiyerinin ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>) enzim aktivitesine etkisi	116
3.47. Farklı karbon kaynaklarının ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>) enzim aktivitesine etkisi	117
3.48. Farklı inorganik azot kaynaklarının ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>) enzim aktivitesine etkisi	118
3.49. Optimize edilmiş modifiye besiyerinde ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>) enzim aktivitesi.....	119
3.50. Et-kazein besiyerinde ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>) enzim aktivitesi	119
3.51. Rekabetin proteaz enzimi üzerine etkisi	120
3.52. Aşılama oranının ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>) enzim aktivitesine etkisi	120
3.53. Bazı <i>Bacillus</i> cinsi mikroorganizmalar ile izole edilen ORSK-4 (<i>Bacillus cereus</i>)'un proteaz aktivitesinin karşılaştırılması	121
3.54. Enzimin optimum çalışma sıcaklığının saptanması	122
3.55. Enzimin optimum çalışma pH'sının saptanması.....	123
3.56. +1 ve +3 değerlikli metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi.....	124
3.57. +2 değerlikli metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi.....	125
3.58. İnhibitörlerin enzim aktivitesine etkisi.....	126
3.59. Organik çözücülerin enzim aktivitesine etkisi	127

3.60. Sürfektan, deterjan ve oksidanların enzim aktivitesine etkisi.....	128
3.61. Farklı substratların enzim aktivitesine etkisi.....	128
3.62. Bradford standart grafiği	129
3.63. Amonyum sülfat çöktürme öncesi ve sonrası enzim aktiviteleeri	129
3.64. Amonyum sülfat çöktürme öncesi ve sonrası protein miktarları	130
3.65. DEAE İyon değiştirici kromotografi sonrası enzim aktivitesi ve protein miktarları.....	131
3.66. DEAE İyon değiştirici kromotografi sonrası SDS-PAGE yürütme görüntüsü	132



SİMGE VE KISALTMALAR

ATP: Adenozin 3'-trifosfat

Da: Dalton

kDa: Kilo dalton

DFP: Diisopropyl phosphorofluoridate

°C: Santigrat

PCBM: 4-(Hydroxymercurio)benzoic acid

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

DNA: Deoksiribo Nükleik asit

dNTP: Nükleotit trifosfat

ARDRA: Amplified rDNA (Ribosomal DNA) Restriction Analysis

TEMED: Tetramethylethylenediamine

PMSF: Phenylmethane sulfonyl fluoride

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

atm: Atmosfer basıncı

cm: Santimetre

g: Gram

L: Litre

mL: Mililitre

µL: Mikrolitre

nm: Nanometre

F. Forward (ileri)

R. Reverse (geri)

rpm: rounds per minute

mM: MiliMolar

M: Molar

N: Normal

SDS: Sodyum dodesil sülfat

PAGE: Poli akrilamit jel elektroforezi

ATCC: American Type Culture Collection

DEAE: Diethylaminoethano

1.GİRİŞ

1.1. Proteazlar

Proteazlar (proteinazlar veya peptidazlar) peptit bağlarının hidrolizini katalize eden enzimlerdir. Metabolik ve fizyolojik süreçlerde önemli rol oynarlar, bu yüzden de tüm organizmalarda bulunurlar. Proteaz üreten mikroorganizmaların uzun listesine rağmen, sadece birkaçı, ticari üretim için uygun üreticiler olarak kabul edilir; bunlar genellikle toksik ve patojen olmayan mikroorganizmalardır [1, 2].

Bakteriyel proteazlar çoğunlukla ekstraselülerdir, daha büyük miktarlarda kolayca üretilirler, termostabil ve daha geniş pH aralığında aktiftir. Bu özellikler bakteriyel proteazları daha geniş endüstriyel uygulamalar için en uygun hale getirir [3]. En başından beri bu enzimler *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Bacillus licheniformis*'ten başlayarak Bacillus türleri kullanarak üretilmiştir [4].

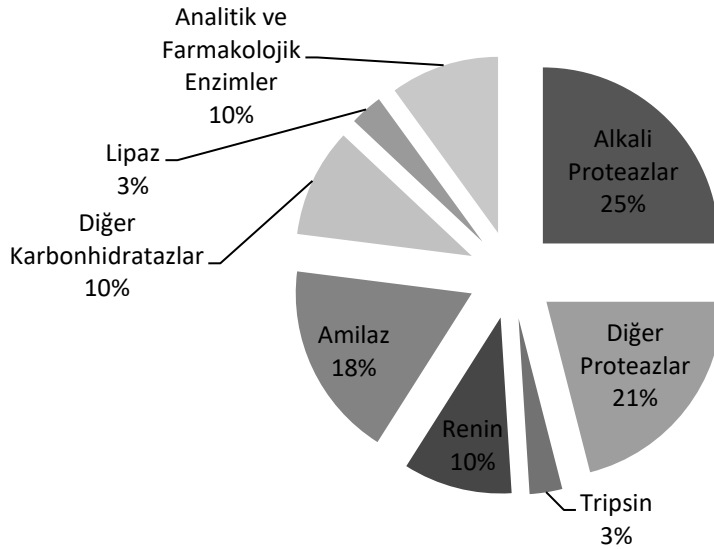
Mikroorganizmalar, belirli fermentasyon yöntemleri ile kısa sürede ve çokça üreyebilirler. Bunun yanında istenilen fermentasyon ürününü de bolca üretirler. Ayrıca, mikrobiyal proteinler daha uzun bir raf ömrüne sahiptir ve önemli bir faaliyet kaybı olmaksızın haftalarca ideal koşullar altında depolanabilir [2].

Mikroorganizmalar, hücre içi ve/veya hücre dışı olan geniş bir proteaz dizisi geliştirirler. Hücre içi proteazlar sporülasyon ve farklılaşma, protein döngüsü, enzimlerin ve hormonların olgunlaşması ve hücre protein havuzunun bakımı gibi çeşitli hücresel ve metabolik süreçler için önemlidir. Hücre dışı proteazlar ise hücre dışı ortamlarda proteinlerin hidrolize edilmesi için önemlidir ve hücrenin hidrolitik ürünleri absorbe ederek kullanmasını sağlar [5]. Hücre içi olarak salgılanan proteazların fizyolojik önemine ek olarak, hücre dışına salgılanan enzimde; çamaşır deterjanları, otomatik bulaşık yıkama, yem katkı maddeleri, gıda hazırlama, deri, teşhis, tedavi ve ilaç endüstrileri gibi endüstriyel enzimatik uygulamalarda çokça kullanılmaktadır [2, 4].

Proteazlar hem fizyolojik hem de ticari alanlarda uygulanmaları bakımından önemli bir konumda bulunan enzimlerin tek sınıfıdır. Analitik tekniklerdeki ilerlemelerle, proteazların sınırlı proteoliz, kan pıhtılaşması ve fibrin pıhtılarının lizisiyle zimojen formdaki enzimlerin aktivasyonu sağlanabilmektedir. Ayrıca proteazlar membranlarda salgı proteinlerin işlenmesi ve taşınması gibi proteinlerin son derece spesifik ve seçici modifikasyonlarını gerçekleştirdiği gösterilmiştir [6].

Proteazların gıda ve deterjan endüstrisinde uzun bir uygulama öyküsü vardır. Halen kullanılan toksik kimyasalların yerini alması için derideki kılın uzaklaştırılması ve katlanması için deri endüstrisindeki uygulamaları nispeten yeni bir gelişmedir. Bu durum proteazların biyoteknolojik önemi arttırmıştır. Proseslerin özgülüğünün aksine, proteazların geniş çeşitliliği, fizyolojik ve biyoteknolojik uygulamalarını kullanmaya yönelik girişimlerde dünya çapında bir ilgi uyandırmıştır [6].

Endüstriyel enzimlerin % 75'i hidrolitiktir. Proteazlar endüstriyel enzimlerin en büyük üç grubundan birini temsil eder ve dünya çapında toplam enzim satışı oranının yaklaşık % 60'ını oluşturur. Endüstriyel enzimlerin dünya çapındaki satışlarının tahmini değeri 1996 yılında 1 milyar doları bulmuştur [6, 7].



Şekil 1.1. Dünya Enzim Pazarı [6]

1.1.1. Proteazların Sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nin Nomenklatur Komitesine göre, proteazlar grup 3'ün alt grup 4'ünde (hidrolazlar) (114a) olarak sınıflandırılır. Bununla birlikte, proteazlar (E.C 3.4), eylem ve yapının çeşitliliği nedeniyle enzim terminolojisinin genel sistemi ile kolayca uymazlar. Şu anda, proteazlar üç ana kritere dayanarak sınıflandırılmıştır;

1. Katalizlenen reaksiyon tipi,
2. Katalitik bölgenin kimyasal yapısı
3. Evrimsel yapı ilişkisi [8].

Proteazlar, etki alanlarına bağlı olarak büyük ölçüde iki ana gruba ayrılmıştır.

Ekzopeptidazlar: Proteinin amino ve ya karboksil ucundaki peptid bağını parçalarlar. Ekzopeptidazlar sadece polipeptit zincirlerinin uç ve uca yakın kısmında etkindir. N veya C terminallerindeki hareket alanlarına göre sırasıyla amino ve karboksipeptidaz olarak sınıflandırılırlar [6].

Endopeptidazlar: Endopeptidazlar, N ve C terminallerinden uzaktaki polipeptid zincirinin iç bölgelerindeki peptid bağlarındaki tercihli eylemi ile karakterize edilir. Serbest amino veya karboksil grubunun varlığı, enzim aktivitesi üzerinde negatif bir etkiye sahiptir. Endopeptidazlar, katalitik mekanizmaları ve fonksiyonel gruplarına göre

1. Serin proteazlar,
2. Aspartik proteazlar,
3. Sistein proteazlar
4. Metalloproteazlar

olarak temelde dört proteaz alt grubuna ayrılmıştır [6, 9].

Amino asit sekanslarına dayanarak, proteazlar farklı ailelere sınıflandırılabilir ve ortak atadan ayrılan peptidaz setlerinin de içerebilmek için "klanlar" olarak daha da bölünmüştür. Her bir peptidaz ailesine serin proteazlar için S, sistein proteazlar için C, aspartik proteazlar için A, metallo proteazlar için M ve bilinmeyen tüm proteaz türleri için M 'yi belirten bir kod harfi verilmiştir [10, 11].

Standart sınıflandırmaya tam olarak uymayan birkaç çeşitli proteazlar vardır, örnek olarak aktivite için ATP'ye ihtiyaç duyan ATP'ye bağımlı proteazlar verilebilir [12].

1.1.1.1. Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar sadece polipeptit zincirinin uç kısımlarında etkindir. N veya C terminallerindeki hareket alanlarına göre aminopeptidazlar ve karboksipeptidazlar olarak ikiye ayrılırlar [6].

1.1.1.1.1. Aminopeptidazlar

Aminopeptidazlar, polipeptit zincirinin serbest N ucunda hareket ederek tek bir amino asit kalıntısı, bir dipeptit veya bir tripeptidi serbest bırakır. Aminopeptidazlar, bakteri ve mantarları içeren çok çeşitli mikrobik türlerde bulunur [13]. Genel olarak, aminopeptidazlar hücre içi enzimlerdir ancak *Aspergillus oryzae* tarafından üretilen bir hücre dışı aminopeptidaz hakkında tek bir rapor bulunmaktadır [14]. Bakterileri ve mantarlardan elde edilen enzimlerin substrat özgüllüğü, organizmaların hidroliz ürünlerinin profilleri birbirinden farklıdır [15]. Örneğin; *Escherichia coli*'den elde edilen Aminopeptidase I'in moleküler ağırlığı 400,000 Da olan büyük bir proteazdır ve optimum aktivitesi için 7.5 ila 10.5'lik geniş bir pH optimumuna ve Mg^{2+} veya Mn^{2+} iyonlarına ihtiyaç duyar. *Bacillus licheniformis* 'in aminopeptidazının moleküler ağırlığı ise 34,000 Da'dur ve enzim mol başına 1 g Zn^{2+} atomu içerir ve aktivitesi Co^{2+} iyonu ile artmaktadır. Öte yandan, *Bacillus stearothermophilus*'tan izole edilen aminopeptidaz II'nin molekül ağırlığı ise 80.000-100.000 Da olan bir dimerdir ve Zn^{2+} , Mn^{2+} veya Co^{2+} iyonları tarafından aktive edilir [16, 17].

Proteazlar	Kesim Noktaları	E.C No
Exopeptidases		
Aminopeptidases	●↓○-○-○-○---	3.4.11
Dipeptidyl peptidase	●●↓○-○-○---	3.4.14
Tripeptidyl peptidase	●●●↓○-○-○---	3.4.14
Carboxypeptidase	---○-○-○-○-○↓●	3.4.16–3.4.18
Serine type protease		3.4.16
Metalloprotease		3.4.17
Cysteine type protease		3.4.18
Peptidyl dipeptidase	---○-○-○-○-○↓●●	3.4.15
Dipeptidases	●●↓	3.4.13
Omega peptidases	*●↓○-○-○---	3.4.19
	---○-○-○↓●*	3.4.19
Endopeptidases	---○-○-○↓○-○-○---	3.4.21–3.4.34
Serine protease		3.4.21
Cysteine protease		3.4.22
Aspartic protease		3.4.23
Metalloprotease		3.4.24
Endopeptidases of unknown catalytic mechanism		3.4.99

Şekil 1.2. Proteazların sınıflandırılmasına göre kesim noktaları

1.1.1.1.2. Karboksipeptidazlar

Karboksipeptidazlar, polipeptit zincirinin C terminallerinde hareket ederler ve tek bir amino asit veya bir dipeptid serbest bırakacak şekilde peptid bağlarını parçalarlar. Karboksipeptidazlar, enzimlerin aktif bölgesindeki amino asit kalıntılarının yapısına dayanan üç büyük gruba ayrılırlar. Bunlar serin karboksipeptidazlar, metallokarboksipeptidazlar ve sistein karboksipeptidazlardır [6]. *Penicillium spp.*, *Saccharomyces spp.* ve *Aspergillus spp.* 'den izole edilen serin karboksipeptidazlar substrat özgüllükleri bakımından benzer olup pH optimumu, stabilitesi, molekül ağırlığı ve inhibitörlerin etkisi gibi diğer özelliklerde biraz farklıdır. *Pseudomonas spp* ve *Saccharomyces spp.* 'den elde edilen metallokarboksipeptidazlar, faaliyetleri için Zn^{2+} veya Co^{2+} gerektirir. Enzimler ayrıca, peptidil grubunun yerini aldığı peptitleri bir pteroil ya da açıl/asil fonksiyonel grupları ile hidroliz edebilir [6, 18, 19].

1.1.1.2. Endopeptidazlar

Endopeptidazlar, N ve C terminallerinden uzaktaki polipeptid zincirinin iç bölgelerindeki peptid bağlarındaki tercihli eylemi ile karakterize edilir. Serbest amino veya karboksil grubunun varlığı, enzim aktivitesi üzerinde negatif bir etkiye sahiptir. Endopeptidazlar, katalitik mekanizmaları ve fonksiyonel gruplarına göre

1. Serin proteazlar,
2. Aspartik proteazlar,
3. Sistein proteazlar
4. Metalloproteazlar

olarak temelde dört proteaz alt grubuna ayrılmıştır [6, 9]

1.1.1.2.1. Serin Proteazlar

Serin proteazlar, aktif bölgede bir serin grubunun varlığı ile tanımlanır. Virüsler, bakteriler ve ökaryotların proteaz enzimleri arasında yaygındırlar. Bu yüzden organizmalar için hayati önem taşıdıkları ileri sürülmüştür. Serin proteazlar sınıflandırıldıklarında, ekzopeptidaz, endopeptidaz, oligopeptidaz ve omega peptidaz grupları içersine alınabilmektedir. Yapısal benzerliklerinden yola çıkılarak, serin proteazlar 20 aileye ayrılmıştır ve bunlar da ortak ataları olan yaklaşık altı klana bölünmüştür [8].

Serin proteazlar genellikle nötr ve alkalın pH'da aktiftir. Optimum pH aralıları 7 ile 11 arasındadır. Serin proteazlar esterolitik ve amidaz aktivitesi de dahil olmak üzere geniş substrat özelliklerine sahiptir. Serin proteazların izoelektrik noktaları genellikle pH 4 ve 6 arasındadır. Yüksek alkalın pH'ta aktif olan serin alkalın proteazlar serin proteazlarının en büyük alt grubunu temsil eder [6].

1.1.1.2.1.1. Serin Alkali Protezlar

Serin alkalın proteazlar birkaç bakteri, küf, maya ve mantar tarafından üretilir. Moleküler kütleleri 15-30 kDa aralığındadır. Alkalın proteazların optimum pH'sı yaklaşık pH 10'dur ve izoelektrik noktası da yaklaşık pH 9'dur. Serin alkali proteazlar, DFP veya bir patates proteaz inhibitörü tarafından inhibe edilmekte, ancak tosil-L-fenilalanin klorometil keton (TPCK) veya Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride (TLCK) tarafından inhibe edilmemektedir [6].

1.1.1.2.1.2. Subtilisinler

Alkalın serin proteazlar *Arthrobacter*, *Streptomyces* ve *Flavobacterium spp.* gibi çeşitli bakteriler tarafından üretilmesine rağmen *Bacillus spp.* tarafından üretilen subtilisinler serin proteazlarının en büyük ikinci familyasını temsil ederler [6, 20]. Subtilisin Carlsberg ve subtilisin Novo (BPN9) olmak üzere iki farklı alkalın proteaz tipi tanımlanmıştır. *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen Subtilisin Carlsberg, 1947'de Carlsberg laboratuvarında Linderstrom, Lang ve Ottesen tarafından keşfedilmiştir. Subtilisin Novo veya BPN9, *Bacillus amyloliquefaciens* tarafından üretilir. Subtilisin Carlsberg deterjanlarda yaygın olarak kullanılır. Yıllık yaklaşık 500 ton saf enzim üretimi yapılır. Subtilisin BPN9 ticari olarak daha az önemlidir. Her iki subtilisin molekül kütlesi 27.5 kDa'dır, ancak 58 amino asit ile birbirlerinden farklıdır. Bu iki enzim, 60 °C'lik bir optimal sıcaklık ve optimum pH 10 da aktivite gösterme gibi benzer özelliklere sahiptir. Her iki enzim de geniş bir substrat özgüllüğü göstermekte ve Ser221, His64 ve Asp32'den oluşan üçlü aktif bir bölgeye sahiptir. Carlsberg enzimi daha geniş bir substrat özgüllüğüne sahiptir ve kararlılığı için Ca^{2+} 'e bağımlı değildir. *Conidiobolus coronatus* mantarından elde edilen serin alkalın proteazın işlevsel benzerliklerine rağmen subtilisin Carlsberg'den belirgin şekilde farklı bir yapıya sahip olduğu gösterilmiştir [6, 21].

1.1.1.2.2. Aspartik Proteazlar

Asidik proteazlar olarak bilinen Aspartik asit proteazları, katalitik aktiviteleri için aspartik asit kalıntılarına bağımlı endopeptidazlardır. Çoğu aspartik proteaz, düşük pH'da (pH 3 ila 4) maksimum aktivite gösterir ve pH 3 ila 4.5 aralığında izoelektrik noktalara sahiptir. Molekül kütleleri 30 ila 45 kDa aralığındadır. Aspartik proteazlar pepstatin tarafından inhibe edilir. Bakır iyonlarının mevcudiyetinde diazo-asetil-DL-norlösin metil ester (DAN) ve 1,2-epoksi-3 (p-nitrofenoksi) propan (EPNP) gibi diazoketon bileşiklerine de duyarlıdır [6, 22]. Mikrobiyal aspartik proteazlar, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Neurospora* tarafından üretilen pepsin benzeri enzimler ve *Endothia* ve *Mucor spp.* tarafından üretilen rennin benzeri enzimler olmak üzere iki gruba ayrılabilir [6].

1.1.1.2.3. Sistein (Tiol) Proteazlar

Sistein proteazlar hem prokaryotlarda hem de ökaryotlar tarafından sentezlenir. Sistein proteazlar yaklaşık 20 aileye ayrılmıştır. Tüm sistein proteazlarının aktivitesi, sistein ve histidin içeren ikili bağın katalizine bağlıdır. Cys ve His (Cys-His veya His-Cys) artıklarının sırası aileler arasında farklılık göstermektedir [8]. Genellikle, sistein proteazlar yalnızca HCN veya sistein gibi indirgeyici ajanlar varlığında etkindir. Papain en çok bilinen sistein proteazdır. Sistein proteazlarının nötr pH optimumlarına sahip olmalarına rağmen, bunlardan birkaçı, örneğin, lizozomal proteazlar, asidik pH'da maksimum derecede aktiftir. PCMB gibi sülfhidril maddelerden etkilenirler, ancak DFP ve metal inhibitör maddelerinden etkilenmezler [6].

1.1.1.2.4. Metalloproteazlar

Metalloproteazlar katalitik tipte proteazlardır [23]. Metalloproteazların aktivite gösterebilmesi için ortamda +2 değerlikli metal iyonu bulunması gerekmektedir. Metalloproteazların 17 tanesi endopeptidaz, 12 tanesi ekzopeptidaz ve 1 tanesi hem endo peptidaz hem de ekzopeptidazları içeren yaklaşık 30 familya tanınmıştır [6].

Etkileşimlerinin özgülüğüne dayanılarak metalloproteazlar, nötr, alkalın, Myxobacter I ve Myxobacter II olmak üzere dört gruba ayrılabilir. Nötr proteazlar, hidrofobik amino asitler için özgülük gösterirken, alkalın proteazlar çok geniş spesifisiteye sahiptir. Myxobacter proteaz I, bölünme bağının her iki yanındaki küçük amino asit kalıntıları için spesifikken, Myxobacter proteaz II, peptid bağının amino tarafındaki lisin tortusu için spesifiktir [6].

Hepsi, EDTA gibi kenetleme maddeleri tarafından engellenir, ancak sülfhidril ajanlar veya DFP tarafından inhibe edilmemektedir. Matris metalloproteazlar, doku morfogenezi, farklılaşma ve yara iyileşmesi sırasında hücre dışı matrisin parçalanmasında belirgin bir rol oynar ve kanser ve artrit gibi hastalıkların tedavisinde yararlı olabilir [6, 24].

Özetle proteazlar, protein substratları üzerine etki yerleri temelinde geniş bir şekilde endo veya ekzoenzimler olarak sınıflandırılır. Ayrıca katalitik mekanizmalarına bağlı olarak serin proteazlar, aspartik proteazlar, sistein proteazlar veya metalloproteazlar olarak sınıflandırılırlar. Ayrıca, amino asit sekanslarına ve evrimsel ilişkilerine bağlı olarak farklı ailelere ve klanlara sınıflandırılırlar. En uygun aktivitelerinin pH'ına göre, bunlar asidik, nötr veya alkalın proteazlar olarakta adlandırılırlar.

1.1.2. Proteazların Kullanım Alanları

Alkalin proteazlar, endüstriyel enzim açısından en önemli proteaz sınıflarından biridir ve toplam enzim pazarının önemli bir bölümünü işgal eder. Deterjanlarda aktif maddeler olarak alkalin proteazların kullanılması bu enzimin en büyük uygulamasıdır. Ayrıca, deri endüstrisinde, tıbbi teşhislerde, gümüş röntgen filmlerinde, ipekteki yapışkanlığın giderilmesinde, gıda ve yem sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel süreçlerdeki geniş uygulamaları nedeniyle birçok şirket proteazları ticari düzeyde üretmeye başlamıştır [25].

1.1.2.1. Deterjan Endüstrisi

Alkali proteazlar, modern ev ve endüstriyel deterjanların gelişimi için büyük katkıda bulunmuştur. Alkalin proteazlar modern yıkama koşullarında oldukça başarılıdır çünkü geniş sıcaklık ve pH değerlerinde etkilidirler. Çamaşır endüstrisinde kullanılan çeşitli enzimler proteazlar, lipaz, selülozlar, amilinler vb.'dir [25, 26]. Bunların arasından, alkalin proteaz yüksek pH koşullarında kan, yumurta, sos, süt vb. gibi yoğun lekeleri hidrolize etme ve çıkarma kabiliyeti nedeniyle deterjan katkı maddeleri olarak önemli bir uygulama alanı bulmaktadır [27]. Son zamanlarda, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Streptomyces spp*, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Bacillus brevis*, *Bacillus subtilis* soyları, CaCl₂ ve glisin gibi belirli stabilizatörler varlığında mükemmel uyumluluk sergilemişlerdir [28,29]. Deterjanlarda yüksek alkalinite ve inhibitör konsantrasyonunun aşırı konsantrasyonda aktivite göstermek için, subtilisinler termostabilite, şelatörlere karşı direnç bakımından iyileştirilmiştir [30]. Aktivitenin kaybını önlemek için, alkalifilik *Bacillus* suşlarından deterjanlarda kullanılmaya uygun birkaç oksidatif stabil serin proteaz da izole edilmiştir [31].

1.1.2.2. Deri Sanayi

Geleneksel olarak derinin ıslatılması, derilerin süpürülmesi ve kılların soyulması yüksek oranda atık kirliliği yaratan farklı kimyasallar kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Ancak pH 9-10 civarında optimum pH değerine sahip proteazlar kullanılarak derideki kılların uzaklaştırılması sağlanır ve deriye suyun alınmasını kolaylaştırılır. Bunun proteazlar deri ıslatma işleminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Elastik ve keratinolitik aktiviteye sahip proteazlar derinin, yumuşaklık ve deri sızdırmazlığını kısa sürede elde etmek için kıl giderme ve keçeleşme işlemi için kullanılır. *B. subtilis*'den keratinolitik aktivite gösteren yeni bir proteaz, deri endüstrisinin kıl giderme sürecinde sodyum sülfürü değiştirme potansiyeli olarak araştırılmıştır [32-34].

1.1.2.3. Kimyasal Endüstri

Peptit sentezinin biyokatalizlenmesi sırasında kullanılan proteazların, organik çözücülerin varlığında yüksek bir kararlılık göstermesi peptid sentezi için içeren uygulamalarda son derece istenen bir özelliktir. *Aspergillus flavus*, *Bacillus pseudofirmus*, *Pseudomonas aeruginosa* PseA'dan elde edilen alkalın proteazlar, organik çözücü stabilitesi nedeniyle peptid sentezi potansiyeli açısından umut verici sonuçlar vermiştir [35-37]. Yüksek organik tolerans gösterilmesine ilaveten, *B. pumilus* suş CBS ve *Streptomyces sp.* suş AB1, düşük su sistemlerinde peptit sentezinde kullanılabilecek potansiyel güçlü adaydır [38]. *Bacillus licheniformis*'ten izole edilen alkalın proteaz kullanılarak 2H-1-benzopiran-2-on türevlerinin sentezi de bildirilmiştir. Polimerize olabilen vinil guaifenesin esterinin rejyoselektif sentezleri, *Bacillus subtilis*'ten alkalın proteaz ile incelenmiştir [38, 39].

1.1.2.4. Tıbbi Kullanımlar

Terapatik özelliklere sahip olan *Bacillus subtilis*'ten hareketsizleştirilmiş alkalin proteazın kullanımı, yumuşak jel temelli tıbbi formüllerin, merhem kompozisyonlarının, gazlı bezlerin, dokunmamış dokuların ve yeni bandaj materyalinin geliştirilmesinde kullanılmıştır [40]. *Aspergillus oryzae*'den proteazların ağızdan uygulanması, belirli litik enzim eksikliği sendromlarını düzeltmek için bir tedavi yöntemi olarak kullanılmıştır [41]. Alkalin fibrinolitik proteazlar ise, fibrini tercihen indirgediği için trombolitik tedavide ve kanser ilaçlarında gelecekte uygulanabileceğini bildirilmiştir [42, 43].

1.1.2.5. Atık Yönetimi

Kanatlı hayvan işleme endüstrisinden ve deri endüstrisinden kaynaklanan atıklar, keratin açısından zengindir. Keratin atıklarının kimyasal ve mekanik hidrolizi başarılıdır, ancak enerji açısından yoğun, kirletici ve esansiyel amino asit kaybına neden olan birçok dezavantaja sahiptir. Bu nedenle, keratinolitik aktiviteye sahip alkalin proteazlar (keratinazlar) kullanarak enzimatik bozunma çekici bir yöntemdir [44]. *Bacillus* türleri, tüylerin parçalanması için keratinazların en çok bildirilen bakteri kaynağıdır [45-47]. Diğer keratinazların bakteri kaynaklı kaynakları *Pseudomonas* sp. MS21, *Microbacterium* sp., *Chryseobacterium* sp. Ve *Streptomyces* sp.'dir [68-71]. *Aspergillus Oryzae*, *Chrysosporium indicum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum* sp., *Trichophyton* sp., *Aspergillus terreus*, *Scopulariopsis* sp., *Fusarium oxysporum*'dan elde edilen fungal keratinazlar da keratinin bozunmasına yönelik olarak incelenmiştir [48,49]. Tüylerin bozunmasından sonra elde edilen tüy hidrolizatları yemler, gübreler, yapıştırıcılar ve filmler için katkı maddesi olarak kullanılabilir veya nadir amino asitlerin (serin, sistein ve prolin) üretimi için kullanılır [50].

1.1.2.6. Yem ve Gıda Endüstrisi

Alkalın proteazlar, 40 yılı aşkın bir süredir protein hidrolizatlarının üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Hidrolizatlar, besin değerlerini iyileştirmek için gıda ve karışık yem katkı maddeleri olarak kullanılabilir. Tıpta, sindirim bozuklukları ve gıda alerjileri olan hastalara verilir [25, 51]. Protein hidrosilatlar, peynir altı suyu, et, soya ve kazein gibi çeşitli substratlardan elde edilebilir. Alkali proteazlar et işleme yöntemlerinde de kullanılmaktadır. SEB Tender 70, ticari olarak temin edilebilen proteazlar, etin yumuşatılmasında, kollajenleri yok ederek daha lezzetli hale getirmek için yaygın olarak kullanılır [25].

1.1.2.7. Gümüş Geri Kazanımı

Gümüş, özellikle fotoğraf endüstrisinde birçok amaçla kullanılan değerli metallere biridir. Jelatin içinde siyah metalik gümüş içeren Xray / fotoğraf filmleri, diğer film türleri ile karşılaştırıldığında gümüş geri kazanımı için çok iyi bir kaynaktır. X-ışını filmindeki gümüş miktarı, % 1.5 ila 2.0 arasında değişir. Gümüşü geri kazanım için filmler direk olarak yakmakta, elektroliz sonrasında metalik gümüşün oksidasyonu, farklı kimyasal solüsyonlar kullanılarak jelatin-gümüş katının sıyırılması gibi geleneksel yöntemler mevcuttur. Ancak bu yöntemlerde ciddi çevresel faktörler ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, jelatinin enzimatik hidrolizi, çevre üzerindeki etkiyi en aza indirmek için alternatif bir seçenektir [52]. Gümüş röntgen filmlerinden başarılı bir şekilde geri kazanım, *Bacillus subtilis*, *Conidiobolus coronatus*, *Streptomyces avermectinus*'dan elde edilen alkalın proteazlar tarafından uygulandığı bildirilmiştir [53-55].

1.1.2.8. İpek Temizliği

İpek lifini örten proteinli bir madde olan seriselini çıkarmak için ham ipler temizlenmelidir. Geleneksel olarak, ipek temizliği, sabun içeren alkalın bir solüsyonda yapılır. Bu sert bir muameledir, çünkü solüsyonda ipek lifinin kendisinde zarar görmektedir. Aynı zamanda yüksek enerji ve zaman tüketimi ve kullanılan su miktarlarının fazlalığı, ipek parlaklığında azalma gibi dezavantajları da vardır [56]. Bununla birlikte, seçilen alkalın proteolitik enzimlerin kullanımı daha iyi bir yöntemdir. Çünkü proteazlar seriselini lifi etkilemeden çıkarmaktadırlar. Yüksek enzim konsantrasyonlarında yapılan testlerde, lif hasarının olmadığını ve ipek ipliklerinin geleneksel yöntemle göre daha güçlü olduğunu göstermektedir [25].

1.1.3. Alkali Proteazların Üretimi

Çoğu alkalofilik mikroorganizma alkalın proteazlar üretir, ancak ilgi yalnızca yüksek miktarlarda enzim üreten mikroorganizmalarla sınırlıdır. Enzim üretimini arttırmak için bu organizmalara optimal büyüme koşulları sağlanması esastır. Proteaz üretimini teşvik eden kültür koşullarının, hücre büyümesini destekleyen kültür koşullarından önemli ölçüde farklı olduğunu bulunmuştur [57]. Endüstriyel alkalik proteazların üretiminde, çok yüksek konsantrasyonlarda (100-150 g kuru ağırlık / litre) kompleks karbonhidrat, protein ve diğer medya bileşenleri içeren teknik ortamlar kullanılmıştır [58]. Ekonomik olarak uygulanabilir bir teknoloji geliştirmek için alkalın proteazların verimleri iyileştirilmeli, fermentasyon ortamları ve üretim koşulları optimize edilmelidir [59].

1.1.3.1. Verimin İyileştirilmesi

Verimin iyileştirilmesi, mikrobik fermentasyon işlemlerinin ticari gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Kural olarak, yabancı suşlar genellikle, ticari uygulamalarda yararlı olabilmesi için ilk başlarda istenilen enzimin sınırlı bir miktarlarını üretir

[59]. Bununla birlikte, çoğu durumda, kültürün belirli ortamda üremesi gibi basit seçme yöntemleri uygulanarak, verimde önemli bir artış gösteren kolonileri seçmek mümkündür [60].

Verimi arttırmak için mutajenlerin veya antibiyotiklerin kullanılabilir ya da faydalı verimi yüksek suşların saptanması için özel teknikler veya prosedürlerin kabul edilerek verim daha da geliştirilebilir. Örneğin Shah ve ark. uyguladığı gelişmiş proteaz üretimi ile *B. licheniformis*'in sistein oksotrofik mutanını geliştirmiştir [61]. Ayrıca, vankomisin ve ristosetin gibi antibiyotiklere dirençli *Bacillus* suşları tarafından artan alkalın proteaz verimi elde edilmiştir [62].

Asporogenous mutant suşları ve *Bacillus spp.* endüstriyel olarak kullanılırlar. Bu suşlarda, ekstraselüler proteazlar, son ürünler, sporülasyonla yöneltilmediğinden, daha uzun süre üretilir. Alkalın proteaz pozitif asporojenik mutantların kullanımı ile enzim veriminde beş kat artış gözlenmiştir [63, 64] .

1.1.3.2. Fermantasyon Ortamının Optimizasyonu

Alkali proteazlar genellikle sulu fermentasyon ile üretilir. Buna ek olarak, katı hal fermentasyon süreçleri, bu enzimlerin üretimi için daha az kullanılmıştır [65]. Ticari uygulamada, besiyeri optimizasyonu, çeşitli besiyerleri arasında farkın belirlenmesi için yapılır ve böylece fermentasyonda proteaz üretimi için kullanılmayan bileşenlerin miktarını en aza indirilir. Buna ek olarak, farklı mikrobik kaynaklardan en iyi alkalın proteazların üretilmesi için tanımlanmış bir ortam bulunmamaktadır. Her bir organizma veya suş, maksimum enzim üretimi için kendi özel koşullarına sahiptir [59].

1.1.3.2.1. Azot Kaynağı

Çoğu mikroorganizma hem inorganik hem de organik azot biçimlerini, amino asitler, nükleik asitler, proteinler ve hücre duvarı bileşenleri üretmek üzere metabolize eder. Alkali proteaz % 15.6 azot içerir ve enzim üretimi ortamda bulunan karbon ve azot kaynaklarının bulunmasına bağlıdır [66]. Karmaşık azot kaynakları genellikle alkalın proteaz üretimi için kullanılır, ancak spesifik bir azot takviyesi gereksimi organizmadan organizmaya farklılık gösterir. Üretim ortamında inorganik azot kaynaklarının kullanımı ile düşük düzeyde alkalın proteaz üretimi bildirilmiştir [66, 67]. Enzim sentezinin, ortamdaki amino asitler veya amonyum iyonu konsantrasyonları gibi hızlı metabolize olabilen nitrojen kaynakları tarafından bastırıldığı bulunmuştur [68, 69].

Bazı amino bileşiklerinin eklenmesinin, alkalofilik *Bacillus* sp. türleri tarafından ekstraselüler enzimlerin üretiminde azaltıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Ortama Cas aminoasitleri ve glisin eklenmesi hem amilaz hem de proteaz üretimi üzerinde engelleyici etkilere sahip olduğu görülmüştür [70, 71].

1.1.3.2.2. Karbon Kaynağı

Yapılan çalışmalar, glukoz ile katabolit baskıya bağlı olarak, proteaz üretiminde bir düşüş olduğunu göstermiştir [66, 69]. Laktoz, maltoz, sukroz ve fruktoz gibi farklı şekerler kullanan çeşitli çalışanlar tarafından artan alkalın proteaz verimleri bildirilmiştir [67, 72-74].

Süt endüstrisinin çoğunlukla laktoz ve tuzları içeren atık bir yan ürünü olan peynir altı suyunun, alkalın proteaz üretimi için potansiyel bir substrat olarak gösterilmiştir [75,76]. Benzer şekilde, ana karbon kaynağı olarak saf selüloz (Solka-floc) kullanılan *Thermomonospora fusca* YX'de maksimum alkalın proteaz salınımı gözlenmiştir [77].

1.1.3.2.3. Metal İyonu İhtiyacı

Fermentasyon ortamında alkalın proteazların optimum üretimi için kalsiyum, kobalt, bakır, bor, demir, magnezyum, mangan ve molibden gibi iki değerlikli metal iyonları gereklidir. Bununla birlikte, spesifik metal iyonlarının gerekliliği enzim kaynağına bağlıdır [59].

1.1.3.2.4. pH ve Sıcaklık

Çoğu alkalofilik mikroorganizmanın önemli özelliği, hücre büyümesi ve enzim üretimi için hücre dışı pH'ya bağımlılığıdır. Bu alkalofillerdeki artmış proteaz verimleri için, fermentasyon süresi boyunca ortamın pH'ı 7,5'in üstünde tutulmalıdır [58].

Sıcaklık, organizmadan organizmaya kontrol edilmesi ve değiştirilmesi gereken bir başka kritik parametredir. Enzim üretiminin sıcaklık kontrol mekanizması iyi anlaşılammıştır. Bununla birlikte basillerde enzim sentezi ve enerji metabolizması arasında sıcaklık ve oksijen alımıyla kontrol edilen bir bağ olduğunu gösterilmiştir [69, 78].

1.1.3.2.5. Havalandırma ve Çalkalama

Çalkalama hızındaki değişim, çalkalama şişelerinde veya biyoreaktördeki karıştırma derecesini etkiler ve besin maddesinin kullanılabilirliğini de etkiler. Alkali proteazın optimum verimleri *B. subtilis* ATCC 14416 ve *B. licheniformis* için 200 dev/dak'da üretilir. Ortamda oksijen azalması proteaz sentezinde önemli bir sınırlayıcı faktör olduğunu gösterilmiştir [59, 67, 79].

1.1.3.3. Büyüme ve Proteaz Üretimi Arasındaki İlişki

Genel olarak, *Bacillus* türündeki proteaz sentezi, yapısal ve üstel büyüme ile durağan faz arasında geçiş hali esnasında işlev gören sayısız kompleks mekanizmalar tarafından kontrol edilir. Büyümenin durağan fazı boyunca ekstraselüler proteazların üretimi birçok bakteri türünde karakteristiktir. Bununla birlikte, enzim üretimi sırası ve oranı, spesifik organizma ile değişkenlik göstermektedir. Erken sabit evrede iki veya daha fazla proteaz salgılanır ve üretilen proteaz miktarının oranı da *Bacillus* suşları arasında değişir [80-82]. Birçok durumda, salgılanan proteaz enzimin işlevi çok net değildir. Ancak proteaz sentezi, yüksek bir protein döngüsünün ve genellikle sporülasyonun başlangıcı ile ilişkilidir [59, 79].

1.1.4. Alkali Proteazların Saflaştırılması

Alkali proteazların ham preparatları genel olarak ticari kullanım için kullanılır. Bununla birlikte, alkalın proteazların saflaştırılmasıyla, enzimin işleyişi hakkında daha iyi bir şekilde bilgi sahibi olunabilir [83, 84].

1.1.4.1. Enzimin Geri Alınması

Başarılı bir fermentasyondan sonra, fermentasyon ortamı cihazdan çıktığında, çevresel koşullarda şiddetli bir değişikliğe maruz kalır. Fermentasyon ortamının sıcaklığı hızlı bir şekilde düşer. Enzim aktivitesini ve stabilitesini muhafaza etmenin yanı sıra mikrobik kontaminasyonu önlemek vazgeçilmez bir unsur haline gelir [59]. Fermentasyon sıvısındaki bakterilerin ve artıkların uzaklaştırılması, yaygın olarak vakum döner tamburlu filtreler ve santrifüjler kullanılarak yapılır. Bu işlemler enzim işleminin birincil basamağıdır. Kusurlu arıtmadan kaynaklanan enzim aktivitesindeki kayıpları önlemek için ayrıştırılmaya başlamadan önce fermentasyon sıvısına bazı kimyasallar eklenerek ön arıtımını yapmak gereklidir [58] [85].

1.1.4.2. İzolasyon ve Saflaştırma

Enzimleri ticari amaçlarla endüstriyel ölçekte izole ederken asıl düşünce, son ürünün değeri ile ilişkili olarak üretim maliyeti olmuştur. Bunun için düşük maliyetli yöntemler uygulanmaktadır.

1.1.4.2.1. Konsantrasyon

Bakterilerden ayrılan filtratta bulunan enzim miktarı genellikle düşüktür bu yüzden filtradaki suyun çıkarılması birincil hedefdir. Son zamanlarda, membran ayırma işlemleri yaygın olarak kullanılmaktadır [86]. Ultrafiltrasyon (UF), enzimlerin geri kazanımı için büyük ölçüde kullanılan böyle bir membran işlemidir ve buharlaştırmaya tercih edilen bir alternatif oluşturmuştur [87, 88]. Bu basınca dayalı ayırma işlemi ucuzdur ve enzim aktivitesinde çok az bir kayba neden olur. Ayrıca ultrafiltrasyon saflaştırma ve konsantrasyonun yanı sıra tuzun giderilmesi için diafiltrasyon sunar [89-91].

1.1.4.2.2. Çöktürme

Çöktürme işlemi, ham biyolojik karışımlardan proteinlerin izole edilmesi ve geri kazanılması için en sık kullanılan yöntemdir [92]. Hem saflaştırma hem de konsantrasyon adımlarını gerçekleştirir. Genellikle, tuz veya organik bir çözücü gibi istenen proteinlerin sulu bir çözeltide çözünürlüğünü düşüren reaktiflerin ilavesi ile gerçekleştirilir. Amonyum sülfatla çöktürme yıllarca kullanılmasına rağmen, deterjan enzimleri için tercih edilen çökelme maddesi değildir. Amonyum sülfat, yalnızca asidik ve nötr pH değerlerinde geniş yarar bulmuş ve alkalik koşullar altında ortamda amonyak oluşmasına sebep olmuştur [58]. Bu nedenle çöktürme işlemlerinde, sodyum sülfat veya bir organik solventin kullanılması tercih edilen uygulama haline gelmiştir. Sodyum sülfatın amonyum sülfata kıyasla daha iyi çökelme özelliklerine

rağmen, tuzun düşük sıcaklıklarda zayıf çözünürlüğü kullanımını kısıtlamaktadır [93].

1.1.4.2.3. İyon Değişim Kromatografisi (IEC)

Alkali proteazlar genellikle pozitif yüklüdür ve iyon değiştirme kromatografisi ile kolayca ayrılabilirler [94, 95]. İyon değiştirici kromatografide, katyon değiştiriciler akılcı bir seçim olabilir. İyon değiştirici kromatografiye bağlı moleküller artan bir tuz veya pH gradyanti ile kolondan uzaklaştırılırlar [96].

1.1.4.2.4. Afinite Kromatografisi

Farklı afinite kromatografik yöntemleriyle alkalın proteazlar saflaştırılabilir. Örneğin afinite kromatografisinde adsorban olarak bir hidroksiapatitin kullanılarak, nötr ve alkalın *Bacillus* proteazları ayırmak için kullanılabilir [97, 98]. Diğer afinite matrisleri, sefades-4-fenilbutilamin, kazein agaroz veya agaroz adsorbanlarda immobilize edilmiş N-benzoiloksikarbonil fenilalanin'dir [70, 99, 100]. Bununla birlikte, afinite kromatografisinin başlıca sorunları yüksek maliyeti ve bazı afinite ligandlarının kararsız özellikleridir [59].

1.1.4.2.5. Sulu İki Fazlı Sistemler

Bu teknik, alkolle çöktürülen proteazların, polietilen glikol (PEG) ve dekstran ya da PEG ile H₃PO₄, MgSO₄ gibi tuzları içeren karışımlar kullanılarak saflaştırılması için uygulanmıştır [101-103].

1.1.5. Proteaz Üretici Mikroorganizmaların Moleküler Tanımlanması

1.1.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) aranması amacıyla ilk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından keşfedilmiştir. Yüksek ölçüde duyarlı olan bu teknik Kary Mullis'e Nobel ödülünü kazanmıştır [104]. PZR, bakteri, arkea, mantar, protozoa, virüs gibi mikroorganizmaların istenilen nükleik asit zincirlerini in vitro koşullar altında, çoğaltılmak istenilen genetik bölgeye özgü primerler kullanılarak programlanabilir ısı döngü cihazları ile çoğaltılmasını sağlayan özgün ve güvenilir bir yöntemdir [105].

PZR teknikleri enfeksiyonların teşhisinde, özel amaçlarla genlerin belirlenmesinde, özel DNA parçalarının klonlanmasında büyük kolaylık sağlamıştır. Bakteri kontaminasyonu, genetiği değiştirilmiş DNA'nın varlığı ve gıda içeriklerinin özgünlüğünün kontrolü gibi yeni alanlarda da incelemelere olanak sağlamıştır [106, 107].

PZR tekniği, temelde üç aşamadan oluşmaktadır.

1. Denatürasyon: Çift sarmal DNA'nın yüksek sıcaklıkta (94-96 °C) çözülerek tek sarmal haline gelmesi.
2. Bağlanma (annealing): Primer olarak kullanılan iki oligonükleotidin, tek iplikli hale gelen DNA'ya uygun sıcaklıkta (37-65 °C) spesifik olarak bağlanması.
3. Uzama (extension): Taq DNA polimeraz için gerekli molekül olan Mg^{2+} varlığında, kullanılan polimeraz enziminin optimum çalışma sıcaklığında, primerlere nükleotid eklenerek ve çift iplikli DNA'nın sentezlenmesi [108].

PZR'ın herbir döngüsü bu basamakları içerir. Her döngü sonunda PZR ürünleri iki katına çıkar. Böylece bir genin tek kopyasından milyonlarca kopya yapılabilir. PZR ile moleküler tanımlamada kullanılan hedef gen, genellikle prokaryotlar için 16S rRNA ve ökaryotlar için ise 18S rRNA'yı kodlayan genlerdir [109, 110].

Bu genlerin, standart olarak kabul görmesi ve çevresel örneklerdeki mikroorganizma çeşitliliğini ortaya çıkarmak için yaygın olarak kullanılma nedenleri şunlardır:

1. Tüm prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda bulunmaktadır.
2. Yeterli büyüklükte ve işlevsel olarak sabittir.
3. Tüm hücrelerde hem yüksek düzeyde korunmuş hem de değişken çok sayıda bölgeye sahiptirler [108, 111].

1.1.5.1.1. PZR Optimizasyonu

Örneklerde inhibe edici maddelerin bulunması, çevresel kontaminasyon riski, kullanılan bileşenlerin miktarının yanlış kullanılması, sıcaklık parametrelerinin ayarlanamaması gibi problemler PZR yapılırken her zaman karşılaşılabilecek sorunlardır. PZR karışım reaksiyonundaki; DNA konsantrasyonu, Mg^{+2} konsantrasyonu, primer konsantrasyonu ve özellikleri, dNTP konsantrasyonu PZR işleminin doğruluğu adına çok önemlidir. PZR'ın işlevlerinde sorun yaratabilecek bir diğer etmen de mikrobiyal genomlarda oluşan beklenmedik mutasyonlardır. PZR işlemlerinde spesifik olmayan bağlanmaları önlemek için mutlaka optimizasyon gereklidir [106, 112, 113].

1.1.5.2. ARDRA Yöntemi

ARDRA (Amplified Ribozomal DNA Restriction Analysis) yönteminde PZR ile çoğaltılmış 16S rRNA parçaları, kesim (restriction) enzimleri ile spesifik bölgelerden kesilir. Sonra jel elektroforezi ile birbirinden ayrılır. ARDRA mikrobiyal tanımlamada kullanılan basit, hızlı ve etkin maliyetli bir yöntemdir. Eğer mikroorganizmalar birbirinden farklı ise kesilen PZR ürünleri farklı yerlerden kesilmiş olacaktır [114-116].

Ribozomal DNA kesim analizi (ARDRA) mikroorganizmaların türleri hakkında hiçbir bilgi vermemekle birlikte, genetik değişikliklerin değerlendirmesine ve birbirinden farklı türleri hızlı bir şekilde karşılaştırılmasına olanak sağlar [116-118].

2. MATERYAL VE METOT

2.1. MATERYAL

Bu çalışmada, proteince zengin bir bölgeden alınan toprak örneğindeki proteaz üreticisi mikroorganizmalar izole edilmiş ve izole edilen mikroorganizmanın ürettiği proteaz enzimi üzerinde çalışmalar yapılarak, elde edilen proteaz enziminin en uygun aktivite gösterdiği şartlar belirlenmiştir. Böylece saflaştırılan enzimin endüstri için uygunluğu test edilmiştir.

2.1.1. Kullanılan Besiyerleri

2.1.1.1. Proteaz Üreticisi Belirleme Besiyeri (skimmilk'li)

Singh ve ark. (2001)'in tanımladığı besiyeri proteaz üreticisi mikroorganizmaları seçmek amacıyla modifiye edilerek kullanılmıştır [119].

Pepton	10 g
Et özütü	3 g
Maya özütü	3 g
NaCl	5 g
Skimmilk	20 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanımdan önce 121 °C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir. Skimmilk ayrıca steril edilerek ortama ilave edilmiştir.

2.1.1.2. N1 Agar Besiyeri

Saf kültür olarak seçilen bakteri izolatlarının çoğaltılması ve saklanması amacıyla kullanılmıştır [120].

Pepton	10 g
Et özütü	10 g
Maya Ekstratı	5 g
Glikoz	1 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanımdan önce 121 °C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

2.1.1.3. Proteaz Üretim Besiyeri (Enzim Besiyeri)

Daha önce proteaz üreticisi olduğu skimmilk'li besi yerinde gösterilen mikroorganizmaların enzim üretim yeteneklerini göstermek için enzim üretim besiyeri olarak kullanılmıştır [121].

Kazein	5 g
Pepton	5 g
Maya özütü	2 g
NaCl	5 g
MgSO ₄	0.2 g
CaCl ₂	0.1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Distile su	1000 mL

Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanımdan önce 121 °C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

Mikroorganizmaların; enzim besiyeri ile nutrient broth besiyerindeki proteaz üretim yetenekleri de karşılaştırılarak enzim besiyerinin doğruluğu kontrol edilmiştir.

2.1.1.4. Nutrient Broth (NB) Besiyeri

İzole edilen bakterilerin büyüme eğrisi, DNA izolasyonu, bakteri stabilitesi ve enzim aktivitesi gibi deneyler için kullanılmıştır.

Pepton	5 g
Et özütü	3 g
Distile su	1000 mL

Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanımdan önce 121 °C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

2.1.1.5. Biyokimyasal Testler için Kullanılan Besiyerleri

2.1.1.5.1. Dev-Triptofan Broth

İzole edilen bakterilerin İndol testi için kullanılmıştır.

Pepton	10 g
DL-triptofan	1.0 g
NaCl	5.0 g
Distile su	1000 mL

Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanımdan önce 121 °C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

2.1.1.5.2. MR-VP. Broth

İzole edilen bakterilerin Metil-Red ve Voges Proskauer testi için kullanılmıştır.

Pepton	7,0 g
D(+) Glukoz	5,0 g
K ₂ HPO ₄	5,0 g
Distile su	1000 mL

Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanımdan önce 121 °C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

2.1.1.5.3. Simmons Sitrat Agar

İzole edilen bakterilerin sitrat testi için kullanılmıştır.

MgSO ₄	0.2 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.2 g
NaCl	5g
NaNH ₄ HPO ₄	0.8 g
Sodyum Sitrat	2 g
Brom Timol Mavisi	0.08 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanımdan önce 121 °C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

2.1.1.5.4. Nişasta Hidroliz Besiyeri

İzole edilen bakterilerin nişasta hidroliz yeteneklerini belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

Pepton	5 g
Et özütü	3 g
Agar	15 g
Nişasta	10 g
Distile su	1000 mL

Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanımdan önce 121 °C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

2.1.1.5.5. Jelatin Hidroliz Besiyeri

İzole edilen bakterilerin nişasta hidroliz yeteneklerini belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

Pepton	5 g
Et özütü	3 g
Jelatin	10 g
Distile su	1000 mL

Gerekli miktarda hazırlanan besi kullanımdan önce 121 °C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan Çözeltiler

2.1.2.1. Steril % 0.9'luk Serum Fizyolojik

Bakterilerin seri sulandırılmaları için kullanılmıştır.

0.9 g NaCl tartılıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Ardından 121 °C 1.5 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.2.2. Biyokimyasal Testlerde Kullanılan Çözeltiler

2.1.2.2.1. Kovacs' Ayıracı

İndol testinin ayıracı olarak kullanılmıştır.

1 g 4-dimetilaminobenzaldehit saf 15 mL İzoamil alkol içerisinde çözülür. 5 mL % 36'lık HCl yavaşça karışıma karıştırılarak eklenmiştir. Koyu renkli şişede buzdolabında saklanmıştır.

2.1.2.2.2. Metil Red Ayıracı

Metil red testinin ayıracı olarak kullanılmıştır.

0.1 g metil kırmızısı 300 mL % 95'lik etil alkolde çözdürüldükten sonra üzerine 200 mL distile su eklenerek koyu renkli şişede buzdolabında saklanır.

2.1.2.2.3. % 5'lik α -Naftol

Voges Proskauer testinde kullanılmıştır.

0.5 g α -Naftol 5 mL saf etil alkol içinde eritilmiştir. Ardından saf etil alkol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

2.1.2.2.4. % 40'lık KOH

Voges Proskauer testinde kullanılmıştır.

4 g KOH tartılıp 10 mL distile suda çözülmüştür.

2.1.2.2.5. % 3'lük H₂O₂

Katalaz testinde kullanılmıştır.

% 30'luk hidrojen peroksitten (H₂O₂) 1 mL alınıp 10 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

2.1.2.2.6. % 5'lik Malaşit Yeşili

Spor boyama işleminde kullanılmıştır.

5 g malaşit yeşili oksalat, 100 mL distile su yavaşça eklenerek çözülmüş, bir gece bekletip kağıt filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

2.1.2.3. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

2.1.2.3.1. 50 mM (pH:8.0) Tris-EDTA tamponu

0.3 g Tris ile 0.008 g EDTA tartılarak 200 mL distile suda çözülmüş ve pH'sı ayarlandıktan sonra 250 mL'ye tamamlanmıştır.

2.1.2.3.2. % 10'luk SDS çözeltisi

1 gr SDS tartılıp distile su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

2.1.2.3.3. 5 M NaCl çözeltisi

2 g NaCl çözeltisi distile su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

2.1.2.3.4. CTAB/NaCl Tamponu

0,41 g NaCl, 6 mL distile suda çözülüp 1 g CTAB (*Cetyltrimethylammonium bromide*) yavaşça eklenerek distile su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

2.1.2.3.5. Kloroform/İzoamil Alkol Karışımı

9,6 mL kloroform ile 0,4 mL izoamil alkol karıştırılmıştır.

2.1.2.3.6. Kloroform/İzoamil/Fenol Karışımı

10 g fenol 10 mL 1 M pH:8.0 Tris-HCl tamponunda çözülmüş ve 2 saat beklenmiştir. Süre sonunda oluşan üst faz uzaklaştırılmış ve alt faza yeniden 10 mL 1 M (pH:8.0) Tris-HCl tamponu eklenip 5 dk faz oluşumu beklenmiş ve üst faz uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 4-5 kez daha tekrar edilmiştir. Daha sonra oluşan karışımdan 10 mL alıp üzerine 9,6 mL kloroform, 0,4 mL izoamil alkol ve 10 mL 1 M (pH:8.0) Tris-HCl tamponu eklenir.

2.1.2.3.7. % 70'lik Etil Alkol

Saf etil alkolden 7 mL alınıp distile su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

2.1.2.4. PZR Elektroforez Çözeltilerinin Hazırlanması

2.1.2.4.1. 10X TBE (Tris-Borik Asit, EDTA) Tamponu

108 g Tris, 55 g Borik asit 900 mL distile suda çözülür. 40 mL 0.5 M EDTA eklenip distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

2.1.2.4.2. 6X Yükleme Tamponu

4 g sukroz 6 mL 10X TBE tamponunda çözüldükten sonra 25 mg bromfenol mavisi eklenerek distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.

2.1.2.4.3. EtBr Çözeltisi

Etidyum Bromür çözeltisi 5 µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Bunun için 1 mg etidyum bromür 200 mL distile suda çözülmüştür.

2.1.2.4.4. % 1'lik Agaroz Jel

0.3 g agaroz tartılıp üzerine 30 mL 1X TBE tamponu eklenip mikrodalga fırında kaynatılmıştır. Agaroz karışımı biraz soğuduktan sonra 3 µL EtBr eklenmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra agaroz, jel tablasına dökülüp taraklar yerleştirilmiştir.

2.1.2.5. Proteaz Aktivitesi Hesaplamada Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

2.1.2.5.1. 50 mM (pH:9.0) Glisin NaOH Tamponu

0.375 g glisin tartılıp distile su ile 90 mL'ye tamamlanıp 1 N'lik NaOH çözeltisi ile pH'sı ayarlanarak distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

2.1.2.5.2. TCA Çözeltisi

Toplam çözelti içerisinde 0.1 M TCA, 0.22 M sodyum asetat ve 0.33 M asetik asit olmalıdır. Bunun için 1,633 g TCA(trikloro asetik asit) ile 1,8 g sodyum asetat 98 mL içerisinde çözülür. 0,198 mL asetik asit 10 mL distile su ile tamamlandıktan sonra bu çözeltiden 2 mL alınarak 98 mL'lik çözelti içerisine eklenir.

2.1.2.5.3. 0.5 M Na₂CO₃ çözeltisi

5,3 g Na₂CO₃ distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

2.1.2.5.4. 50 mM Fosfat Tamponu

0,68 g KH₂PO₄ 100 mL distile suda çözülür. 0,87 g K₂HPO₄ 100 mL distile suda çözülür. pH'ları ölçülerek birbirine yavaşça eklenerek istenilen pH'a getirilir.

2.1.2.6. Bradford Çözeltisinin Hazırlanması

10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 5 ml % 95'lik etil alkolde çözülüp, 10 ml % 85'lik fosforik asit eklenmiş ve 100 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

2.1.2.7. SDS-PAGE' de kullanılan Tampon ve Çözeltiler

2.1.2.7.1. Stok % 30'luk Akrilamid-Bisakrilamid Karışımı

29,2 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid tartılarak 100 mL distile suda çözülmüştür.

2.1.2.7.2. 1,5 M (pH: 8.8) Tris-HCl tamponu

18,17 g Tris 80 mL distile suda çözülüp pH'sı 8.8'e HCl ile ayarlandıktan sonra 100 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

2.1.2.7.3. 0,5 M (pH: 6.8) Tris-HCl tamponu

6,05 g Tris 70 mL distile suda çözülüp pH'sı 6.8'e HCl ile ayarlandıktan sonra 100 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

2.1.2.7.4. %10'luk Amonyumperoksidisülfat (APS)

0,1 g amonyumperoksidisülfat (APS) 1 mL distile suda çözülmüştür. Her seferinde taze hazırlanmıştır.

2.1.2.7.5. % 10'luk SDS Çözeltisi

1 g SDS tartılarak 10 mL distile suda çözülmüştür.

2.1.2.7.6. % 10'luk Ayırma Jeli

3.3 mL stok % 30'luk akrilamid-bisakrilamid çözeltisi

2,5 mL 1,5 M (pH: 8.8) Tris-HCl

0,1 mL % 10'luk Amonyumperoksidisülfat (APS)

0,1 mL % 10'luk SDS

0,005 mL TEMED (En son eklenmiştir.)

4 mL distile su

2.1.2.7.7. % 4'lük Yükleme Jeli

1,35 mL stok % 30'luk akrilamid-bisakrilamid çözeltisi
2,5 mL 0,5 M (pH: 6.8) Tris-HCl
0,1 mL % 10'luk Amonyumperoksidisülfat (APS)
0,1 mL % 10'luk SDS
0,005 mL TEMED (En son eklenmiştir.)
6 mL distile su

2.1.2.7.8. Örnek Yükleme Tamponu

3,9 mL distile su
0,6 mL 0,5 M (pH: 6.8) Tris-HCl
2,5 mL gliserol
2 mL % 10'luk SDS
1 mL % 1'lik Brom Fenol mavisi

2.1.2.7.9. 5X Elektroforez Yürütme Tamponu

48,3 g Glisin
9 g Tris
3 g SDS
600 mL distile su

2.1.2.7.10. Tespit (fiksasyon) Çözeltisi

500 mL % 95'lik etil alkol
100 mL glassiyal asetik asit
400 mL distile su

2.1.2.7.11. Fiksatif Yıkama Çözeltisi

500 mL metil alkol
100 mL glassiyal asetik asit
400 mL distile su

2.1.2.7.12. Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyası

0,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250
100 mL metil alkol
50 mL glassiyal asetik asit
350 mL distile su

2.1.2.7.13. Boya Giderici Çözelti

500 mL metil alkol
100 mL Glassiyal asetik asit
400 mL distile su

2.2. METOT

2.2.1. Topraktan Bakteri İzolasyonu

Proteaz üreticisi mikroorganizmaların seçimi için proteinlerin yoğun olarak bulunduğu bir alan belirlenmiş ve bu alandaki toprak tabakasından steril tüplere toprak örneği alınmıştır.

1g toprak % 0.9 luk steril serum fizyolojik ile seri sulandırım yapılmıştır. Yapılan sulandırmalar Singh ve ark. kullanmış olduğu besi yeri modifiye edilmiş ve bu besiyerine 0,1 ml örnek yayma ekim tekniği kullanılarak ekilmiştir. 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılan petrilere proteaz üreticisi mikroorganizmaları seçmek için petride oluşan zonlar kullanılmıştır. En büyük zon oluşturan ve koloni yapıları farklı olan mikroorganizmalar seçilip saflaştırılmıştır. Saflaştırılan mikroorganizmalar uzun süre saklanması için N1 agara ekilmiş ve bir gecelik inkübasyon sonrası +4 °C’de saklanmıştır.

2.2.2. İzole Edilen İzolatların En Uygun Üreme Sıcaklığı Ve Üreme pH’sının Belirlenmesi

İzole edilen izolatların en uygun üreme sıcaklığı ve üreme pH’sını belirlemek için Nutrient Broth besiyeri kullanılmıştır. En uygun üreme sıcaklığını ve pH’sını belirleyebilmek için besiyeri pH’sı 5.0, 7.0, 9.0 ve 12.0’ye ayarlanarak ekim yapılmıştır. Ekim yapılan besi yerleri 17 °C, 27 °C, 37 °C, 50°C’de inkübasyona bırakılmış ve ilk üç gün içerisindeki üremeleri kontrol edilmiştir. İnkübasyon sonrası mikroorganizmalar 600 nm’ye ayarlanmış mikropilaya okuyucuda (Biotek, PowerWave XS2) üreme yoğunlukları ölçülmüştür.

2.2.3. İzole Edilen İzolatların Biyokimyasal Testleri

2.2.3.1. İMVeC Testleri

İndol Testi; Mikroorganizmalar 5 ml steril DEV Tryptophan Broth besiyeri içeren tüplere ekilmiş ve 37 °C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında tüplere 4-5 damla Kovacs’ İndol ayırıcı damlatılmıştır. Kırmızı halka oluşan tüpler İndol (+) pozitif, sarı halka oluşan tüpler İndol (-) olarak değerlendirilmiştir.

Metil Red Testi; Mikroorganizmalar 5 ml steril MR-VP Broth besiyeri içeren tüplere ekilmiş ve 37 °C’de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında tüplere 7-8 damla Metil-Red ayırıcı damlatılmıştır. Kırmızıya dönen tüpler Metil Red (+) pozitif, sarıya dönen tüpler Metil Red (-) negatif olarak değerlendirilmiştir.

Voges-Proskauer Testi; Mikroorganizmalar 5 ml steril MR-VP Broth besiyeri içeren tüplere ekilmiş ve 37 °C’de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında tüplere önce 7-8 damla % 5’lik 1-naftol sonrasında da 3 damla % 40’lık KOH damlatılmıştır. İyiye karıştırılıp 30 dk içinde kırmızıya dönen tüpler VP (+) pozitif, sarı olan tüpler VP (-) olarak değerlendirilmiştir.

Sitrat Testi; Mikroorganizmalar 10 ml Simmons’ Citrate agara yatık olarak ekilmiş ve 37 °C’de 2-7 gün arasında inkübasyona bırakılmıştır. Maviye dönen tüpler Sitrat (+) pozitif, yeşil kalan tüpler Sitrat (-) olarak değerlendirilmiştir.

2.2.3.2. Nişasta Hidroliz Testi

Mikroorganizmalar % 10 nişasta içeren Nutrient agara ekilmiş ve 37 °C’de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra petrilere Lugol ayırıcı damlatılmış ve mavi-mor renk olanlar Amilaz (-) negatif lugolün kendi rengi olarak sarı kalanlar ise Amilaz (+) pozitif, olarak değerlendirilmiştir.

2.2.3.3. Jelatin Hidroliz Testi

Mikroorganizmalar % 10 jelatin içeren Nutrient broth'a daldırma ekim yapılmış ve 37 °C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra tüpler +4 °C'de, 90 dk. bekletilmiş ve süre sonunda katılaştıran tüpler jelatin (-) negatif, sıvı kalan tüpler ise jelatin (+) olarak değerlendirilmiştir.

2.2.3.4. Katalaz Testi

Bir öze dolusu mikroorganizma bir damla distile su bulunan lamda süspansiyon edilmiş ve üzerine 1-2 damla % 3'lük H₂O₂ çözeltisi damlatılmıştır. 2-3 saniye içinde lamda hava kabarcıkları oluşturan mikroorganizmalar katalaz (+) pozitif, oluşturmayan mikroorganizmalar ise katalaz (-) negatif olarak değerlendirilmiştir.

2.2.3.5. Gram Boyama

Bir gece Nutrient agarda üretilen mikroorganizmalar üzerinde bir damla steril su bulunan lama bir öze dolusu alınmıştır. Mikroorganizmalar lama eşit bir şekilde yayıldıktan sonra bek alevinin 20 cm kadar üzerinde tutarak lamdaki su buharlaştırılmış ve su tamamen buharlaştıktan sonra lam ateşten hızlıca 2-3 kez geçirilerek mikroorganizmaların lama fiksasyonu sağlanmıştır. Daha sonra lam üzerine kristal viole boyası damlatılmış ve 60 saniye beklenmiştir. Süre sonunda preparattaki kristal viole nazikçe akan suyun altında yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Daha sonra preparata lugol çözeltisi damlatılmış ve 60 saniye bekletilip, preparat tekrar su ile yıkanarak lugolden uzaklaştırılmıştır. Preparatın üzerine bu aşamada % 96'lık etanol damlatılarak 15 saniye beklenmiş ve ardından preparat tekrar su ile yıkanmıştır. Son aşamada preparata bazik fuksin veya safranin boyaları damlatılarak 30 saniye bekletilmiş ve su ile yıkanmıştır. Daha sonra kurumaya bırakılan preparatlar mikroskopta immersiyon yağı damlatılarak 100X'lik objektifte incelenmiştir.

İnceleme sonucunda mikroorganizmaların morfolojisi ve Gram özellikleri belirlenmiştir. Mavi-mor renkte görünen mikroorganizmalar Gram pozitif (+) olarak değerlendirilirken, kırmızı-pembe renkte görünen mikroorganizmalar Gram negatif (-) olarak değerlendirilmiştir.

2.2.3.6. Spor Boyama

Bir gece Nutrient agarda 37 °C’de inkübe edilen mikroorganizmalar üzerinde bir damla steril distile su bulunan lama bir öze dolusu alınarak iyice süspanse edilerek lama yayılmıştır. Daha sonra bek alevinin 20 cm kadar üzerinde kurutulan lam, 3-4 kez ateş içersinden geçirilerek bakteriler lama fiske edilmiştir. Sonrasında lam üzerine % 5’lik malaşit yeşili damlatılarak bek alevinin 10 cm üzerinde tutulmuş, boya eksildikçe ilave ederek sıcaklık yardımıyla sporların boyayı alması sağlanmıştır. 10 dk boyunca ateş üzerinde boya eklemesi yapılan lamlar yıkanarak fazla boyadan uzaklaştırılmış ve mikroskopta immersiyon yağı kullanılarak sporlar incelenmiştir.

2.2.4. İzolatların Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi

25 ml Nutrient broth içeren erlenmayerlere, mikroorganizmalar % 5 oranında inokulum yapılmış ve 0. Saatteki yoğunluk 600 nm’ye ayarlanmış mikropilaka okuyucuda okunmuştur. Daha sonra belirli saatlerdeki bakteri yoğunluğu aynı şekilde 600 nm’ye ayarlanmış mikropilaka okuyucuda (Biotek, PowerWave XS2) okunmuş ve mikroorganizmaların üreme eğrileri çizilmiştir.

2.2.5. İzole Edilen Mikroorganizmaların 16S rRNA Analizi ile Moleküler Tanımlanması

2.2.5.1. DNA İzolasyonu

Mikroorganizmaların genomik DNA izolasyonunda Cutting ve Horn (1990)'un uyguladığı yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır [122] .

Bu yöntem gere; bir gece nutrient broth'ta inkubasyona bırakılan mikroorganizmalardan, 1,5 mL'lik steril santrifüj tüplerine konarak 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve sonrasında süpernatant kısmı atılmıştır. Sonrasında tüplere yeniden mikroorganizma ilavesi yapılarak tekrar 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş süpernatant kısmı yine atılmıştır. Daha sonra tüpteki oluşan pelete 400 µL 50 mM pH 8.0 Tris-EDTA tamponu ilave edilerek mikroorganizma peleti çözdürülmüştür. Oluşan süspansiyona 30 µL % 10'luk SDS ve 3 µL proteinaz K eklenerek iyice karıştırılmış ve 37 °C'de 1 saat bekletilmiştir. Süre sonunda tüplere 100 µL 5M'lık NaCl çözeltisi eklenerek tüpler ters düz edilmiştir. Daha sonra 80 µL CTAB/NaCl çözeltisi eklenerek 65°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra tüpteki toplam sıvı miktarı kadar (eşit hacimde) kloroform/izoamilalkol çözeltisinden eklenerek 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek üst fazlar yeni tüplere alınmıştır. Bu işlem 2-3 kez tekrar edilmiştir. Yeni tüplerdeki toplam hacim kadar eşit hacimde fenol-kloroform/izoamilalkol çözeltisinden ilave edilerek 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve üst fazlar yeni tüplere alınmıştır. Yeni tüplere içindeki hacmin 0.6 katı kadar izopropanol eklenmiş ve DNA çökünceye kadar alt üst edilerek 15000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılarak tüplere 50 µL % 70'lik etanol eklenerek uçurulmuştur. Son olarak tüplerdeki DNA 50 µL 50 mM pH 8.0 Tris-EDTA tamponu içerisinde hafifçe vurularak çözdürülmüştür.

İzole edilen DNA'lar % 1'lik agaroz jel elektroforezinde 80 Voltta 2 saat yürütülerek kontrol edilmiş ve -20 °C'de saklanmıştır.

2.2.5.2. 16S rRNA Geninin Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemiyle Çoğaltılması

PZR işleminde 16S rRNA geninin nükleotit dizisi belirlenerek, izole edilen mikroorganizmaların moleküler tanımlanması yapılacaktır. Gen bölgesinin Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltabilmek için 27 F ve 1492 R universal primerleri kullanılmıştır. 27 F primerinin baz dizilimi

5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3' iken

1492 R primerinin baz dizilimi

5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' dür.

Gen bölgesini çoğaltmak için örnek başına kullanılan 30 µL'lik PZR reaksiyon karışımı aşağıdaki gibidir.

- 3 µL 10X PCR Buffer
- 1,4 µL dNTP
- 1 µL Forward primer
- 1 µL Reverse primer
- 0,2 µL Taq DNA polimeraz (5U/µL)
- 1 µL MgCl₂
- 4 µL DNA
- 18,4 µL distile su

Oluşturulan PZR karışımı Thermal Cycler'da yürülen prosedür aşağıdaki gibidir.

- 5 dakika 95 °C'de ön ısıtma; 1 Döngü
 - 45 saniye 95 °C'de denaturasyon
 - 45 saniye 52 °C'de primer bağlanması
 - 90 saniye 72 °C'de uzama
 - 5 dakika 72 °C'de son uzama; 1 Döngü
- } ; 28 Döngü

2.2.5.2.1. PZR Optimizasyonu

PZR birçok faktörden etkilenebildiği için 16S rRNA geninin nükleotid dizisini çıkartmakta kullanılacak olan PZR ürünlerinin en uygun şekilde sentezlenmiş olması gerekmektedir. 1 mM ile 2,33 mM arasındaki beş MgCl₂ konsantrasyonu ve 50-55 °C arasındaki bağlanma sıcaklıkları PZR optimizasyonu için denenmiştir.

En uygun bağlanma sıcaklıkları ve MgCl₂ konsantrasyonları belirlen izolatların, uygun şartlarda 16S rRNA genleri PZR ile çoğaltılmış ve PZR ürünlerinin doğruluğu % 1'lik agaroz jel elektroforezinde 1000 baz çifti içeren markerla birlikte 80 Volttan 60 dakika yürütülerek kontrol edilmiştir. Sekans analizi yapılanaya kadar PZR örnekleri -20 °C'de saklanmıştır.

2.2.5.3. 16S rRNA Sekans Analizi ile Bakterilerin İdentifikasyonu ve Filogenetik Analiz

PZR ile çoğaltılan 16S rRNA geninin sekans analizi hizmet alımı şeklinde MedSanTek şirketine yaptırılmıştır. Elde edilen sekans sonuçları National Center for Biotechnology Information (NCBI)'nin 16S rRNA veritabanındaki verilerle eşleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlarla akrabalık ilişkilerini belirlemek amacıyla Molecular Evolutionary Genetics Analysis 7 (MEGA7) programı kullanılmıştır. MEGA7 ile öncelikle veri tabanındaki veriler ile örneklerimizin nükleotit dizileri eşitlenmiş ve bu verilerle istatistiksel güvenilirlik sağlanarak uzaklık (distance) matriksi çizilmiştir. Daha sonrasında uzaklık matriksi kullanılarak *Neighbor-Joining metodu ile* soyağaçları çizilerek yakınlık dereceleri belirlenmiştir.

2.2.5.4. Mikroorganizmaların ARDRA Yöntemi ile Birbirinden Ayrılması

16S rRNA analizi mikroorganizmaların cinslerini belirlemede oldukça başarılı olmasına rağmen tür düzeyinde ayırım özellikle *Bacillus* cinsinde oldukça zordur. 16S sekans analizi oldukça birbirine benzeyen *Bacillus* cinsinde ayırım yapabilmek

için 16S rRNA geninin restriksiyon enzimleriyle kesim yöntemi olan ARDRA kullanılmış ve mikroorganizmalar arasındaki farklılıklara araştırılmıştır.

ARDRA yönteminde üç tane restriksiyon enzimi (HaeIII (BsuRI), TaqI ve AluI) kullanılmıştır. Bu enzimler ile kesim yaparken aşağıdaki prosedür uygulanmıştır.

2.2.5.4.1. HaeIII (BsuRI) Restriksiyon Enziminin Kesim Prosedürü

- 10 µL 16S rRNA PZR ürünü
- 18 µL nükleaz içermeyen distile su
- 2 µL Buffer R
- 2 µL BsuRI enzimi (10U/ µL)

Karışım hafifçe karıştırılarak 37 °C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında % 2,5'luk agaroz jelde 100 Voltta 100 bp ladder ile birlikte 1 saat yürütülmüştür.

2.2.5.4.2. TaqI Restriksiyon Enziminin Kesim Prosedürü

- 10 µL 16S rRNA PZR ürünü
- 18 µL nükleaz içermeyen distile su
- 2 µL Buffer TaqI
- 2 µL TaqI enzimi (10U/ µL)

Karışım hafifçe karıştırılarak 65 °C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında % 2,5'luk agaroz jelde 100 Voltta 100 bp ladder ile birlikte 1 saat yürütülmüştür.

2.2.5.4.3. AluI Restriksiyon Enziminin Kesim Prosedürü

- 10 µL 16S rRNA PZR ürünü
- 18 µL nükleaz içermeyen distile su
- 2 µL Tango Buffer
- 2 µL AluI enzimi (10U/ µL)

Karışım hafifçe karıştırılarak 37 °C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında % 2,5'luk agaroz jelde 100 Volta 100 bp ladder ile birlikte 1 saat yürütülmüştür.

2.2.6. Mikroorganizmaların Proteaz Enzimi Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi

2.2.6.1. Proteaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Takami (1989)'nin kullanmış olduğu yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır [123]. Bu yöntemde uygun besiyerinde inkübasyonu tamamlanan örnekler 5000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. 3 tekrarlı olacak şekilde 1,5 mL'lik santrifüj tüplerine substrat olarak % 0,6 kazein içeren (pH 9.0) 50 mM Glisin-NaOH tamponundan 0,5 mL alınarak daha önceden hazırlanmış olan 0.1 mL besiyeri üst sıvısı (enzim kaynağı) eklenerek 37 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Ardından reaksiyonu durdurmak için 0,5 mL TCA solüsyonundan eklenip alt üst edildikten sonra 30 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir. Ardından tüpler 12000 rpm'de 7 dakika santrifüj edilerek ortamda kalan fazla substrat uzaklaştırılmıştır.

Santrifüj sonrası 96'luk well plate'lere 3 tekrarlı olarak; 25 µL süpernatant alınıp üzerine 125 µL 0,5 M Na₂CO₃ ile 25 µL 1 N Folin-ciocalteu's phenol reaktifi eklenmiş ve 30 dakika oda sıcaklığında olan karanlık ortamda bekletilmiştir. Süre sonunda well plate'ler 660 nm'ye ayarlanmış mikropilaka okuyucuda (Biotek, PowerWave XS2) okutulmuş ve sonuçlar tekrarların ortalamaları alınarak kaydedilmiş, sonrasında tirozin eğrisinden açığa çıkan tirozin miktarlarıyla enzim üniteleri belirlenmiştir.

2.2.6.2. Tirozin Standart Grafiği

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan tirozinin ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi için 10 mg/mL tirozin pH 9.0 50 mM Glisin-NaOH tamponunda çözdürülerek stok hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200 µg/mL olacak şekilde seyreltmeler yapılmıştır. Hazırlanan seyreltmelerden 3 tekrarlı olacak şekilde; 25 µL alınmış ve üzerine sırasıyla 125 µL 0.5 M Na₂CO₃ ile 25 µL 1N Folin-ciocalteu's phenol reaktifi eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda her seyreltmenin 660 nm'deki optik yoğunluğu ölçülerek tekrarların ortalama sonuçlarıyla standart grafik çizilmiştir. Standart grafikteki eğim, (formüldeki X değerinin katsayısı) Ekstinksiyon katsayısı olarak alınmıştır.

Bir ünite (U/mL) proteaz enzimi, 37 °C'de, dakikada 1 µg tirozinin açığa çıkması için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Aktivitenin hesaplanması aşağıdaki formüle göre yapılmıştır [124].

$$\text{Enzim Aktivitesi(U/ml)} = \frac{(\text{OD660/eğim}) \times \text{Toplam Hacim}}{\text{Enzim Hacmi (ml)} \times \text{İnkübasyon Süresi}} \quad (2.1)$$

2.2.6.3. Enzim Üretimi İçin Optimum Sıcaklık, pH ve Sürenin Belirlenmesi

Her mikroorganizma için pH'sı 7.0, 9.0 ve 12 olan; 6 mL Enzim besiyeri ve 6 mL Nutrient broth besiyeri tüplerde steril edildikten sonra 0.5 Mc-Farland değerine ayarlanmış mikroorganizma süspansiyonları tüplere % 5 oranında aşılacaktır. Besiyerleri sıcaklığı 17, 27, 37 ve 50 °C olan çalkalamalı etüvlerde 140 rpm'de 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında 2.2.6.1'de belirtilen Proteaz aktivitesi deneyi yapılarak enzim üniteleri hesaplanmıştır.

2.2.7. Farklı Üreme Ortamlarının Proteaz Aktivitesine Etkisi

2.2.7.1. Kullanılan Enzim Besiyeri İçerik Değişikliklerinin Aktiviteye Etkisi

Proteaz Üretimi için Gessesse ve ark. (1997)'nin önerdiği besiyerini oluşturan organik ve inorganik bileşenlerin miktarları değiştirilerek enzim aktivitesine etkisi belirlenmiştir [121]. İnkübasyon süresi sonunda enzim aktiviteleri bölüm 2.2.6.1'da açıklanan yöntem kullanılarak ölçülmüştür.

Organik bileşiklerin enzim aktivitesine etkisi belirlenirken besiyerinde bulunan organik bileşikler (pepton, maya ekstratı ve kazein) miktarları; yok, 2 ve 5 katı olacak şekilde hazırlanmıştır. Kontrol olarak Gessesse ve ark.(1997)'nin önerdiği besiyeri kullanılmıştır.

İnorganik bileşiklerin enzim aktivitesine etkisi belirlenirken besiyerinde bulunan inorganik bileşikler (NaCl, MgSO₄, CaCl₂, ve K₂HPO₄) miktarları; yok, 2 ve 5 katı olacak şekilde hazırlanmıştır. Kontrol olarak Gessesse ve ark.(1997)'nin önerdiği besiyeri kullanılmıştır.

2.2.7.2. Organik Bileşik Olarak Sadece Azot Kaynağı Kullanılan Besiyerlerinin Enzim Aktivitesi

Gessesse ve ark. (1997) de kullanmış olduğu besiyerindeki inorganik bileşikler olan NaCl, MgSO₄, CaCl₂, ve K₂HPO₄ miktarları aynı şekilde kullanılıp, organik bileşik olarak maliyeti düşürmek adına sadece tek azot kaynağı eklenerek besi yeri hazırlanmış ve mikroorganizma ekilen ortamlar uygun şartlarda inkubasyona bırakılıp enzim aktiviteleri bölüm 2.2.6.1'da açıklanan yöntem kullanılarak ölçülmüştür.

Azot kaynağı olarak pepton, maya özütü, et özütü, jelatin, kazein, skimmilk, üre, tripton ve soya unu kullanılmıştır. Azot kaynaklarının miktarı ise 5 g/L ve 12 g/L olacak şekilde hazırlanmıştır.

2.2.7.3. Farklı Karbon Kaynaklarının Proteaz Aktivitesine Etkisi

Gessesse ve ark. (1997) de kullanmış olduğu besiyeri içerisine farklı karbon kaynakları eklenerek karbon kaynaklarının enzim aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Karbon kaynağı olarak; glukoz, nişasta, laktoz, fruktoz, sukroz ve galaktoz kullanılmıştır. Karbon kaynaklarının miktarı ise 1 g/L ve 5 g/L olacak şekilde hazırlanmıştır. Mikroorganizma ekilen besiyerleri uygun şartlarda inkubasyona bırakılıp enzim aktiviteleri bölüm 2.2.6.1'da açıklanan yöntem kullanılarak ölçülmüştür.

2.2.7.4. Farklı İnorganik Azot Kaynaklarının Proteaz Aktivitesine Etkisi

Gessesse ve ark. (1997) de kullanmış olduğu besiyeri içerisine farklı inorganik azot tuzları eklenerek inorganik azot kaynaklarının enzim aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Azot tuzları olarak amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄), amonyum asetat (C₂H₇NO₂), sodyum nitrat (NaNO₃) ve kalsiyum nitrat (Ca(NO₃)₂) kullanılmıştır. Besiyeri içersine litrede 0,1 gram ve 1 gram olacak şekilde ayrı ayrı eklenmiştir. Mikroorganizma ekilen ortamlar uygun şartlarda inkubasyona bırakılıp enzim aktiviteleri bölüm 2.2.6.1'da açıklanan yöntem kullanılarak ölçülmüştür.

2.2.7.5. Optimize Edilmiş Modifiye Besi Yerinde Enzim Aktivitesi

2.2.7.1'de ki yöntemle elde edilen sonuçlar dikkate alınarak modifiye besiyeri hazırlanmıştır. Besiyeri içeriklerinden aktiviteyi kontrole göre % 20 oranından fazla arttıranlar ayrı ayrı seçilerek bu besiyeri oluşturulmuştur. Bu besiyerine mikroorganizma aşılması yapılan tüpler uygun şartlarda inkübasyona bırakılıp enzim aktiviteleri enzim aktiviteleri bölüm 2.2.6.1'da açıklanan yöntem kullanılarak ölçülmüştür. Modifiye besiyeri içeriği aşağıda verilmiştir.

Pepton	25 g
Maya özütü	10 g
Kazein	10 g
NaCl	5 g
MgSO ₄	0,2 g
CaCl ₂	0,1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Distile Su	1000 mL

2.2.7.6. Et-Kazein Besi Yerinde Enzim Aktivitesi

2.2.7.2'de ki yöntemle elde edilen sonuçlar dikkate alınarak Et-Kazein besiyeri hazırlanmıştır. Besiyeri içeriklerinden aktiviteyi kontrole göre % 20 oranından fazla arttıranlar ayrı ayrı seçilerek bu besiyeri oluşturulmuştur. Bu besiyerine mikroorganizma aşılması yapılan tüpler uygun şartlarda inkübasyona bırakılıp enzim aktiviteleri bölüm 2.2.6.1'da açıklanan yöntem kullanılarak ölçülmüştür. Et-Kazein besiyeri içeriği aşağıda verilmiştir.

Et Özütü	6 g
Kazein	6 g
NaCl	5 g
MgSO ₄	0.2 g
CaCl ₂	0.1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Distile Su	1000 mL

2.2.8. Rekabetin Proteaz Enzimi Üzerine Etkisi

Mikroorganizmalar arasındaki rekabet şartları oluştuğunda bu durumun proteaz enzimi üretimine etkisini araştırmak amacıyla, enzim besi yerine izole edilen Gram pozitif bir izolat ile başka bir izole edilen Gram pozitif izolat ve izole edilen Gram pozitif bir izolat ile gram negatif bir izolatu rekabete sokmak amacıyla enzim besi yerine iki izolat ekilmiş ve uygun şartlardaki inkübasyon sonrası enzim aktiviteleri enzim aktiviteleri bölüm 2.2.6.1’da açıklanan yöntem kullanılarak ölçülmüştür.

2.2.9. Aşılama Miktarının Aktiviteye Etkisi

Aşılama (inokulum) miktarının enzim aktivitesine etkisini araştırmak amacıyla, enzim besiyerimize % 1, % 5, % 10 ve % 20 oranında aşılama yapılmış ve uygun şartlarda inkübasyona bırakarak enzim aktiviteleri enzim aktiviteleri bölüm 2.2.6.1’da açıklanan yöntem kullanılarak ölçülmüştür.

2.2.10. Bazı *Bacillus* Cinsi Mikroorganizmalar İle İzole Edilen İzolatın Proteaz Aktivitesinin Karşılaştırılması

Endüstride en fazla kullanılan mikroorganizma olan *Bacillus* cinsi mikroorganizmalardan *Bacillus cereus* ATCC 10876 ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633 enzim aktivitesi kendi izole ettiğimiz mikroorganizmanın proteaz aktivitesi ile karşılaştırılmıştır.

2.2.11. Proteaz Enziminin Kararlılığı

Enzim kaynağı olarak enzim besiyerinde uygun şartlarda üretilmiş mikroorganizmamızın inkübasyon sonrası 5000 rpm’de 25 dakika santifüj edilmesiyle oluşan üst sıvı (süpernatan) enzim kaynağı olarak kullanılmış ve enzim kararlılığının belirlenmesinde bu üst sıvı kullanılmıştır.

2.2.11.1. Enzimin Optimum Çalışma Sıcaklığının Saptanması

Elde ettiğimiz enzimimizin en uygun çalışma sıcaklığını belirleyebilmek amacıyla, 17 °C, 27 °C, 37 °C (kontrol), 50 °C, 60 °C, 70°C ve 80 °C'de substrat (% 0.6'lık kazein) - enzim (süpernat) karışımı 20 dakika tutularak enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

2.2.11.2. Enzimin Optimum Çalışma pH'sının Saptanması

Proteaz enzimimizin en uygun aktivite gösterdiği pH değerini saptamak için Besi yeri üst sıvısı pH'sı 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 ve 12.0 olarak ayarlanmış % 0,6 kazein içeren 50 mM Glisin-NaOH tampunda bölüm 2.2.6.1'da belirtilen proteaz aktivitesinin ölçülmesi yöntemine göre yapılmıştır.

2.2.11.3. Enzim Aktivitesine Metal İyonları, Sürfektanlar, İnhibitörler, Deterjan, Organik çözücüler, Oksidan ve Farklı Substratların Etkisi

2.2.11.3.1. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi

Metal iyonlarının proteaz aktivitesine etkisini belirleyebilmek amacıyla +1 değerlikli (LiCl, NaCl, KCl), +2 değerlikli (Co(NO₃)₂, ZnSO₄, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, Sr(NO₃)₂, MnSO₄, Pb(NO₃)₂, NiSO₄, SrCl₂, CuCl₂, MgSO₄, ZnNO₃, CaCl₂, MgCl₂) ve +3 değerlikli (Cr(NO₃)₃, AlCl₃, FeCl₃) metal tuzları kullanılmıştır. Enzim aktivitesini belirlerken 0,1 mL enzim kaynağı ile 0,5 mL % 0,6 kazein içeren 50 mM pH 9'daki Glisin-NaOH tamponu birleştirilerek son konsantrasyonu 2 mM ve 10 mM olacak şekilde metal iyonu içeren tuzlar eklenmiş ve 20 dk 37 °C'de inkübe edilip bölüm 2.2.6.1 de belirtilen yöntemle bu şekilde devam edilerek aktivite ölçülmüştür.

2.2.11.3.2. İnhibitörlerin Proteaz Aktivitesine Etkisi

İnhibitörlerin proteaz enzim aktivitesine etkisini belirlemek amacıyla serin proteaz inhibitörü PMSF, Metalloproteaz inhibitörü EDTA, CuSO₄ ve DPPH kullanılmıştır. İnhibitörler, 0,1 mL enzim kaynağı (besi yeri üst sıvısı) ile 0,5 mL % 0.6 kazein içeren 50 mM pH 9'daki Glisin-NaOH tamponu birleştirilerek son konsantrasyonları 2 mM ve 10 mM olacak şekilde eklenmiş ve 20 dk 37 °C'de inkübe edilip bölüm 2.2.6.1 de belirtilen yöntemle bu şekilde devam edilerek aktivite ölçülmüştür.

2.2.11.3.3. Organik Çözücülerin Proteaz Aktivitesine Etkisi

Organik çözücülerin proteaz enzim aktivitesine etkisini belirlemek amacıyla; Toluen, heptan, metanol, aseton, DMSO (dimetilsülfoksit), etanol, 2-propanol, hegzan, asetonitril ve benzen kullanılmıştır. Organik çözücüler, 0,1 mL enzim kaynağı (besi yeri üst sıvısı) ile 0,5 mL % 0.6 kazein içeren 50 mM pH 9'daki Glisin-NaOH tamponu birleştirilerek son konsantrasyonları % 10 (v/v) ve % 25 (v/v) olacak şekilde eklenmiş ve 20 dakika 37 °C'de inkübe edilip bölüm 2.2.6.1 de belirtilen yöntemle bu şekilde devam edilerek aktivite ölçülmüştür.

2.2.11.3.4. Sürfektanların, Deterjanların ve Oksidanların Proteaz Aktivitesine Etkisi

Sürfektanların, deterjanların ve oksidanların proteaz enzim aktivitesine etkisini belirlemek amacıyla; Tween-80, Triton X-100, SDS ve H₂O₂ kullanılmıştır. Sürfektanlar, deterjan ve oksidanlar, 0,1 mL enzim kaynağı (besi yeri üst sıvısı) ile 0,5 mL % 0.6 kazein içeren 50 mM pH 9'daki Glisin-NaOH tamponu birleştirilerek son konsantrasyonları % 1 (v/v) ve % 5 (v/v) olacak şekilde eklenmiş ve 20 dakika 37 °C'de inkübe edilip bölüm 2.2.6.1 de belirtilen yöntemle bu şekilde devam edilerek aktivite ölçülmüştür.

2.2.11.3.5. Farklı Substratların Proteaz Aktivitesine Etkisi

Farklı Substratların proteaz enzim aktivitesine etkisini belirlemek amacıyla substrat olarak jelatin, bovine serum albumin (BSA), ovalbumin ve soya unu kullanılmıştır. 0.1 mL enzim kaynağı(besiyeri üst sıvısı) ile 0,5 mL % 0.6 farklı substratları (jelatin, sığır serum albumini (BSA), ovalbumin ve soya unu) içeren 50 mM pH 9'daki Glisin-NaOH tamponu birleştirilerek 20 dk 37 °C'de inkübe edilip bölüm 2.2.6.1'de belirtilen yöntem devam edilerek aktivite ölçülmüştür. Kontrol olarak % 0.6 kazein içeren 50 mM pH 9'daki Glisin-NaOH tamponundaki aktivite kullanılmıştır.

2.2.12. Bradford Yöntemi ile Protein miktarlarının hesaplanması

Bradford Çözeltisi hazırlarken 10 mg coomassie brilliant blue G-250 5 mL % 95'lik etil alkolde çözdürülüp, 10 mL % 85'lik fosforik asit eklenmiş ve 100 mL'ye tamamlanmıştır [125].

Daha sonra 50 µL örnek alınıp 200 µL Bradford çözeltisinden eklenip 3 dakika beklendikten sonra 595 nm ye ayarlanmış mikropilaya okuyucuda absorbanları belirlenmiştir.

2.2.12.1. Bradford Standart Grafiği

1 mg/mL stok sığır serum albumini (BSA) hazırlanıp 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL ve 200 µg/mL olacak şekilde sulandırılmalar yapılmıştır. Bu sulandırmalardan 50 µL alınarak üzerine 200 µL Bradford çözeltisinden eklenip 3 dakika beklendikten sonra 595 nm ye ayarlanmış mikropilaya okuyucuda absorbanları belirlenip standart grafiği çizilmiştir. Standart grafikteki eğim, (formüldeki X değerinin katsayısı) Ekstinksiyon katsayısı olarak alınmıştır.

$$\text{Protein miktarı } (\mu\text{g/mL}) = \frac{(\text{OD595})/\text{Eğim}}{1000} \quad (2.2)$$

2.2.13. Üretilen Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

Saflaştırma işleminde uygun şartlarda üretilen mikroorganizmalar 5000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı enzim kaynağı olarak kabul edilerek bu üst sıvıya saflaştırma işlemleri uygulanmıştır. Elde edilen üst sıvıya saflaştırma işlemleri sırasıyla;

Amonyum sülfat çöktürmesi

Diyaliz

DEAE iyon değiştirici kromatografi işlemleri yapılmıştır.

Bu işlemlere tabi tutulan enzimin protein miktarları Bradford Yöntemi ile belirlenmiş ve saflaştırılan proteinlerin moleküler büyüklükleri SDS-PAGE analizi ile saptanmıştır [125].

2.2.13.1. Amonyum sülfat(NH_4) $_2$ SO $_4$) Çöktürmesi ile Kısmi Saflaştırma

Amonyum sülfat çöktürmesinde öncelikle % 30 ve % 80 amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır.

Amonyum sülfat çöktürmesinde gerekli olan tuz miktarlarını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$100 \text{ mL sıvı için gerekli Amonyum sülfat miktarı} = \frac{[50.6 \times (S_2 - S_1)]}{[1 - (0,3 \times S_2)]} \quad (2.3)$$

5000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı enzim kaynağı olarak kabul edilen üst sıvıya % 30 'luk Amonyum sülfat çöktürmesi için gerekli tuz miktarı hesaplanarak +4 °C'de üst sıvıya yavaş yavaş amonyum sülfat eklenerek manyetik

karıştırıcıda tuzlar iyice çözüne dek yavaşça karıştırılmıştır. Tüm tuz çözdürülünce karışım 11000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvıdan protein miktarı ve enzim aktivitesi için yeterli miktarda ayrılıp kalan sıvı için % 80'lik amonyum sülfat çöktürmesi için gerekli amonyum sülfat miktarı formülden hesaplanmıştır.

Hesaplanan amonyum sülfat % 30'luk çöktürme yapılan sıvıya yine + 4 °C'de, manyetik karıştırıcıda yavaş yavaş eklenerek çözdürülmüş ve bir gece +4 °C'de bekletilmiştir. % 80'lik çöktürme yapılan örnek sonrasında 11000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvıdan protein miktarı ve aktivite için gerekli miktarda örnek alınıp üst sıvı atılmış, pelet 50 mM (pH 7.0) fosfat tamponunda en düşük hacimde çözdürülmüştür.

2.2.13.2. Diyaliz ile Kısmi Saflaştırma

Öncelikle diyaliz membranlarını kullanıma hazır hale getirebilmek için üretici firmanın (D9527 SIGMA) belirlediği prosedürle diyaliz tüpleri hazırlanmıştır.

Bu prosedüre göre, Diyaliz membranlarının içersinden gliserolün uzaklaştırılması amacıyla öncelikle 4 saat akan suyu ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında kükürtlü bileşikleri uzaklaştırmak için 80 °C'de son konsantrasyonu % 0.3 (w/v) olacak şekilde sodyum sülfid eklenmiştir ve 1 dakika kaynatılmıştır. 60 °C'de 2 dakika sıcak distile su ile yıkandıktan sonra, son konsantrasyonu % 0.2 (v/v) olacak şekilde sülfirik asit eklenmiştir. Daha sonra sıcak su ile yıkanarak sülfirik asit uzaklaştırılmış ve diyaliz membranları kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Kullanıma hazır hale gelen diyaliz membranlarına % 80'lik çöktürme yapılan fosfat tamponunda çözdürülmüş pelet eklenerek, aynı tampona karşı 120 rpm'de +4 °C'de 12 saat diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Her 4 saatte bir diyaliz tamponu değiştirilmiştir.

2.2.13.3. DEAE iyon Değiştirici Kromotografi İle Kısmi Saflaştırma

5 mL DEAE-Sepharose iyon değiştirici kolon materyali (DCL6B100 SIGMA) alınarak üzerine 50 mL, 50 mM (pH 7.0) fosfat tamponu eklenmiş ve iyice karıştırılarak kolon materyali kullanıma hazır hale gelmiştir.

Kromotografi kolonunu hazır hale getirmek için kolon 250 mL 50 mM pH 7 fosfat tamponu geçirilerek yıkanmıştır. Hazırlanmış DEAE-Sepharose iyon değiştirici kolon materyalinden 50 mL kolona yavaşça eklenip 5 katı (250 mL) fosfat tamponuyla yıkanmıştır. Kolon dolgu materyali yerleşip dengelenince diyalizden çıkan örnek kolona yüklenmiş ve üzerine 10 mL fosfat tamponu eklenerek 1ml/dk akış hızında kolon kurumayacak şekilde fraksiyonlar 1,5 mL'lik tüplere toplanmıştır. Daha sonra tuz yoğunluğunu değiştirerek 10 mL 10 mM NaCl içeren fosfat tamponu eklenerek 1 mL/dk akış hızında kolon kurumayacak şekilde fraksiyonlar 1,5 mL'lik tüplere toplanmıştır. Tuz yoğunluğu 100 mM çıkartılarak 10 mL 100 mM NaCl içeren fosfat tamponu eklenerek 1 mL/dk akış hızında kolon kurumayacak şekilde fraksiyonlar 1,5 mL'lik tüplere toplanmaya devam edilmiştir. Son olarak 10 mL 1 M NaCl içeren fosfat tamponu eklenerek 1 mL/dk akış hızında 1,5 mL'lik tüplere toplanmıştır. Her fraksiyonun protein miktarları Bradford yöntemi ile ölçülmüş ve proteaz aktiviteleri hesaplanmıştır.

2.2.14. SDS-PAGE ile Proteaz Enziminin Moleküler Büyüklüğünün Belirlenmesi

Saflaştırılan proteaz enziminin moleküler büyüklüğünü belirlemek amacıyla SDS-PAGE elektroforezi yapılmıştır. Camlar distile su ile iyice yıkandıktan sonra pürüzsüz olması için % 70'lik etil alkol ile yıkanmış ve hava ile kurutulmuştur. Camların arasına $\frac{3}{4}$ ' % 10'luk ayırma jeli ilave edip bir saat polimerleşmesi beklenmiştir. Süre sonunda % 4'lk yükleme jeli camlar arasında kalan kısma dökülüp taraklar yerleştirilmif ve 30 dakika jelin polimerleşmesi beklenmiştir. Bu arada 10 μ L 4X rnek yükleme tamponu ile 10 μ L rnek karıştırılarak 5 dakika kaynayan su üzerinde bekletilmiştir. Yükleme jelide polimerleştikten sonra, camlar

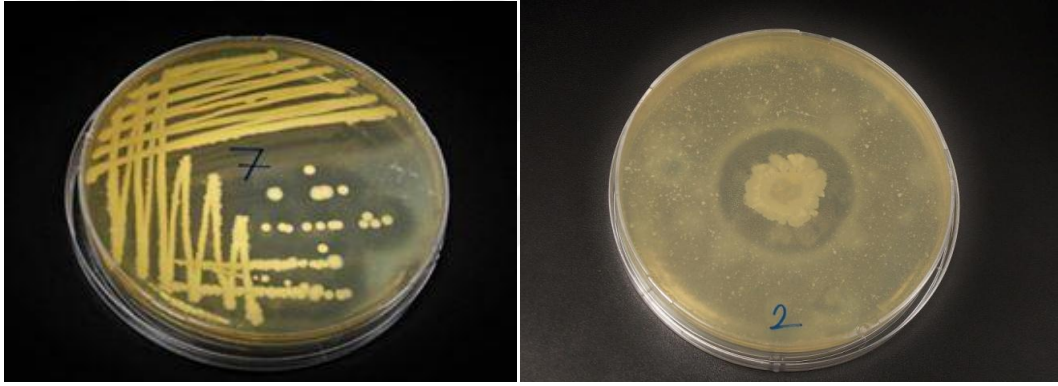
elektroforez tankına yerleştirilmiş ve yürütme tamponu eklendikten sonra taraklar dikkatlice çıkarılmıştır. Örnek yüklemeleri yapıldıktan sonra 150 Voltta 1 saat yürütülmüştür.

Yürütme sonrası Coomassie Brilliant Blue R-250 boyaması yapılmıştır. Boyama işleminde öncelikle proteinlerin jele tutulu kalması için 1 saat tespit çözeltisinde fiske edilmiştir. Daha sonra jel fiksatif yıkama çözeltisi ile birkaç kez yıkandıktan sonra 4 saat Coomassie Brilliant Blue R-250 boyasında bekletilmiştir. Süre sonunda boyadan uzaklaştırmak için Boya giderici çözelti ile boya uzaklaşana kadar beklenmiş ara boya giderici solüsyon değiştirilmiştir. Boya uzaklaştıktan sonra jel beyaz ışık üzerinde incelenmiştir.

3.BULGULAR

3.1. Toprakta Bakteri İzolasyonu

1 g toprak örneğinin % 0.9' luk steril serum fizyolojik ile seri sulandırılmaları yapılmış ve her bir seyreltilmiş örnekten 100 µL alınarak ayırt edici besiyeri olarak kullanılan skimmilk agar besiyerine yayma ekim yapılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılan petrilerde proteaz üreticisi mikroorganizmaları seçmek için petride oluşan zonlar kullanılmıştır. En büyük zon oluşturan ve koloni yapıları farklı olan 6 tane izolat seçilip saflaştırılmıştır. 6 izolat; ORSK-2, ORSK-4, ORSK-5, ORSK-7, ORSK-9 ve ORSK-11 olarak kodlanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Saflaştırma sonrası proteaz üreticisi mikroorganizmalar

3.2. İzolatların En Uygun Üreme Sıcaklığının ve pH Değerinin Belirlenmesi

İzolatların en uygun üreme sıcaklığı ve pH değerini belirlemek için Nutrient Broth besiyerine saflaştırılan izolatlar ekilmiştir. En uygun üreme sıcaklığını belirleyebilmek için besiyeri pH'sı 5.0, 7.0, 9.0 ve 12.0 a ayarlanarak 17 °C, 27 °C, 37 °C, 50 °C'de inkübasyonlara bırakılarak ilk üç gün içerisindeki üremeleri kontrol edilmiştir. İnkübasyon sonrası mikroorganizmalar 600 nm ye ayarlanmış mikropilaka okuyucuda üreme yoğunlukları ölçülmüştür.

ORSK-2 izolatının farklı üreme koşullarındaki üreme yoğunlukları Şekil 3.2’de verilmiştir.

ORSK-2 izolatı 17 °C’de sadece pH 7.0 de üreme göstermiştir. 27 °C de pH 12.0 dışındaki pH değerlerinde üreme gösterirken en yoğun üremeyi pH 7.0 de göstermiştir. 37 °C de pH 12.0 dışında üreme gösterirken en yoğun üremeyi pH 7.0 de göstermiştir. 50 °C de pH 5.0 ve pH 12.0 üreme göstermezken en yoğun üremeyi pH 9.0 da göstermiştir. ORSK-2 izolatı pH 7.0’de tüm sıcaklıklarda üreme gösterirken optimum üreme gösterdiği ortam şartları 27 °C pH 7.0’de 0,638 OD olarak bulunmuştur (Şekil 3.2.).

ORSK-4 izolatının farklı üreme koşullarındaki üreme yoğunlukları Şekil 3.3’de verilmiştir.

ORSK-4 izolatı; 17 °C de pH 5.0 ve pH 12.0 üreme göstermezken en yoğun üremeyi pH 9.0 da göstermiştir. 27 °C de pH 5.0 de üreme göstermezken en yoğun üremeyi pH 9.0 da göstermiştir. 37 °C de pH 5.0 de üreme göstermezken en yoğun üremeyi pH 7.0 da göstermiştir. 50 °C de hiçbir pH’ta üreme göstermemiştir. ORSK-4 izolatının optimum üreme ortamı 37 °C pH 7.0 de 0.368 OD olarak bulunmuştur (Şekil 3.3).

ORSK-5 izolatının farklı üreme koşullarındaki üreme yoğunlukları Şekil 3.4’de verilmiştir.

ORSK-5 izolatı; 17 °C de sadece pH 7.0 de 2.günde üreme göstermiştir. 27 °C de pH 7.0 ve pH 9.0 da 1.günde üreme göstermiştir. Diğer pH larda 3 gün içinde üreme gözlenmemiştir. 37 °C de pH 12.0 dışında tüm pH derlerinde ilk günde üreme göstermiştir. 50 °C de pH 5.0 ve pH 12.0 derlerinde üreme göstermezken pH 7.0 ve pH 9.0 da üreme ilk günde üreme göstermiştir. ORSK-5 izolatının optimum üreme ortamı 50 °C pH 7.0’de 0,351 OD olarak bulunmuştur (Şekil 3.4).

ORSK-7 izolatının farklı üreme koşullarındaki üreme yoğunlukları Şekil 3.5’de verilmiştir.

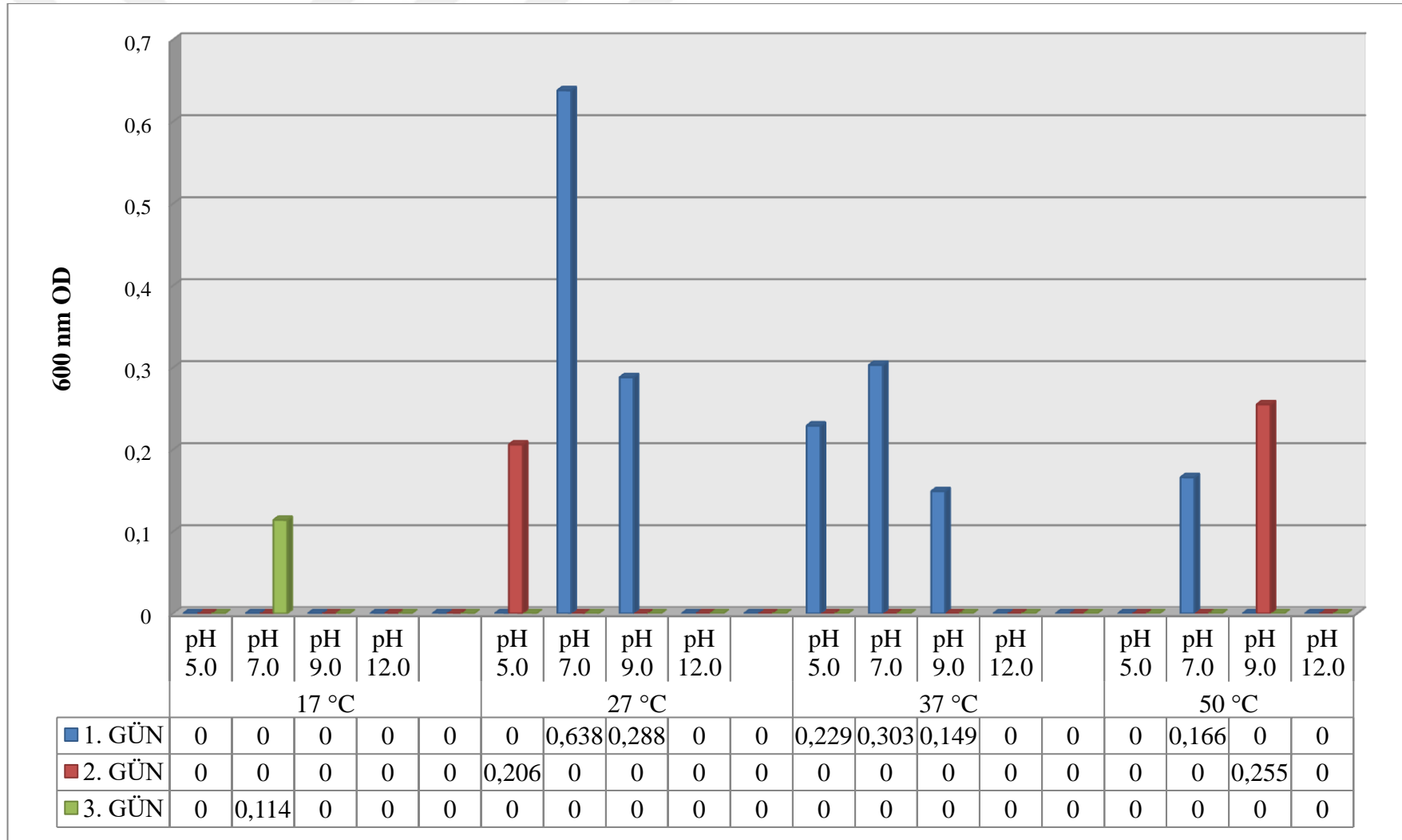
ORSK-7 izolatı; 17 °C de pH 5.0 ve pH 12.0 değerlerinde üreme göstermezken, pH 7.0 ve pH 9.0 da üreme ilk günde üreme göstermiştir. 27 °C de pH 5.0 ve pH 12.0 değerlerinde üreme göstermezken, pH 7.0 ve pH 9.0 da üreme ilk günde üreme göstermiştir. 37 °C de pH 12.0 değerlerinde üreme göstermezken, diğer pH değerlerinde ilk günde üreme göstermiştir. 50 °C'de sadece pH 7.0 değerlerinde üreme gösterirken, diğer pH değerlerinde üç günde üreme göstermemiştir. ORSK-7 izolatının optimum üreme ortamı 37 °C pH 5.0'ta 0,378 OD olarak bulunmuştur (Şekil.3.5).

ORSK-9 izolatının farklı üreme koşullarındaki üreme yoğunlukları Şekil 3.6'de verilmiştir.

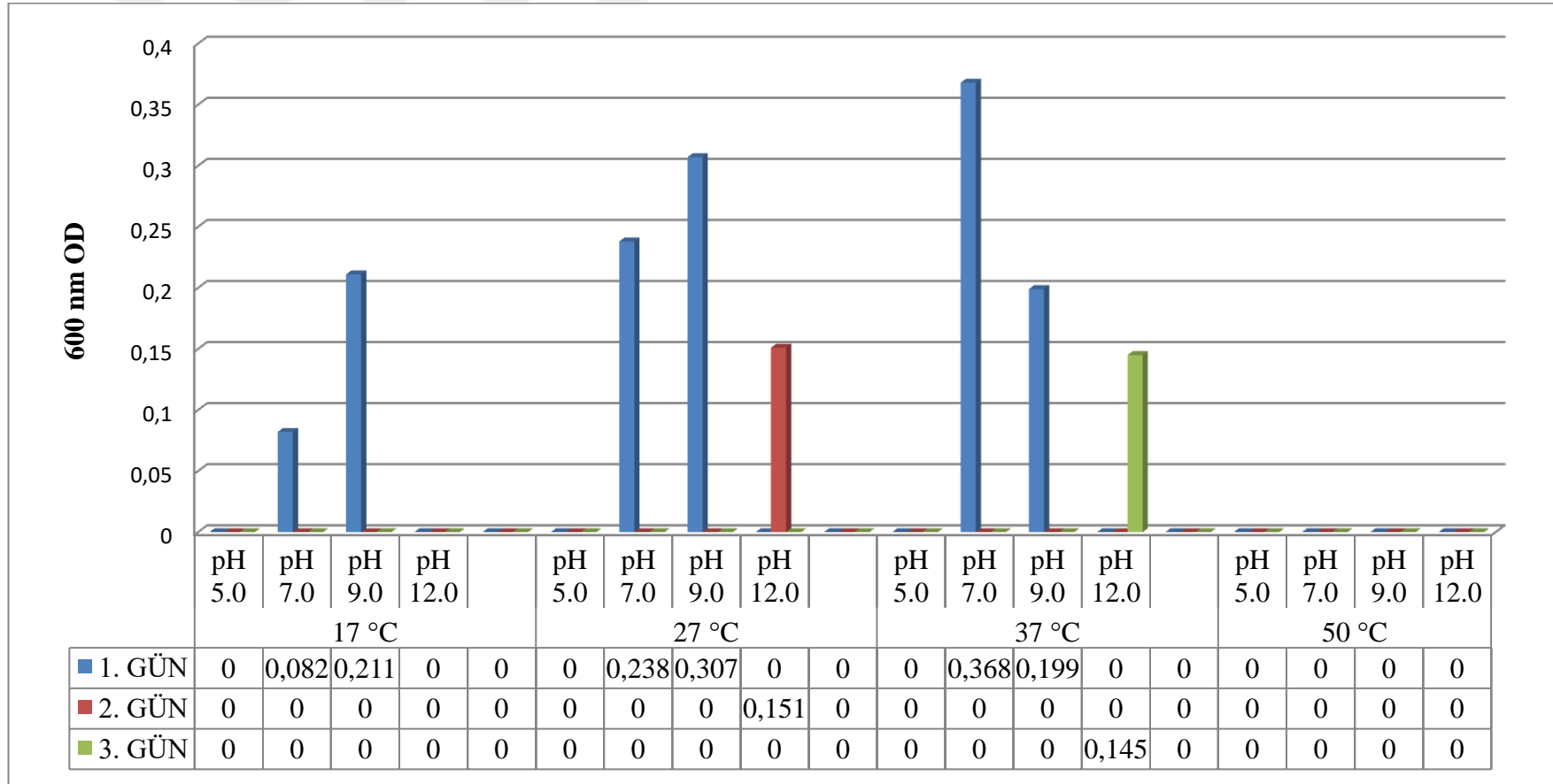
ORSK-9 izolatı; 17 °C'de pH 7.0 ve pH 9.0 değerlerinde üreme gösterirken diğer pH'larda üç günde üreme göstermemiştir. 27 °C'de pH 5.0 pH 7.0 ve pH 9.0 değerlerinde ilk günde üreme gösterirken, pH 12.0'da ikinci günde üreme göstermiştir. 37 °C'de pH 5.0 pH 7.0 ve pH 9.0 değerlerinde ilk günde üreme gösterirken, pH 12.0'da üçüncü günde üreme göstermiştir. 50 °C'de ilk üç günde hiçbir pH'ta üreme göstermemiştir. ORSK-9 izolatının optimum üreme ortamı 37 °C pH 12.0'de 0,374 OD olarak bulunmuştur (Şekil 3.6).

ORSK-11 izolatının farklı üreme koşullarındaki üreme yoğunlukları Şekil 3.7'de verilmiştir.

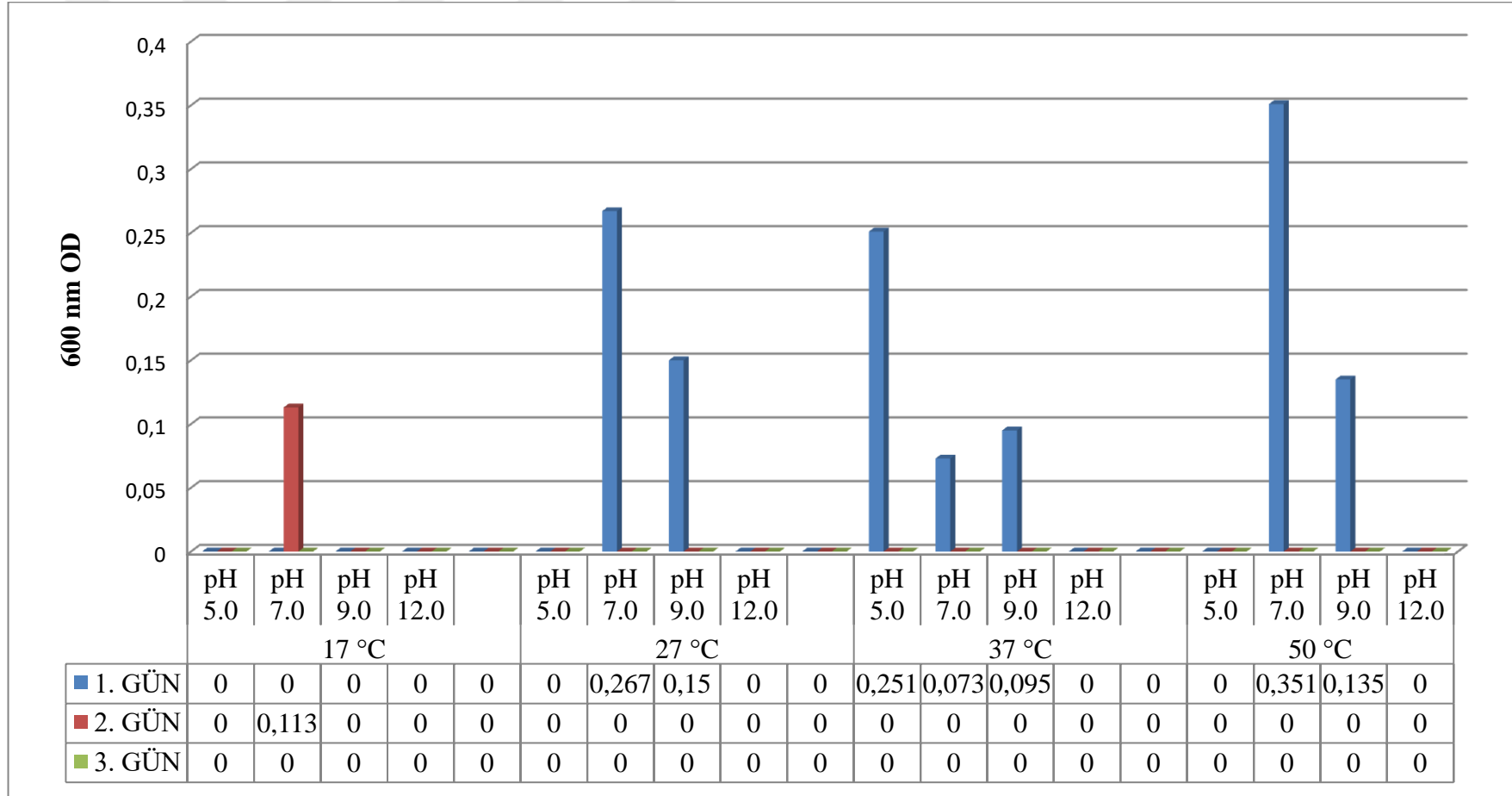
ORSK-11 izolatı; 17 °C'de sadece pH 7.0 ve pH 9.0 değerlerinde üreme göstermiştir. 27 °C'de pH 5.0, pH 7.0 ve pH 9.0 değerlerinde üreme gösterirken diğer pH 12.0'da üç günde de üreme göstermemiştir. 37 °C'de pH 7.0 ve pH 9.0 da birinci günde üreme gösterirken, pH 5.0'de ikinci günde, pH 12.0 de üçüncü günde üreme göstermiştir. 50 °C'de ilk üç günde hiçbir pH'ta üreme göstermemiştir. ORSK-11 izolatının optimum üreme ortamı 37 °C pH 5.0'ta 0,272 OD olarak bulunmuştur (Şekil 3.7).



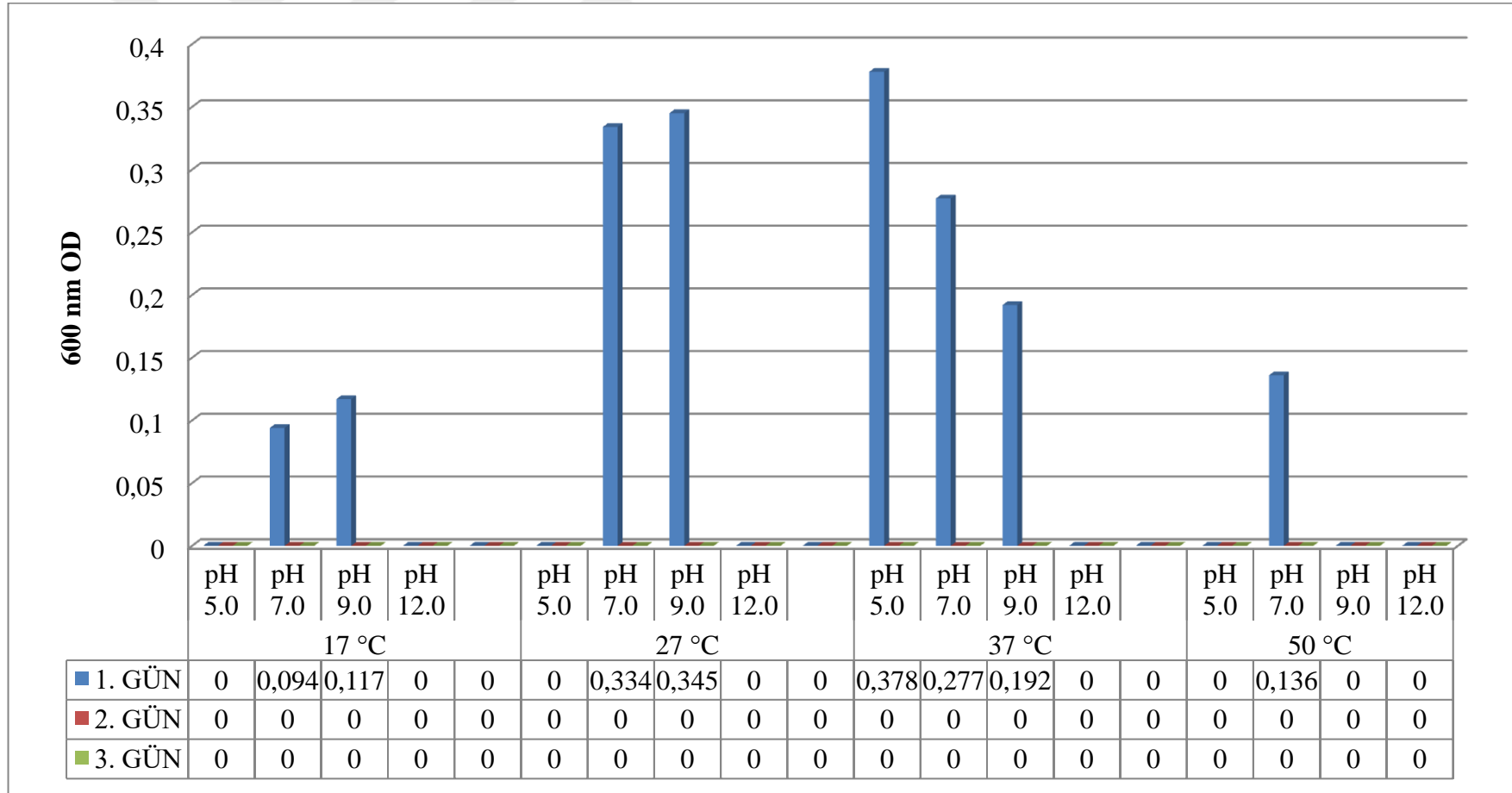
Şekil 3.2. ORSK-2 izolatının en uygun üreme koşullarının belirlenmesi



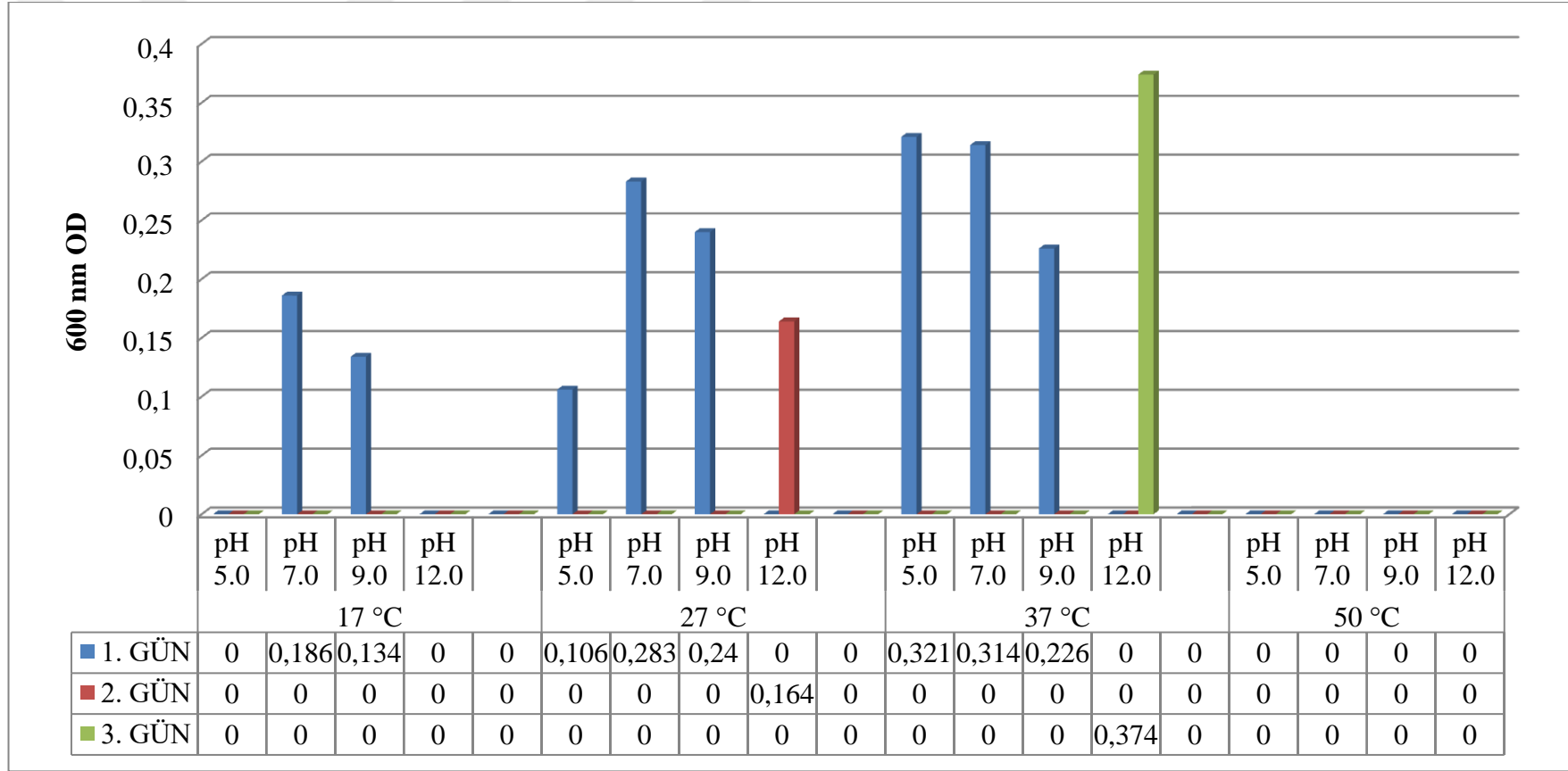
Şekil 3.3. ORSK-4 izolatının en uygun üreme koşullarının belirlenmesi



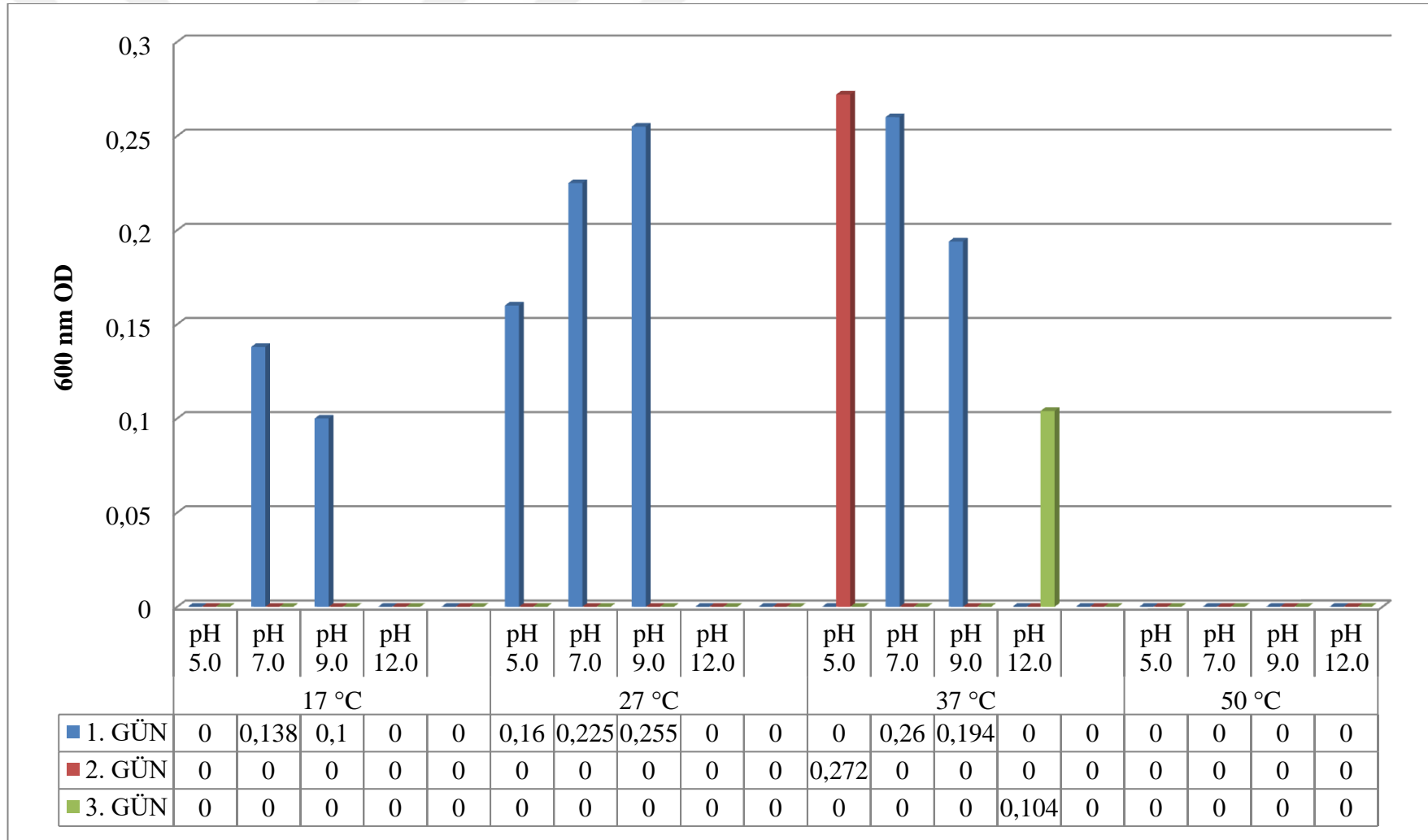
Şekil 3.4. ORSK-5 izolatının en uygun üreme koşullarının belirlenmesi



Şekil 3.5. ORSK-7 izolatının en uygun üreme koşullarının belirlenmesi



Şekil 3.6. ORSK-9 izolatının en uygun üreme koşullarının belirlenmesi



Şekil 3.7. ORSK-11 izolatının en uygun üreme koşullarının belirlenmesi

3.3. İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları

İzole edilen mikroorganizmaların biyokimyasal test sonuçları Çizelge 3.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. İzole edilen mikroorganizmaların biyokimyasal test sonuçları

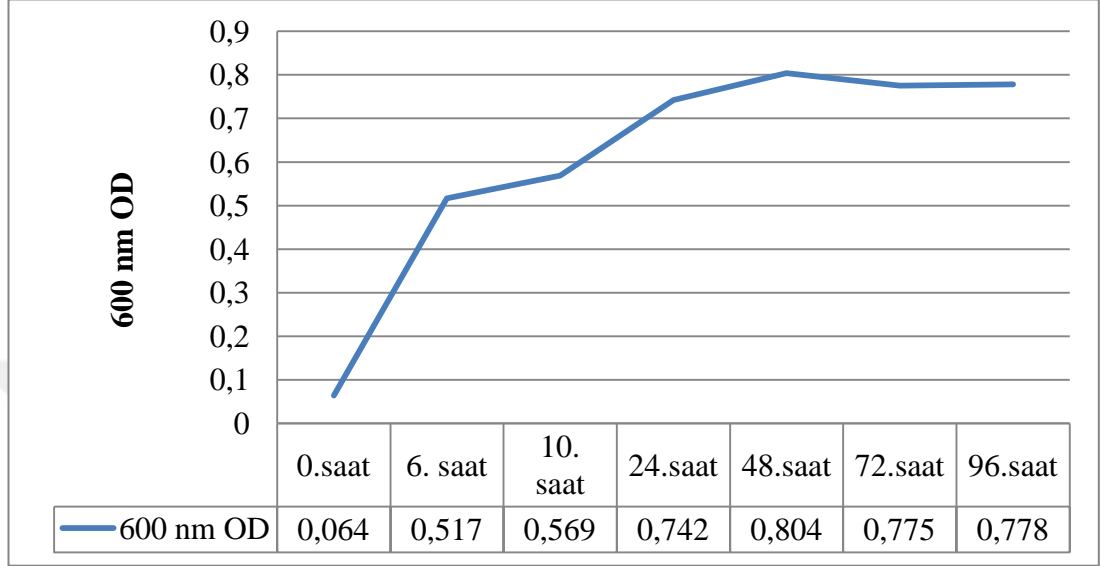
Örnek no/Test adı	Gram Özelliği	Spor Varlığı	Jelatin Hidrolizi	Nişasta Hidrolizi	Katalaz Özelliği
ORSK-2	+	+	+	+	+
ORSK -4	+	+	+	-	+
ORSK -5	+	+	+	+	+
ORSK -7	-	-	-	-	-
ORSK -9	+	+	+	+	+
ORSK -11	+	+	+	-	+

Örnek No/Test Adı	İndol Testi	Metil Red Testi	Voges Proskauer Testi	Sitrat Testi
ORSK -2	-	-	+	+
ORSK -4	-	-	+	-
ORSK -5	-	-	+	+
ORSK -7	+	-	+	+
ORSK -9	-	+	+	+
ORSK -11	-	+	+	+

(+) Pozitif sonucu, (-) negatif sonucu ifade etmektedir.

3.4. İzolatların Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi

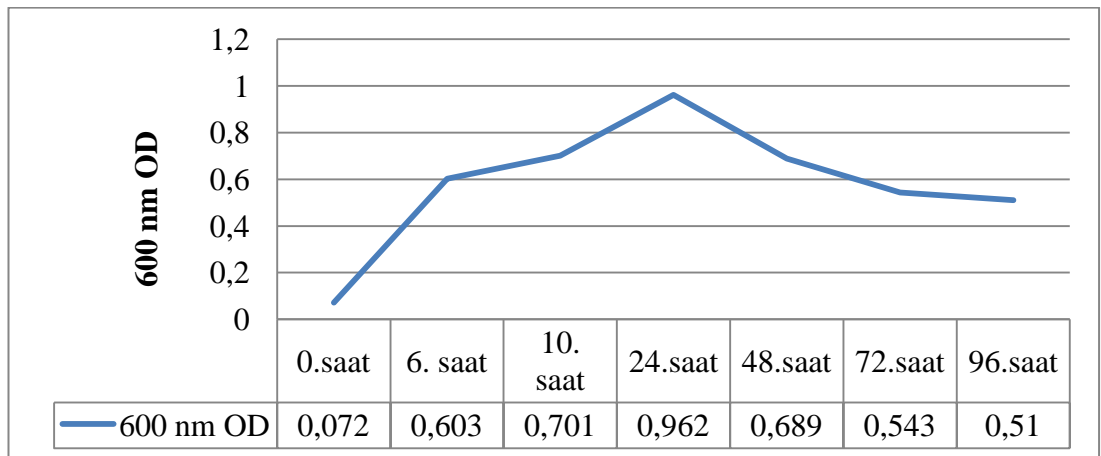
ORSK-2 izolatının üreme eğrisi Şekil 3.8’de verilmiştir.



Şekil 3.8. ORSK-2 izolatının üreme eğrisi

ORSK-2 izolatı 48. saatte logaritmik üreme fazını tamamlayarak ölüm fazına girmiştir.

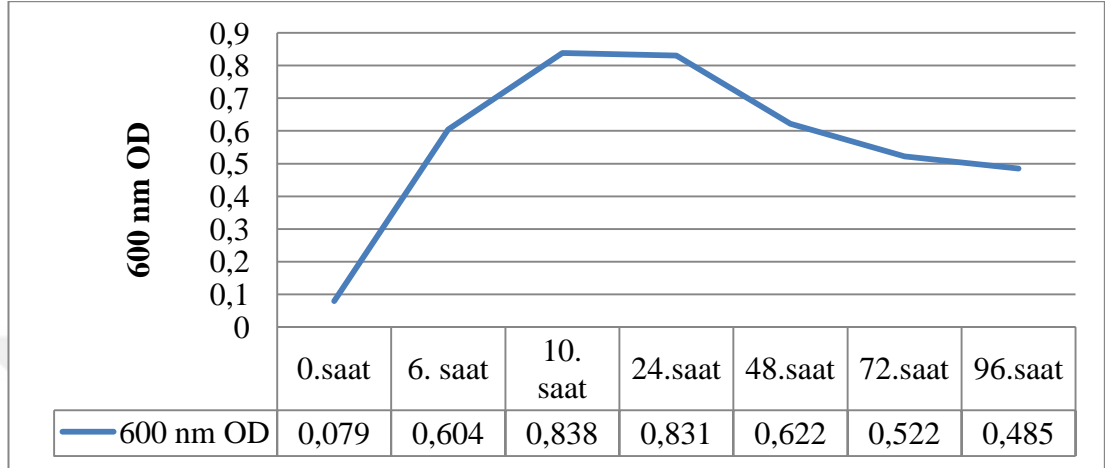
ORSK-4 izolatının üreme eğrisi Şekil 3.9’de verilmiştir.



Şekil 3.9. ORSK-4 izolatının üreme eğrisi

ORSK-4 izolatu 24. saatte logaritmik üreme fazını tamamlarken sonra ölüm fazına girmiştir.

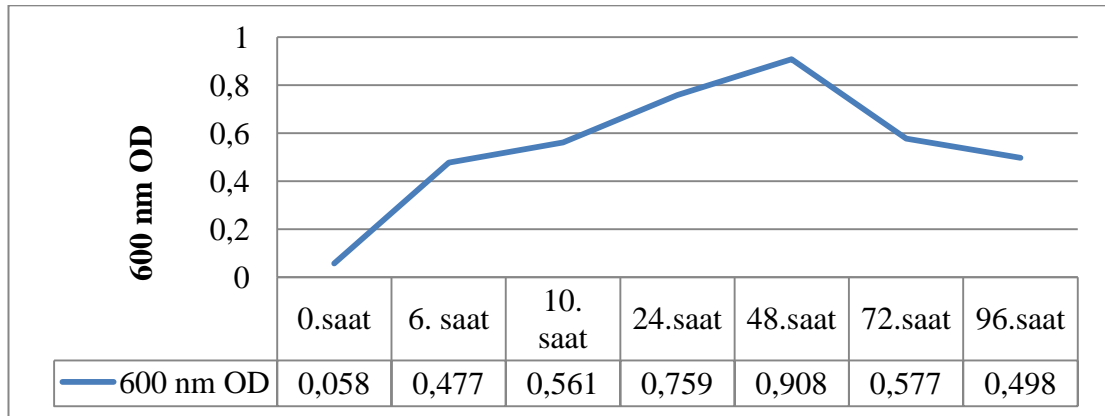
ORSK-5 izolatuının üreme eğrisi Şekil 3.10'da verilmiştir.



Şekil 3.10. ORSK-5 izolatuının üreme eğrisi

ORSK-5 izolatu 10. saatte logaritmik üreme fazını 10. saatte tamamlarken 24. Saatte kadar lag fazında kaldıktan sonra ölüm fazına girmiştir.

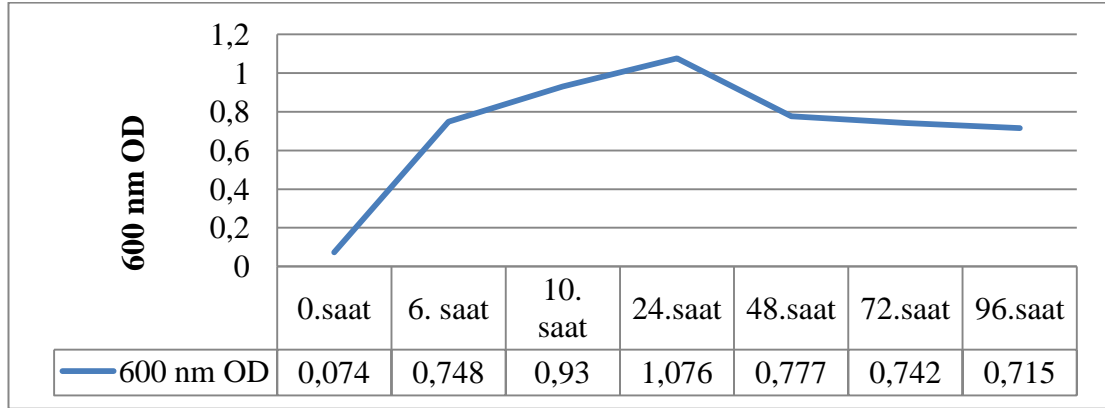
ORSK-7 izolatuının üreme eğrisi Şekil 3.11'de verilmiştir.



Şekil 3.11. ORSK-7 izolatuının üreme eğrisi

ORSK-7 izolatu 48. saatte logaritmik üreme fazını tamamladıktan sonra ölüm fazına girmiştir.

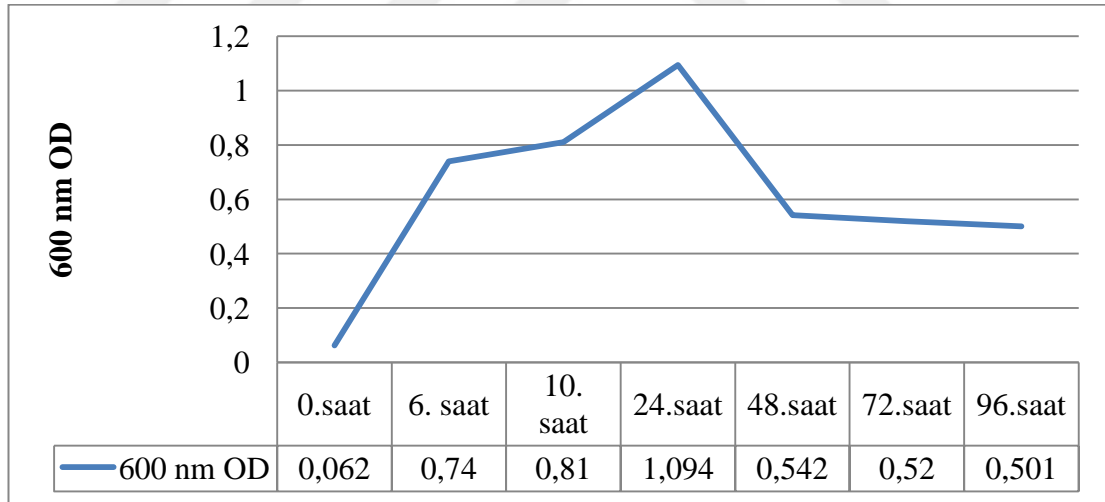
ORSK-9 izolatının üreme eğrisi Şekil 3.12’de verilmiştir.



Şekil 3.12. ORSK-9 izolatının üreme eğrisi

ORSK-9 izolatı 24. saatte logaritmik üreme fazın tamamlarken ardından ölüm fazına girmiştir.

ORSK-11 izolatının üreme eğrisi Şekil 3.13’de verilmiştir.



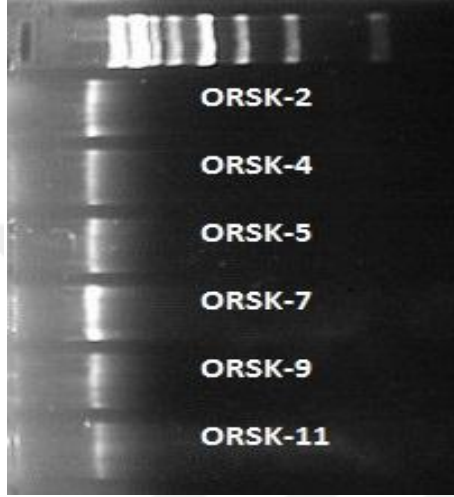
Şekil 3.13. ORSK-11 izolatının üreme eğrisi

ORSK-11 izolatı 24. saate logaritmik üreme fazını tamamladıktan sonra ölüm fazına girmiştir.

3.5. İzole Edilen Mikroorganizmaların 16S rRNA Analizi İle Moleküler Tanımlanması

3.5.1. DNA İzolasyonu

İzole edilen kromozomal DNA'lar % 1'lik agaroz jel elektroforezinde 80 Voltta 1 saat yürütülmüş görüntüleri Şekil 3.14'de gösterilmiştir.



Şekil 3.14. DNA'ların % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüleri

3.5.2. 16S rRNA Geninin Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemiyle Çoğaltılması

PZR işleminde 16S rRNA geninin nükleotit dizisi belirlenerek, izole edilen mikroorganizmaların moleküler tanımlanması yapılmıştır. Gen bölgesinin Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltabilmek için 27 F ve 1492 R universal primerleri kullanılmıştır.

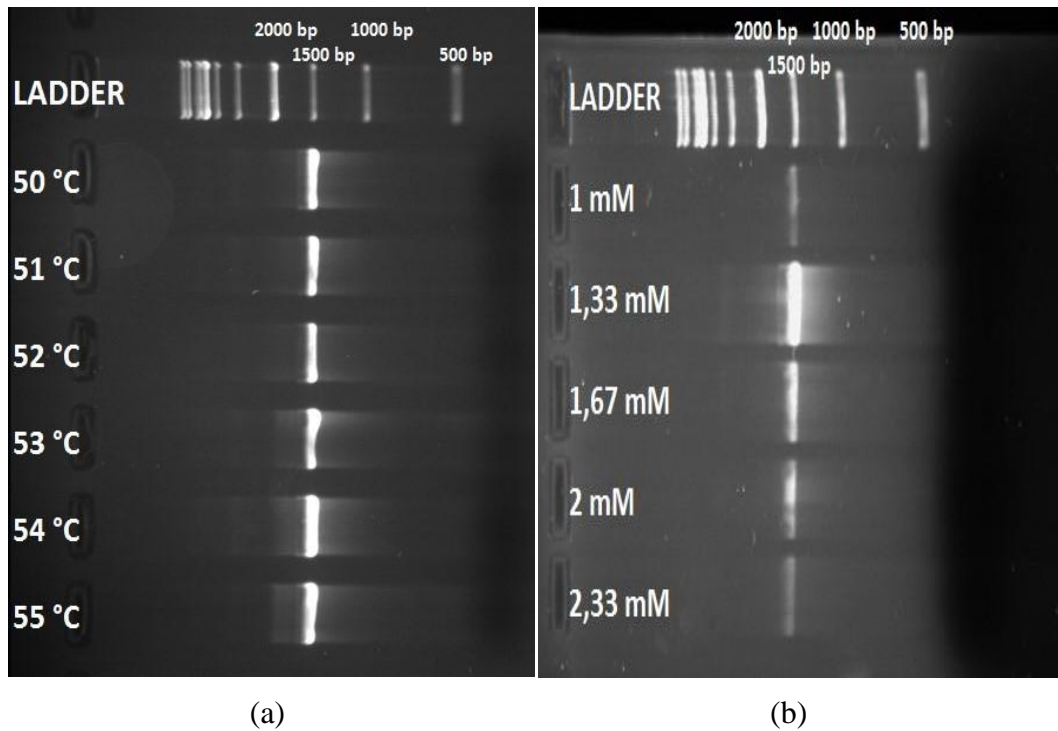
3.5.3. PZR Optimizasyonu

PZR birçok faktörden etkilenebildiği için 16S rRNA geninin sekans analizinde kullanılacak olan PZR ürünlerinin en uygun şekilde çoğaltılabilmesi için 1 mM ila 2,33 mM arasındaki beş MgCl₂ konsantrasyonu ve 50-55 °C arasındaki bağlanma sıcaklıkları PZR optimizasyonu için denenmiştir.

En uygun bağlanma sıcaklıklarından sonra uygun MgCl₂ konsantrasyonları belirlenmiş izolatlardan, bu şartlarda 16S rRNA genleri PZR ile çoğaltılmış ve PZR ürünlerinin doğruluğu % 1'lik agaroz jel elektroforezinde 1000 baz çifti içeren markerla birlikte 80 Voltta 60 dakika yürütülerek kontrol edilmiştir. Sekans analizi yapılana kadar PZR örnekleri -20 °C'de saklanmıştır.

3.5.3.1. ORSK-2 İzolatının Bağlanma Sıcaklığı ve Son MgCl₂ Konsantrasyonlarının Optimizasyonu

ORSK-2 izolatının bağlanma sıcaklığı ve son MgCl₂ konsantrasyonlarının optimizasyon sonuçları Şekil 3.15'de verilmiştir.

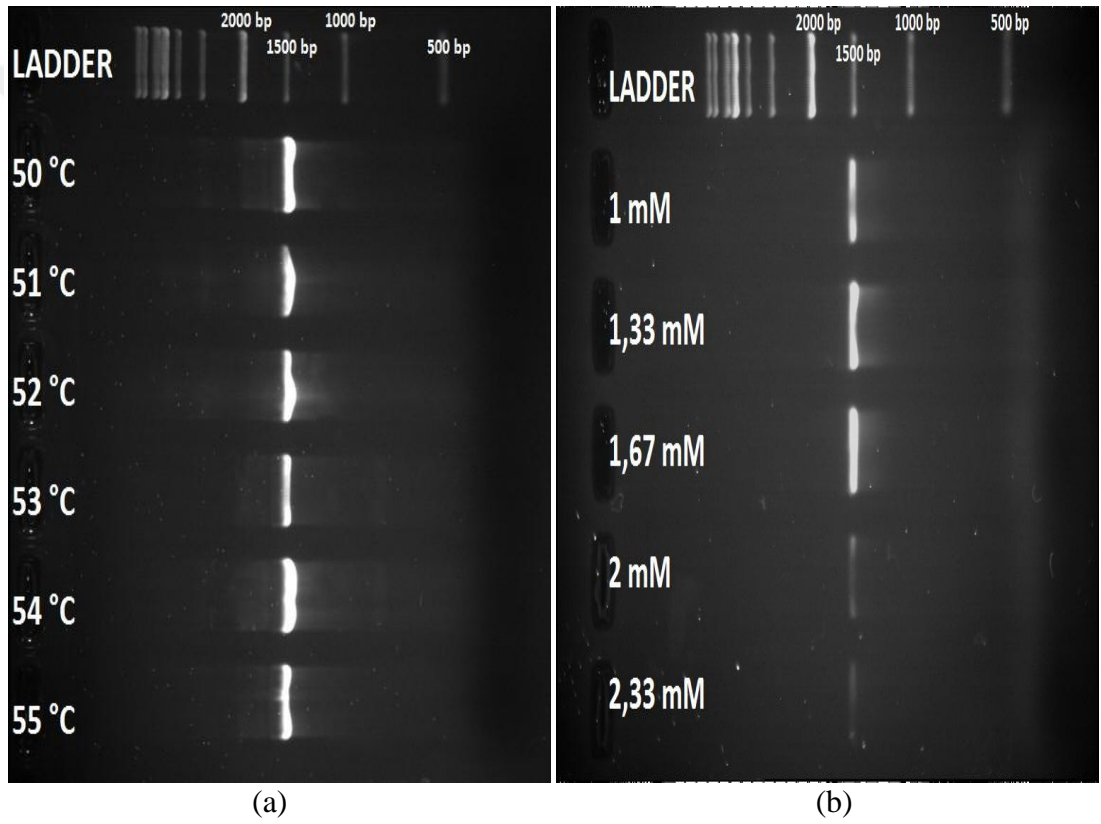


Şekil 3.15. ORSK-2 izolatının bağlanma sıcaklığı ve son MgCl₂ konsantrasyonları

ORSK-2 izolatının en uygun bağlanma sıcaklığının 54 °C (a), 54 °C'deki en uygun son MgCl₂ konsantrasyonunun 1,33 mM (b) olduğu belirlenmiştir.

3.5.3.2. ORSK-4 İzolatının Bağlanma Sıcaklığı ve Son MgCl₂ Konsantrasyonlarının Optimizasyonu

ORSK-4 izolatının bağlanma sıcaklığı ve son MgCl₂ konsantrasyonlarının optimizasyon sonuçları şekil 3.16'da verilmiştir.

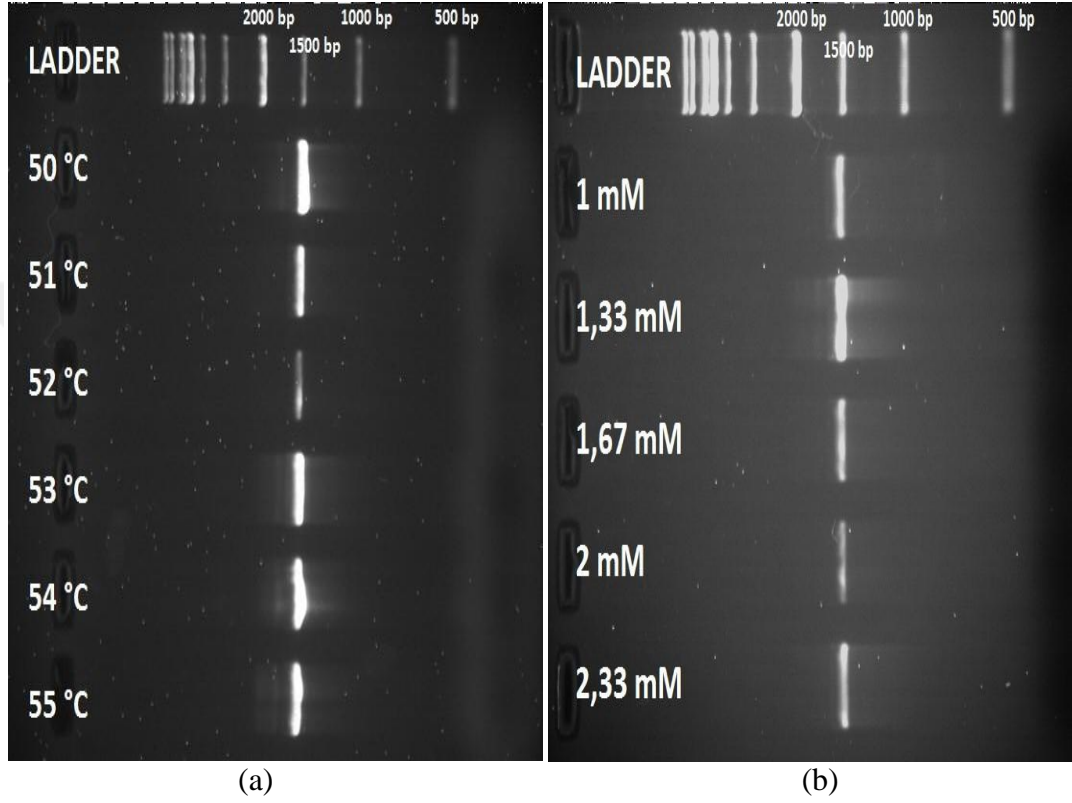


Şekil 3.16. ORSK-4 izolatının bağlanma sıcaklığı ve son MgCl₂ konsantrasyonları

ORSK-4 izolatının en uygun bağlanma sıcaklığının 50 °C (a), 50 °C'deki en uygun son MgCl₂ konsantrasyonunun 1,67 mM (b) olduğu belirlenmiştir.

3.5.3.3. ORSK-5 İzolatının Bağlanma Sıcaklığı ve Son MgCl₂ Konsantrasyonlarının Optimizasyonu

ORSK-5 izolatının bağlanma sıcaklığı ve son MgCl₂ konsantrasyonlarının optimizasyon sonuçları Şekil 3.17’de verilmiştir.

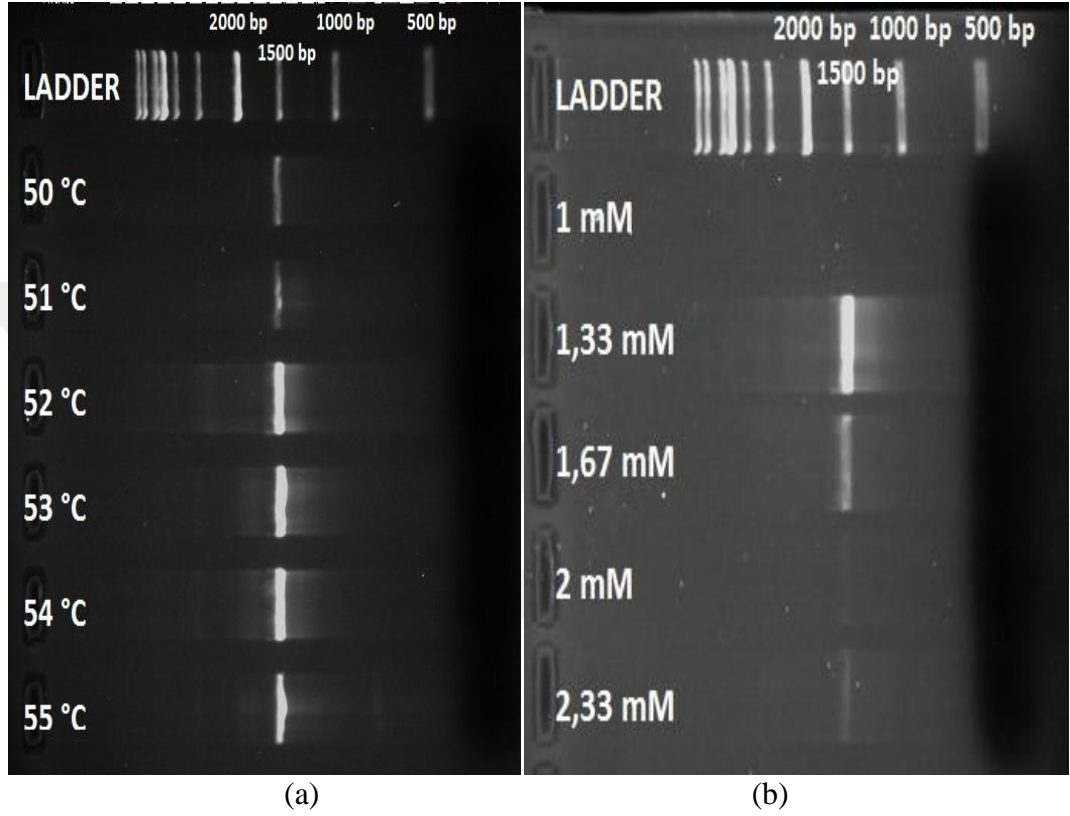


Şekil 3.17. ORSK-5 izolatının bağlanma sıcaklığı ve son MgCl₂ konsantrasyonları

ORSK-5 izolatının en uygun bağlanma sıcaklığının 53 °C (a), 53 °C’deki en uygun son MgCl₂ konsantrasyonunun 1,33 mM (b) olduğu belirlenmiştir.

3.5.3.4. ORSK-7 İzolatının Bağlanma Sıcaklığı ve Son MgCl₂ Konsantrasyonlarının Optimizasyon Sonuçları

ORSK-7 izolatının bağlanma sıcaklığı ve son MgCl₂ konsantrasyonlarının optimizasyon sonuçları Şekil 3.18’de verilmiştir.

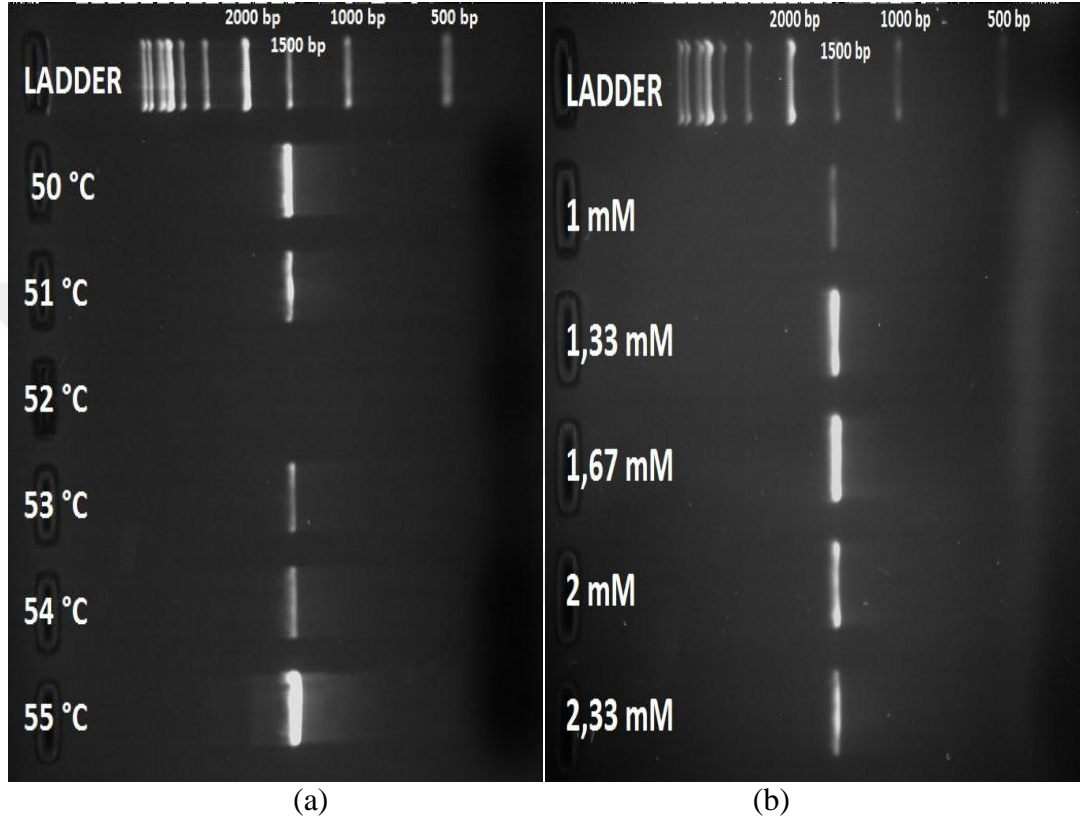


Şekil 3.18. ORSK-7 izolatının bağlanma sıcaklığı ve son MgCl₂ konsantrasyonları

ORSK-7 izolatının en uygun bağlanma sıcaklığının 54 °C (a), 54 °C’deki en uygun son MgCl₂ konsantrasyonunun 1,33 mM (b) olduğu belirlenmiştir

3.5.3.5. ORSK-9 İzolatının Bağlanma Sıcaklığı ve Son MgCl₂ Konsantrasyonlarının Optimizasyon Sonuçları

ORSK-9 izolatının bağlanma sıcaklığı ve son MgCl₂ konsantrasyonlarının optimizasyon sonuçları Şekil 3.19’da verilmiştir.

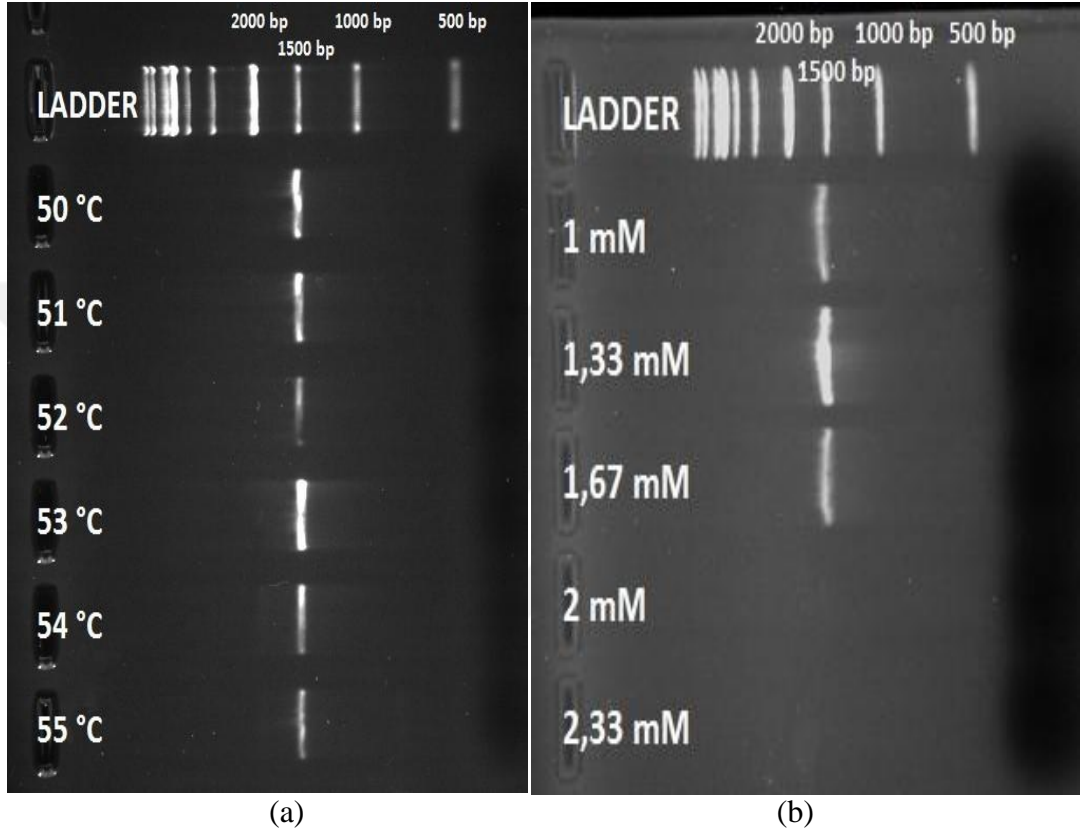


Şekil 3.19. ORSK-9 izolatının bağlanma sıcaklığı ve son MgCl₂ konsantrasyonları

ORSK-9 izolatının en uygun bağlanma sıcaklığının 50 °C (a), 50 °C’deki en uygun son MgCl₂ konsantrasyonunun 1,67 mM (b) olduğu belirlenmiştir.

3.5.3.6. ORSK-9 İzolatının Bağlanma Sıcaklığı ve Son MgCl₂ Konsantrasyonlarının Optimizasyon Sonuçları

ORSK-11 izolatının bağlanma sıcaklığı ve son MgCl₂ konsantrasyonlarının optimizasyon sonuçları Şekil 3.20'de verilmiştir.



Şekil 3.20. ORSK-11 izolatının bağlanma sıcaklığı ve son MgCl₂ konsantrasyonları

ORSK-11 izolatının en uygun bağlanma sıcaklığının 53 °C (a), 53 °C'deki en uygun son MgCl₂ konsantrasyonunun 1,33 mM (b) olduğu belirlenmiştir.

PZR optimizasyonu sonucu belirlenen optimum bağlanma sıcaklığı ve optimum MgCl₂ konsantrasyonu Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. İzolatların optimizasyon sonuçları

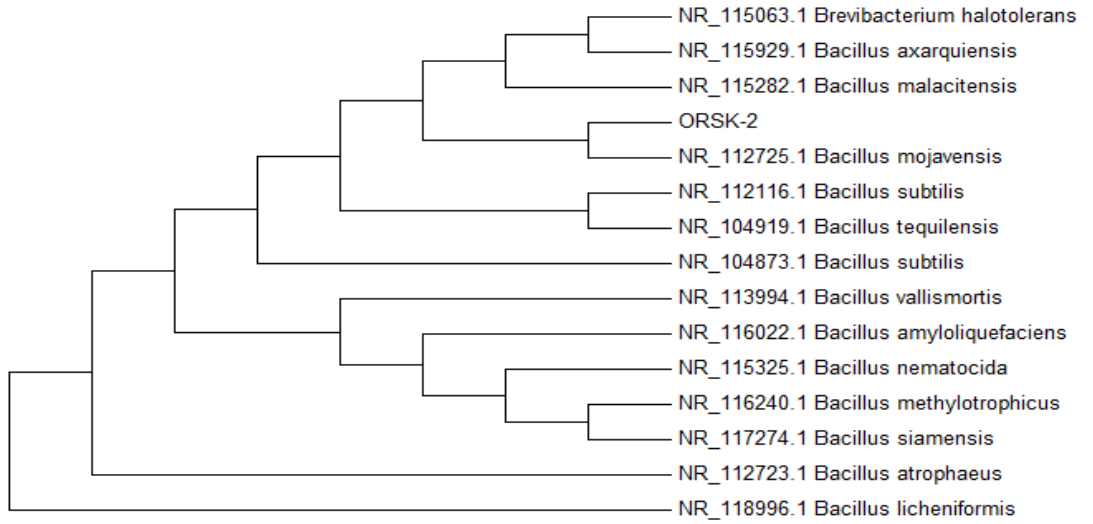
İzolat Numarası	En Uygun Bağlanma Sıcaklığı	En Uygun Son MgCl₂ Konsantrasyonu
ORSK-2	54 °C	1,33 mM
ORSK-4	50 °C	1,67 mM
ORSK-5	53 °C	1,33 mM
ORSK-7	54 °C	1,33 mM
ORSK-9	50 °C	1,67 mM
ORSK-11	53 °C	1,33 mM

3.5.4. İzolatların 16S rRNA Geninin Nükleotit Dizisinin Çıkartılması ile Moleküler Olarak Tanımlanması

PZR ile çoğaltılan 16S rRNA geninin sekans analizi hizmet alımı şeklinde MedSanTek şirketine yaptırılmıştır. Elde edilen sekans sonuçları National Center for Biotechnology Information (NCBI)'nin 16S rRNA veritabanındaki verilerle eşleştirilmiştir. NCBI 16S rRNA veritabanında tüm izolatlar için en yakın homoloji gösterilen 14 farklı tür seçilmiş ve elde edilen sonuçlarla akrabalık ilişkilerini belirlemek için Molecular Evolutionary Genetics Analysis 7 (MEGA7) programı kullanılmıştır.

3.5.4.1. ORSK-2 İzolatının 16S rRNA ile Moleküler Tanımlanması

ORSK-2 izolatına ait 16S rRNA sekans analiz sonucu ile birlikte NCBI'nin 16S rRNA veri tabanından elde edilen 14 farklı tür mikroorganizmanın nükleotit dizisi MEGA7 programında birbirine hizalanmıştır. Hizalama sonuçlarına göre istatistiksel güvenilirlik sağlanarak (1000 tekrarlı bootstrap analizi) uzaklık matrisi (distance matrix) çizilmiştir (Çizelge 3.3). Uzaklık matrisi sonuçları kullanılarak *Neighbor-Joining metodu ile* soyağaçları çizilerek evrimsel olarak yakınlık dereceleri belirlenmiştir (Şekil 3.21).



Şekil 3.21. ORSK-2 İzolatının Neighbor-Joining metodu ile oluşturulan dendrogramı

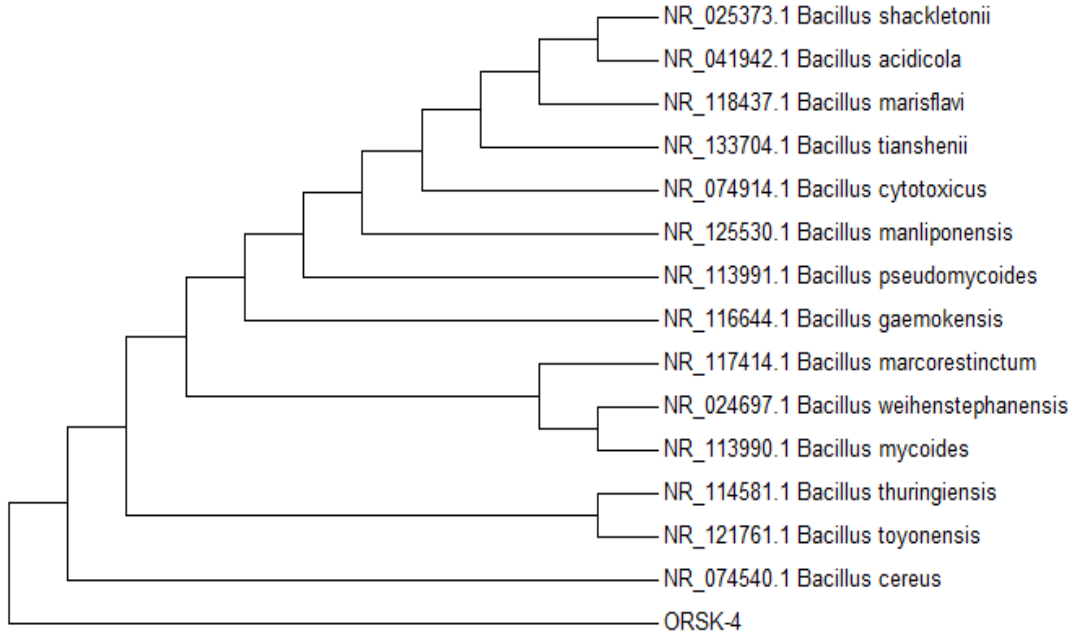
ORSK-2 izolatı hizalanmış uzaklık matrisi sonuçlarına göre *Bacillus mojavensis* ile en yakın akraba olduğu belirlenmiştir (0,01073).

Çizelge 3.3. ORSK-2 izolatının uzaklık matrisi

TÜRLER	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. ORSK-2															
2. NR_112725.1 <i>Bacillus mojavensis</i>	0,01073														
3. NR_104873.1 <i>Bacillus subtilis</i>	0,01163	0,00089													
4. NR_115063.1 <i>Brevibacterium halotolerans</i>	0,01163	0,00089	0,00177												
5. NR_115929.1 <i>Bacillus axarquiensis</i>	0,01163	0,00089	0,00177	0,00000											
6. NR_112116.1 <i>Bacillus subtilis</i>	0,01163	0,00267	0,00178	0,00355	0,00355										
7. NR_115282.1 <i>Bacillus malacitensis</i>	0,01163	0,00089	0,00177	0,00000	0,00000	0,00355									
8. NR_104919.1 <i>Bacillus tequilensis</i>	0,01344	0,00266	0,00178	0,00178	0,00178	0,00178	0,00178								
9. NR_113994.1 <i>Bacillus vallismortis</i>	0,01434	0,00355	0,00266	0,00266	0,00266	0,00445	0,00266	0,00266							
10. NR_116022.1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,01434	0,00355	0,00266	0,00444	0,00444	0,00445	0,00444	0,00445	0,00177						
11. NR_112723.1 <i>Bacillus atrophaeus</i>	0,01616	0,00534	0,00445	0,00623	0,00623	0,00624	0,00623	0,00623	0,00355	0,00356					
12. NR_115325.1 <i>Bacillus nematocida</i>	0,01616	0,00534	0,00445	0,00623	0,00623	0,00624	0,00623	0,00624	0,00356	0,00356	0,00534				
13. NR_116240.1 <i>Bacillus methylotrophicus</i>	0,01616	0,00534	0,00445	0,00623	0,00623	0,00445	0,00623	0,00444	0,00356	0,00178	0,00534	0,00356			
14. NR_117274.1 <i>Bacillus siamensis</i>	0,01890	0,00803	0,00713	0,00892	0,00892	0,00713	0,00892	0,00713	0,00624	0,00445	0,00803	0,00624	0,00267		
15. NR_118996.1 <i>Bacillus licheniformis</i>	0,02999	0,01891	0,01800	0,01981	0,01981	0,01984	0,01981	0,01983	0,02073	0,01891	0,01708	0,02258	0,02074	0,02350	-

3.5.4.2. ORSK-4 İzolatının 16S rRNA ile Moleküler Tanımlanması

ORSK-4 izolatına ait 16S rRNA sekans analiz sonucu ile birlikte NCBI'nin 16S rRNA veri tabanından elde edilen 14 farklı tür mikroorganizmanın nükleotit dizisi MEGA7 programında birbirine hizalanmıştır. Hizalama sonuçlarına göre istatistiksel güvenilirlik sağlanarak (1000 tekrarlı bootstrap analizi) uzaklık matrisi (distance matrix) çizilmiştir (Çizelge 3.4). Uzaklık matrisi sonuçları kullanılarak *Neighbor-Joining metodu ile* soyağaçları çizilerek evrimsel olarak yakınlık dereceleri belirlenmiştir (Şekil 3.22).



Şekil 3.22. ORSK-4 İzolatının Neighbor-Joining metodu ile oluşturulan dendogramı

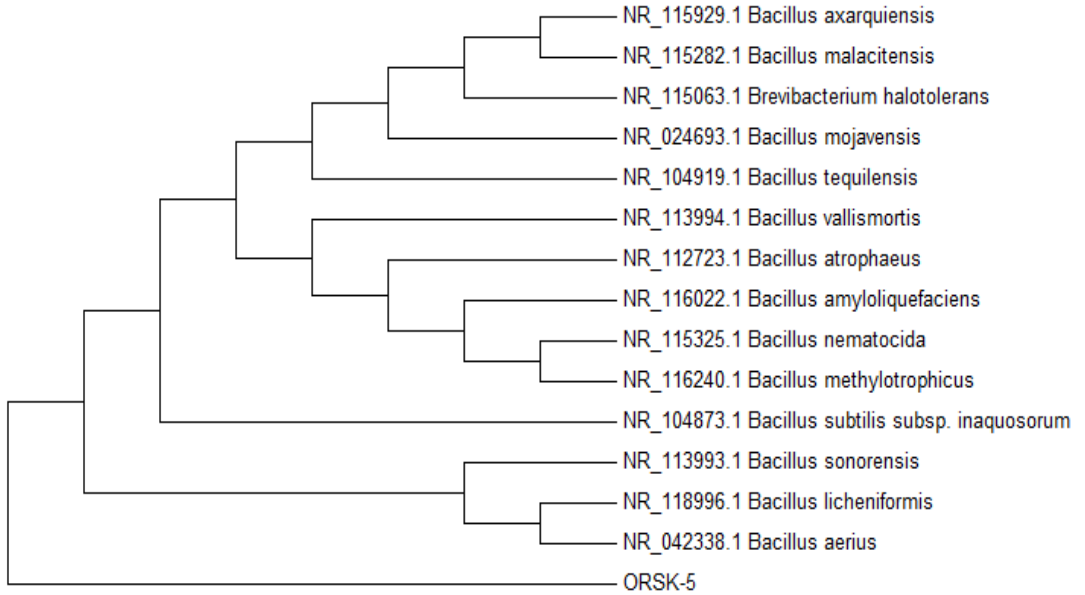
ORSK-4 izolatının hizalanmış uzaklık matrisi sonuçlarına göre *Bacillus cereus* ile en yakın akraba olduğu belirlenmiştir (0,04112).

Çizelge 3.4. ORSK-4 izolatının uzaklık matrisi

TÜRLER	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. ORSK-4															
2. NR_074540.1 <i>Bacillus cereus</i>	0,04112														
3. NR_114581.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	0,04180	0,00060													
4. NR_121761.1 <i>Bacillus toyonensis</i>	0,04180	0,00060	0,00000												
5. NR_117414.1 <i>Bacillus marcorestinctum</i>	0,04320	0,00180	0,00120	0,00120											
6. NR_113991.1 <i>Bacillus pseudomycooides</i>	0,04397	0,00363	0,00423	0,00423	0,00545										
7. NR_024697.1 <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	0,04527	0,00362	0,00301	0,00301	0,00301	0,00729									
8. NR_113990.1 <i>Bacillus mycooides</i>	0,04527	0,00362	0,00301	0,00301	0,00301	0,00729	0,00000								
9. NR_116644.1 <i>Bacillus gaemokensis</i>	0,04818	0,00729	0,00668	0,00668	0,00669	0,00607	0,00730	0,00730							
10. NR_125530.1 <i>Bacillus mantiponensis</i>	0,05305	0,01159	0,01221	0,01221	0,01346	0,01161	0,01533	0,01533	0,01664						
11. NR_074914.1 <i>Bacillus cytotoxicus</i>	0,05464	0,01287	0,01349	0,01349	0,01474	0,01037	0,01662	0,01662	0,01538	0,01347					
12. NR_133704.1 <i>Bacillus tianshenii</i>	0,06601	0,02380	0,02444	0,02444	0,02447	0,02384	0,02641	0,02641	0,02647	0,02695	0,02700				
13. NR_041942.1 <i>Bacillus acidicola</i>	0,06740	0,02506	0,02570	0,02570	0,02701	0,02245	0,02896	0,02896	0,02430	0,03031	0,02186	0,03243			
14. NR_025373.1 <i>Bacillus shackletonii</i>	0,06804	0,02568	0,02631	0,02631	0,02763	0,02306	0,02958	0,02958	0,02492	0,03092	0,02183	0,03376	0,00423		
15. NR_118437.1 <i>Bacillus marisflavi</i>	0,06831	0,02576	0,02640	0,02640	0,02772	0,02314	0,02968	0,02968	0,02499	0,03233	0,02702	0,02776	0,01413	0,01601	-

3.5.4.3. ORSK-5 İzolatının 16S rRNA ile Moleküler Tanımlanması

ORSK-5 izolatına ait 16S rRNA sekans analiz sonucu ile birlikte NCBI'nin 16S rRNA veri tabanından elde edilen 14 farklı tür mikroorganizmanın nükleotit dizisi MEGA7 programında birbirine hizalanmıştır. Hizalama sonuçlarına göre istatistiksel güvenilirlik sağlanarak (1000 tekrarlı bootstrap analizi) uzaklık matrisi (distance matrix) çizilmiştir (Çizelge 3.5). Uzaklık matrisi sonuçları kullanılarak *Neighbor-Joining metodu ile* soyağaçları çizilerek evrimsel olarak yakınlık dereceleri belirlenmiştir (Şekil 3.23).



Şekil 3.23. ORSK-5 İzolatının Neighbor-Joining metodu ile oluşturulan dendogramı

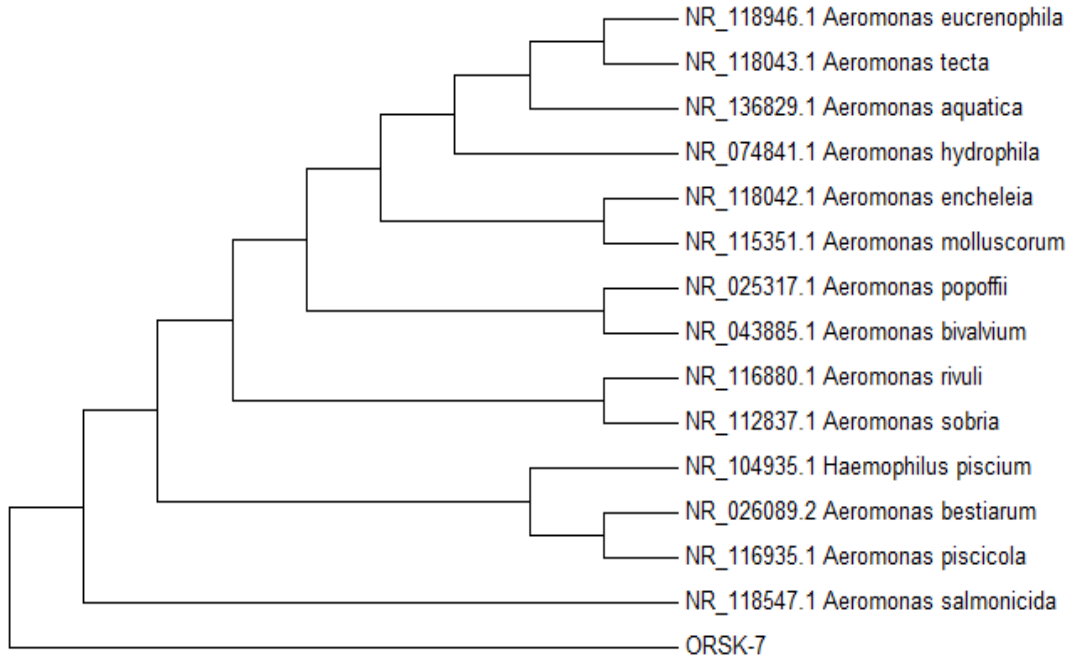
ORSK-5 izolatının hizalanmış uzaklık matrisi sonuçlarına göre *Bacillus licheniformis* ile en yakın akraba olduğu belirlenmiştir (0,01626).

Çizelge 3.5. ORSK-4 izolatının uzaklık matrisi

TÜRLER	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. ORSK-5															
2. NR_118996.1 <i>Bacillus licheniformis</i>	0,01626														
3. NR_113993.1 <i>Bacillus sonorensis</i>	0,01627	0,00226													
4. NR_042338.1 <i>Bacillus aerius</i>	0,01808	0,00170	0,00398												
5. NR_024693.1 <i>Bacillus mojavenis</i>	0,01928	0,01151	0,01268	0,01329											
6. NR_104873.1 <i>Bacillus subtilis</i>	0,01929	0,01035	0,01151	0,01212	0,00113										
7. NR_112723.1 <i>Bacillus atrophaeus</i>	0,02047	0,01092	0,01209	0,01270	0,00283	0,00170									
8. NR_115063.1 <i>Brevibacterium halotolerans</i>	0,02048	0,01151	0,01268	0,01329	0,00113	0,00113	0,00283								
9. NR_115929.1 <i>Bacillus axarquiensis</i>	0,02048	0,01151	0,01268	0,01329	0,00113	0,00113	0,00283	0,00000							
10. NR_115282.1 <i>Bacillus malacitensis</i>	0,02048	0,01151	0,01268	0,01329	0,00113	0,00113	0,00283	0,00000	0,00000						
11. NR_104919.1 <i>Bacillus tequilensis</i>	0,02050	0,01152	0,01269	0,01330	0,00226	0,00113	0,00283	0,00113	0,00113	0,00113					
12. NR_113994.1 <i>Bacillus vallismortis</i>	0,02108	0,01209	0,01326	0,01388	0,00283	0,00170	0,00113	0,00170	0,00170	0,00170	0,00170				
13. NR_116022.1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,02109	0,01093	0,01209	0,01270	0,00283	0,00170	0,00113	0,00283	0,00283	0,00283	0,00283	0,00113			
14. NR_116240.1 <i>Bacillus methylotrophicus</i>	0,02170	0,01270	0,01387	0,01449	0,00455	0,00341	0,00284	0,00455	0,00455	0,00455	0,00340	0,00284	0,00170		
15. NR_115325.1 <i>Bacillus nematocida</i>	0,02231	0,01328	0,01446	0,01508	0,00397	0,00283	0,00227	0,00397	0,00397	0,00397	0,00398	0,00227	0,00227	0,00284	-

3.5.4.4. ORSK-7 İzolatının 16S rRNA ile Moleküler Tanımlanması

ORSK-7 izolatına ait 16S rRNA sekans analiz sonucu ile birlikte NCBI'nin 16S rRNA veri tabanından elde edilen 14 farklı tür mikroorganizmanın nükleotit dizisi MEGA7 programında birbirine hizalanmıştır. Hizalama sonuçlarına göre istatistiksel güvenilirlik sağlanarak (1000 tekrarlı bootstrap analizi) uzaklık matrisi (distance matrix) çizilmiştir (Çizelge 3.6). Uzaklık matrisi sonuçları kullanılarak *Neighbor-Joining metodu ile* soyağaçları çizilerek evrimsel olarak yakınlık dereceleri belirlenmiştir (Şekil 3.24).



Şekil 3.24. ORSK-7 İzolatının Neighbor-Joining metodu ile oluşturulan dendrogramı

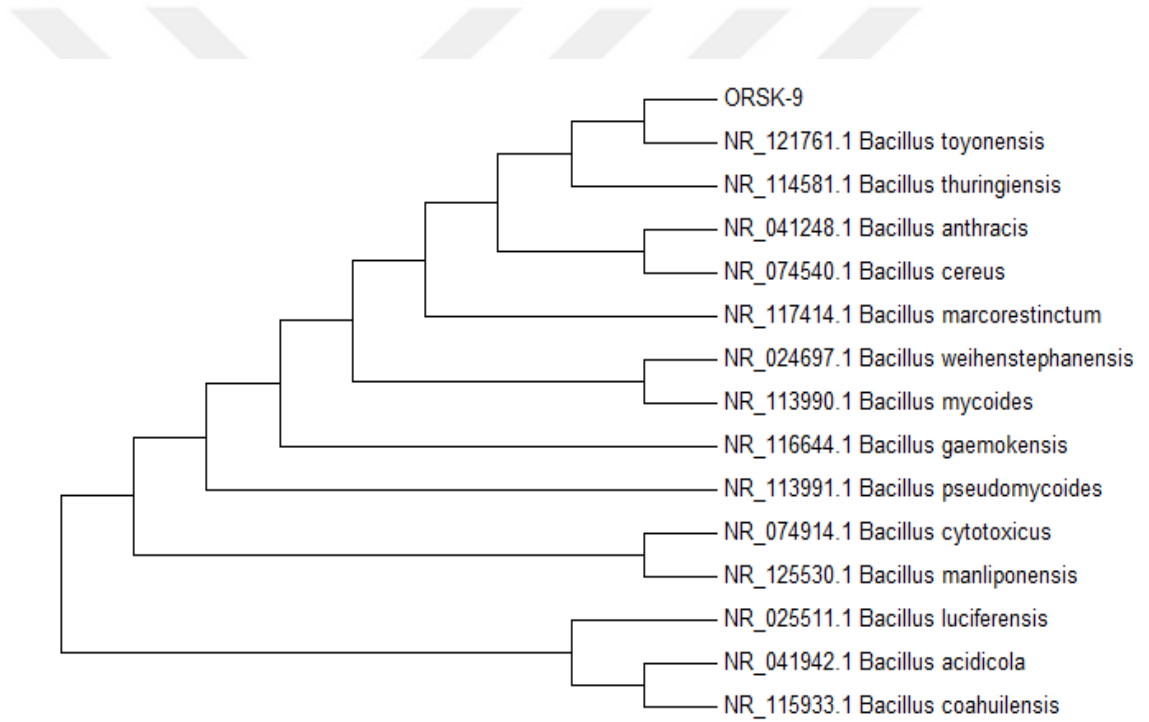
ORSK-7 izolatının hizalanmış uzaklık matrisi sonuçlarına göre *Aeromonas salmonicida* ile en yakın akraba olduğu belirlenmiştir (0,02076).

Çizelge 3.6. ORSK-7 izolatının uzaklık matrisi

TÜRLER	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. ORSK-7															
2. NR_118547.1 <i>Aeromonas salmonicida</i>	0,02076														
3. NR_104935.1 <i>Haemophilus piscium</i>	0,02259	0,00178													
4. NR_116935.1 <i>Aeromonas piscicola</i>	0,02259	0,00178	0,00000												
5. NR_026089.2 <i>Aeromonas bestiarum</i>	0,02259	0,00178	0,00000	0,00000											
6. NR_118042.1 <i>Aeromonas encheleia</i>	0,02350	0,00267	0,00445	0,00445	0,00445										
7. NR_115351.1 <i>Aeromonas molluscorum</i>	0,02350	0,00267	0,00445	0,00445	0,00445	0,00000									
8. NR_116880.1 <i>Aeromonas rivuli_strain</i>	0,02444	0,00356	0,00535	0,00535	0,00535	0,00624	0,00624								
9. NR_112837.1 <i>Aeromonas sobria</i>	0,02628	0,00535	0,00714	0,00714	0,00714	0,00804	0,00804	0,00178							
10. NR_136829.1 <i>Aeromonas aquatica</i>	0,02717	0,00624	0,00445	0,00445	0,00445	0,00356	0,00356	0,00983	0,00983						
11. NR_118946.1 <i>Aeromonas eucrenophila</i>	0,02906	0,00804	0,00984	0,00984	0,00984	0,00535	0,00535	0,01165	0,01165	0,00535					
12. NR_025317.1 <i>Aeromonas popoffii</i>	0,02907	0,00804	0,00625	0,00625	0,00625	0,00625	0,00625	0,00803	0,00983	0,00446	0,00986				
13. NR_043885.1 <i>Aeromonas bivalvium</i>	0,03002	0,00895	0,01075	0,01075	0,01075	0,00715	0,00715	0,00715	0,00804	0,00805	0,00987	0,00535			
14. NR_118043.1 <i>Aeromonas tecta</i>	0,03088	0,00983	0,01163	0,01163	0,01163	0,00714	0,00714	0,01344	0,01344	0,00714	0,00715	0,01165	0,01166		
15. NR_074841.1 <i>Aeromonas hydrophila</i>	0,03277	0,01164	0,00984	0,00984	0,00984	0,00894	0,00894	0,01527	0,01708	0,00894	0,01074	0,01167	0,01621	0,01617	-

3.5.4.5. ORSK-9 İzolatının 16S rRNA ile Moleküler Tanımlanması

ORSK-9 izolatına ait 16S rRNA sekans analiz sonucu ile birlikte NCBI'nin 16S rRNA veri tabanından elde edilen 14 farklı tür mikroorganizmanın nükleotit dizisi MEGA7 programında birbirine hizalanmıştır. Hizalama sonuçlarına göre istatistiksel güvenilirlik sağlanarak (1000 tekrarlı bootstrap analizi) uzaklık matrisi (distance matrix) çizilmiştir (Çizelge 3.7). Uzaklık matrisi sonuçları kullanılarak *Neighbor-Joining metodu ile* soyağaçları çizilerek evrimsel olarak yakınlık dereceleri belirlenmiştir (Şekil 3.25).



Şekil 3.25. ORSK-9 İzolatının Neighbor-Joining metodu ile oluşturulan dendogramı

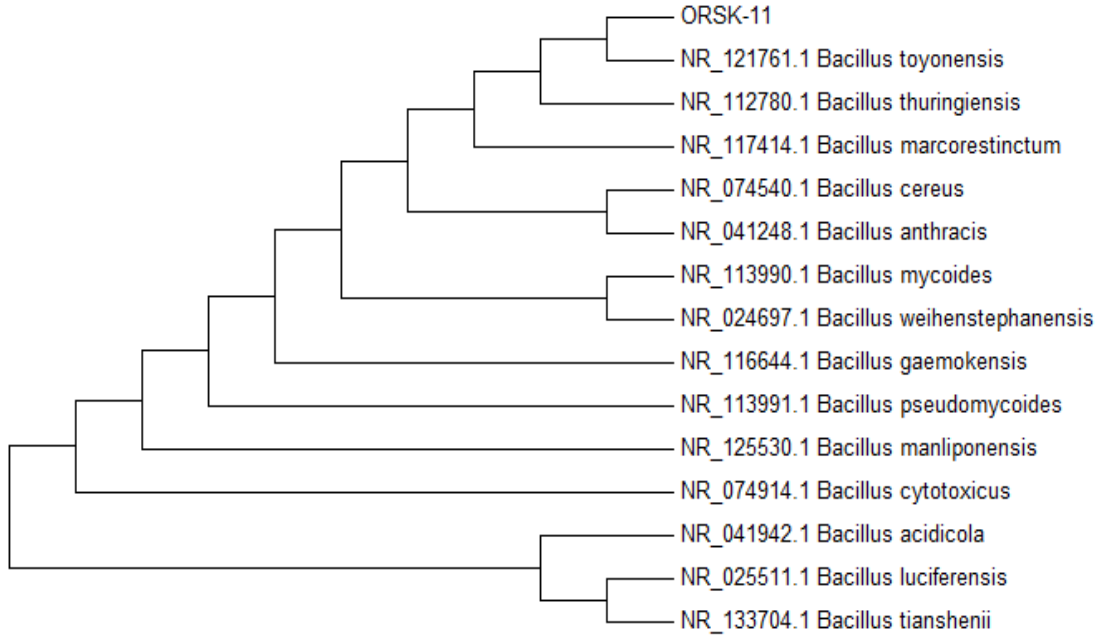
ORSK-9 izolatının hizalanmış uzaklık matrisi sonuçlarına göre *Bacillus thuringiensis* ile en yakın akraba olduğu belirlenmiştir (0,01596).

Çizelge 3.7. ORSK-9 izolatının uzaklık matrisi

TÜRLER	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. ORSK-9															
2. NR_114581.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	0,01596														
3. NR_121761.1 <i>Bacillus toyonensis</i>	0,01596	0,00000													
4. NR_074540.1 <i>Bacillus cereus</i>	0,01696	0,00098	0,00098												
5. NR_041248.1 <i>Bacillus anthracis</i>	0,01799	0,00196	0,00196	0,00098											
6. NR_117414.1 <i>Bacillusmarcorestinum</i>	0,01799	0,00196	0,00196	0,00295	0,00394										
7. NR_024697.1 <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	0,02101	0,00492	0,00492	0,00590	0,00690	0,00492									
8. NR_113990.1 <i>Bacillus mycoides</i>	0,02101	0,00492	0,00492	0,00590	0,00690	0,00492	0,00000								
9. NR_113991.1 <i>Bacillus pseudomycoides</i>	0,02206	0,00591	0,00591	0,00493	0,00394	0,00790	0,01088	0,01088							
10. NR_116644.1 <i>Bacillus gaemokensis</i>	0,02717	0,01088	0,01088	0,01187	0,01288	0,01089	0,00988	0,00988	0,01088						
11. NR_125530.1 <i>Bacillus manliponensis</i>	0,03641	0,01988	0,01988	0,01888	0,01786	0,02191	0,02290	0,02290	0,01789	0,02497					
12. NR_074914.1 <i>Bacillus cytotoxicus</i>	0,03747	0,02090	0,02090	0,01990	0,01888	0,02293	0,02595	0,02595	0,01687	0,02394	0,02087				
13. NR_025511.1 <i>Bacillus luciferensis</i>	0,05667	0,03948	0,03948	0,03845	0,03739	0,04157	0,04258	0,04258	0,03641	0,04054	0,03744	0,03955			
14. NR_115933.1 <i>Bacillus coahuilensis</i>	0,06082	0,04561	0,04561	0,04664	0,04557	0,04565	0,04875	0,04875	0,04460	0,04566	0,04877	0,05722	0,05098		
15. NR_041942.1 <i>Bacillus acidicola</i>	0,06200	0,04674	0,04674	0,04777	0,04670	0,04885	0,05092	0,05092	0,04573	0,04992	0,05202	0,04682	0,04661	0,04053	-

3.5.4.6. ORSK-11 İzolatının 16S rRNA ile Moleküler Tanımlanması

ORSK-11 izolatına ait 16S rRNA sekans analiz sonucu ile birlikte NCBI'nin 16S rRNA veri tabanından elde edilen 14 farklı tür mikroorganizmanın nükleotit dizisi MEGA7 programında birbirine hizalanmıştır. Hizalama sonuçlarına göre istatistiksel güvenilirlik sağlanarak (1000 tekrarlı bootstrap analizi) uzaklık matrisi (distance matrix) çizilmiştir (Çizelge 3.8). Uzaklık matrisi sonuçları kullanılarak *Neighbor-Joining metodu ile* soyağaçları çizilerek evrimsel olarak yakınlık dereceleri belirlenmiştir (Şekil 3.26).



Şekil 3.26. ORSK-11 İzolatının Neighbor-Joining metodu ile oluşturulan dendogramı

ORSK-11 izolatının hizalanmış uzaklık matrisi sonuçlarına göre *Bacillus toyonensis* ile en yakın akraba olduğu belirlenmiştir (0,01391).

Çizelge 3.8. ORSK-11 izolatının uzaklık matrisi

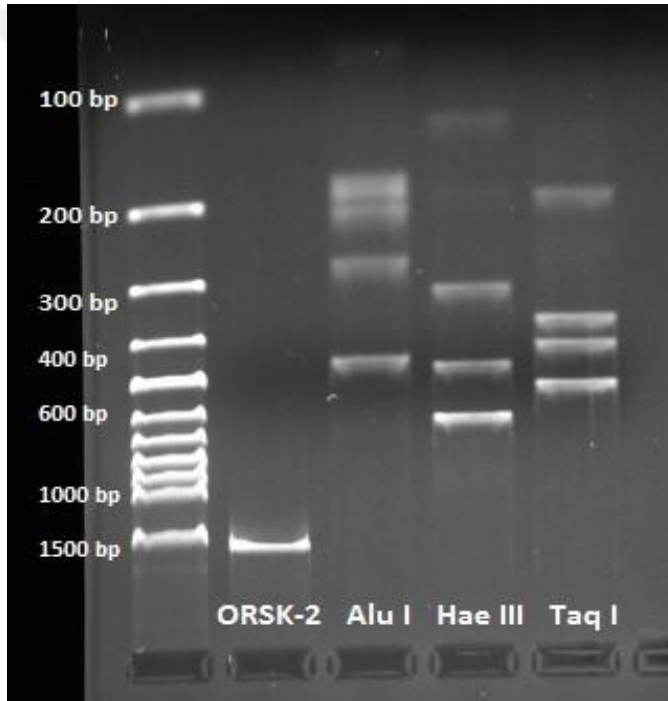
TÜRLER	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. ORSK-11															
2. NR_121761.1 <i>Bacillus toyonensis</i>	0,01391														
3. NR_112780.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	0,01391	0,00000													
4. NR_074540.1 <i>Bacillus cereus</i>	0,01491	0,00098	0,00098												
5. NR_117414.1 <i>Bacillus marcorestinctum</i>	0,01492	0,00098	0,00098	0,00197											
6. NR_041248.1 <i>Bacillus anthracis</i>	0,01592	0,00197	0,00197	0,00098	0,00295										
7. NR_113990.1 <i>Bacillus mycoides</i>	0,01792	0,00394	0,00394	0,00492	0,00492	0,00591									
8. NR_024697.1 <i>B. weihenstephanensis</i>	0,01792	0,00394	0,00394	0,00492	0,00492	0,00591	0,00000								
9. NR_113991.1 <i>Bacillus pseudomycoides</i>	0,02099	0,00691	0,00691	0,00592	0,00791	0,00493	0,01089	0,01089							
10. NR_116644.1 <i>Bacillus gaemokensis</i>	0,02507	0,01090	0,01090	0,01189	0,01190	0,01290	0,01089	0,01089	0,00990						
11. NR_125530.1 <i>Bacillus manliponensis</i>	0,03422	0,01988	0,01988	0,01888	0,02090	0,01787	0,02189	0,02189	0,01890	0,02500					
12. NR_074914.1 <i>Bacillus cytotoxicus</i>	0,03736	0,02294	0,02294	0,02193	0,02397	0,02091	0,02700	0,02700	0,01788	0,02600	0,02291				
13. NR_133704.1 <i>Bacillus tianshenii</i>	0,05859	0,04364	0,04364	0,04261	0,04471	0,04154	0,04572	0,04572	0,04266	0,04686	0,04148	0,04879			
14. NR_025511.1 <i>Bacillus luciferensis</i>	0,05967	0,04470	0,04470	0,04367	0,04577	0,04260	0,04679	0,04679	0,04164	0,04584	0,04266	0,04373	0,03424		
15. NR_041942.1 <i>Bacillus acidicola</i>	0,06170	0,04775	0,04775	0,04672	0,04883	0,04565	0,05194	0,05194	0,04250	0,04553	0,05094	0,04257	0,05637	0,05327	-

3.5.5. Mikroorganizmaların ARDRA Yöntemi İle Birbirinden Ayrılması

16S sekans analizi oldukça birbirine benzeyen *Bacillus* cinsinde ayırım yapabilmek için 16S rRNA geninin restriksiyon enzimleriyle kesim yöntemi olan ARDRA kullanılmış ve mikroorganizmaların arasındaki farklılıklar araştırılmıştır.

ARDRA yönteminde üç tane restriksiyon enzimi (HaeIII(BsuRI), TaqI ve AluI) kullanılmıştır.

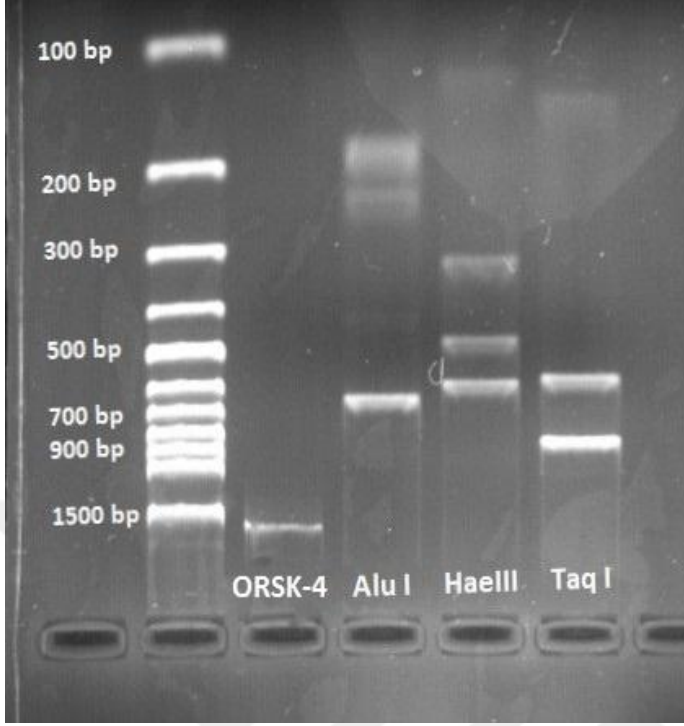
3.5.5.1. ORSK-2 (*Bacillus mojavensis*) İzolatının ARDRA Profili



Şekil 3.27. ORSK-2 (*Bacillus mojavensis*) izolatının Alu I, Hae III ve Taq I enzimleriyle kesilmiş ARDRA Profili

ORSK-2 (*Bacillus mojavensis*) izolatının 16S rRNA gen bölgesinin; Alu I restriksiyon enzimi kesimi sonucu 460, 270, 220, 180, 170 ve 80 baz çifti uzunluğunda 6 bant, Hae III restriksiyon enzimi kesimi sonucu 610, 470, 310 ve 120 baz çifti uzunluğunda 4 bant, Taq I restriksiyon enzimi kesimi sonucu 510, 410, 390 ve 190 baz çifti uzunluğunda 4 bant açığa çıkmıştır.

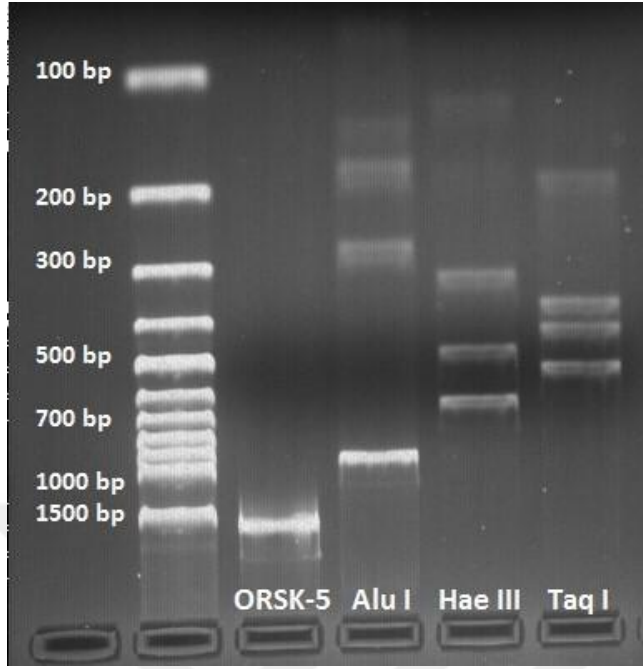
3.5.5.2. ORSK-4 (*Bacillus cereus*) İzolatının ARDRA Profili



Şekil 3.28. ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatının Alu I, Hae III ve Taq I enzimleriyle kesilmiş ARDRA Profili

ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatının 16S rRNA gen bölgesinin; Alu I restriksiyon enzimi kesimi sonucu 680, 240 ve 180 baz çifti uzunluğunda 3 bant, Hae III restriksiyon enzimi kesimi sonucu 590, 480, 310 ve 120 baz çifti uzunluğunda 4 bant, Taq I restriksiyon enzimi kesimi sonucu 800, 560 ve 140 baz çifti uzunluğunda 3 bant açığa çıkmıştır.

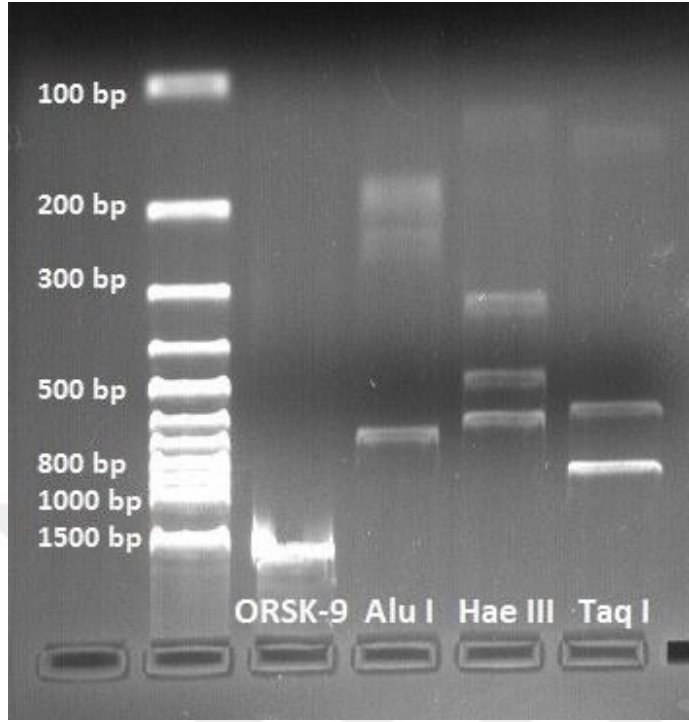
3.5.5.3. ORSK-5 (*Bacillus licheniformis*) İzolatının ARDRA Profili



Şekil 3.29. ORSK-5 (*Bacillus licheniformis*) izolatının Alu I, Hae III ve Taq I enzimleriyle kesilmiş ARDRA Profili

ORSK-5 (*Bacillus licheniformis*) izolatının 16S rRNA gen bölgesinin; Alu I restriksiyon enzimi kesimi sonucu 900, 280, 180 ve 150 baz çifti uzunluğunda 4 bant, Hae III restriksiyon enzimi kesimi sonucu 610, 470, 310 ve 120 baz çifti uzunluğunda 4 bant, Taq I restriksiyon enzimi kesimi sonucu 550, 400, 360 ve 200 baz çifti uzunluğunda 4 bant açığa çıkmıştır.

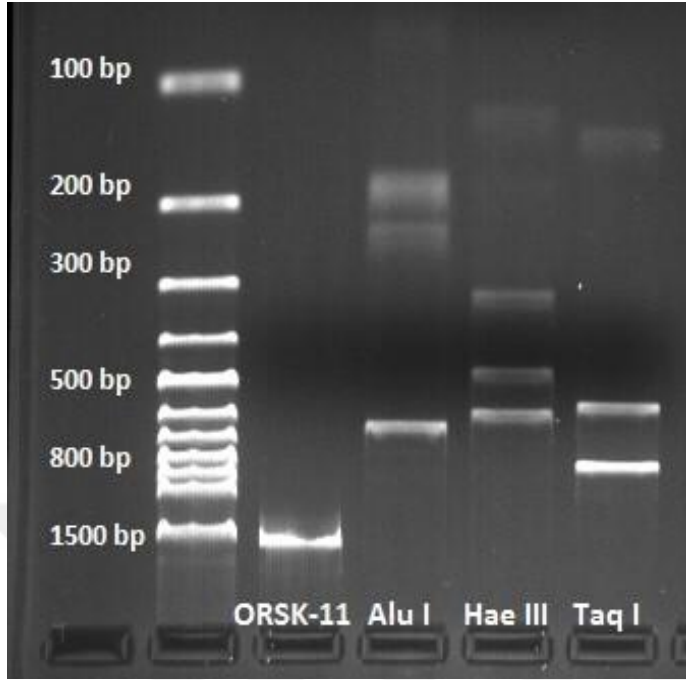
3.5.5.4. ORSK-9 (*Bacillus thuringiensis*) İzolatının ARDRA Profili



Şekil 3.30. ORSK-9 (*Bacillus thuringiensis*) izolatının Alu I, Hae III ve Taq I enzimleriyle kesilmiş ARDRA Profili

ORSK-9 (*Bacillus thuringiensis*) izolatının 16S rRNA gen bölgesinin; Alu I restriksiyon enzimi kesimi sonucu 680, 240 ve 180 baz çifti uzunluğunda 3 bant, Hae III restriksiyon enzimi kesimi sonucu 590, 480, 310 ve 120 baz çifti uzunluğunda 4 bant, Taq I restriksiyon enzimi kesimi sonucu 800, 560 ve 140 baz çifti uzunluğunda 3 bant açığa çıkmıştır.

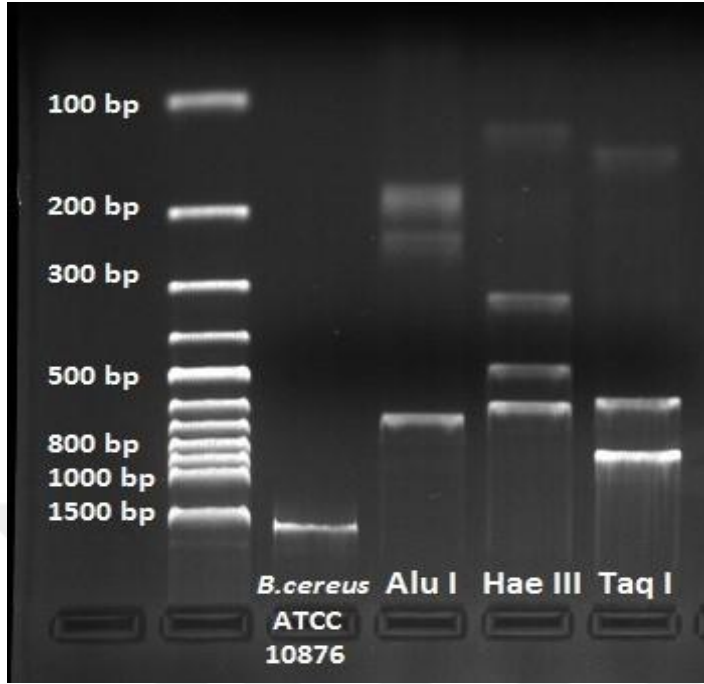
3.5.5.5. ORSK-11 (*Bacillus toyonensis*) İzolatının ARDRA Profili



Şekil 3.31. ORSK-11 (*Bacillus toyonensis*) izolatının Alu I, Hae III ve Taq I enzimleriyle kesilmiş ARDRA Profili

ORSK-11 (*Bacillus toyonensis*) izolatının 16S rRNA gen bölgesinin; Alu I restriksiyon enzimi kesimi sonucu 680, 240 ve 180 baz çifti uzunluğunda 3 bant, Hae III restriksiyon enzimi kesimi sonucu 590, 480, 310 ve 120 baz çifti uzunluğunda 4 bant, Taq I restriksiyon enzimi kesimi sonucu 800, 560 ve 140 baz çifti uzunluğunda 3 bant açığa çıkmıştır.

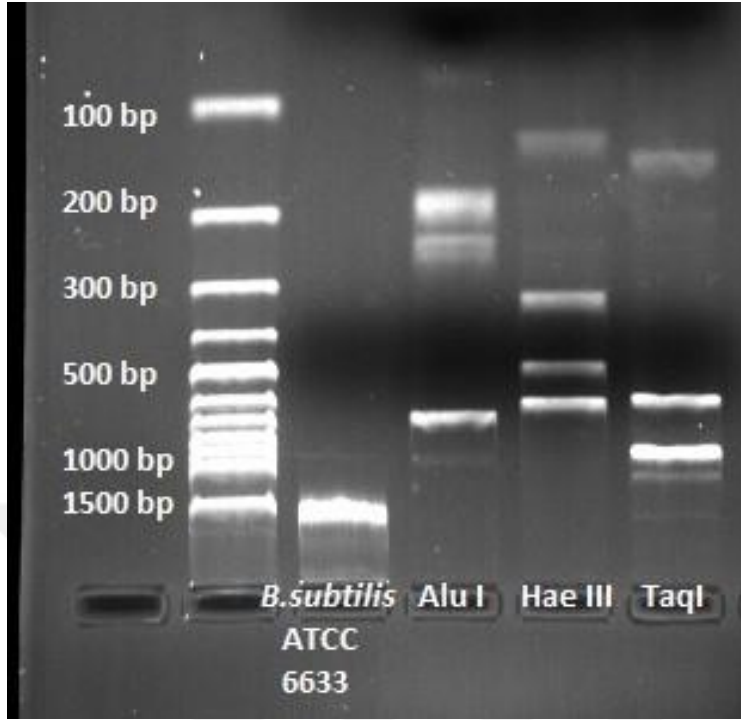
3.5.5.6. *B. cereus* ATCC 10876'ün Referans ARDRA profili



Şekil 3.32. *B. cereus* ATCC 10876 suşunun Alu I, Hae III ve Taq I enzimleriyle kesilmiş ARDRA Profili

B. cereus ATCC 10876 suşunun 16S rRNA gen bölgesinin; Alu I restriksiyon enzimi kesimi sonucu 680, 240 ve 180 baz çifti uzunluğunda 3 bant, Hae III restriksiyon enzimi kesimi sonucu 590, 480, 310 ve 120 baz çifti uzunluğunda 4 bant, Taq I restriksiyon enzimi kesimi sonucu 800, 560 ve 140 baz çifti uzunluğunda 3 bant açığa çıkmıştır.

3.5.5.7. *B. subtilis* ATCC 6633'ün Referans ARDRA profili

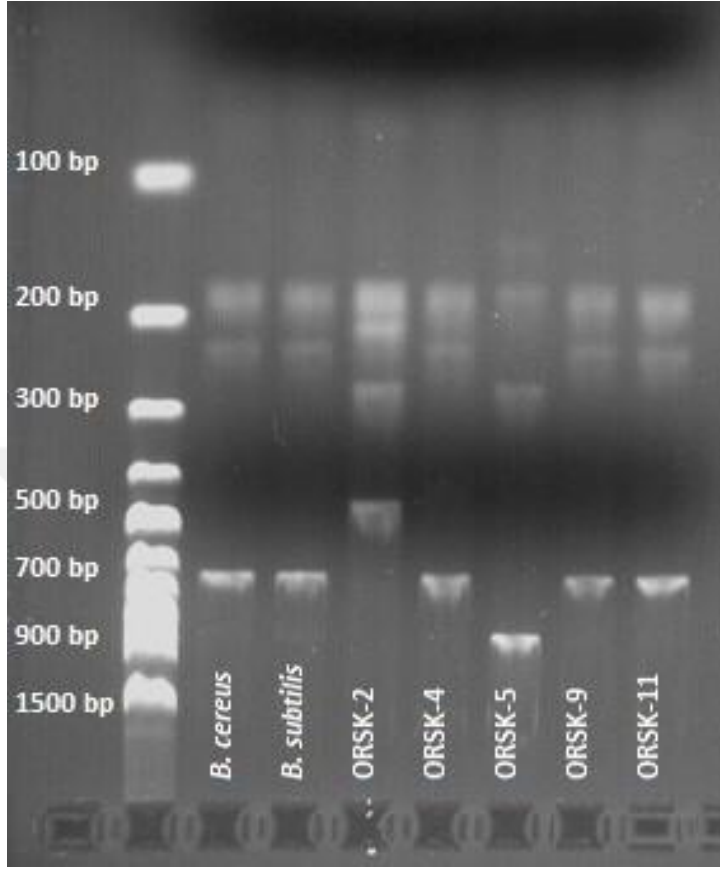


Şekil 3.33. *B. subtilis* ATCC 6633 suşunun Alu I, Hae III ve Taq I enzimleriyle kesilmiş ARDRA Profili

B. subtilis ATCC 6633 suşunun 16S rRNA gen bölgesinin; Alu I restriksiyon enzimi kesimi sonucu 680, 240 ve 180 baz çifti uzunluğunda 3 bant, Hae III restriksiyon enzimi kesimi sonucu 590, 480, 310 ve 120 baz çifti uzunluğunda 4 bant, Taq I restriksiyon enzimi kesimi sonucu 800, 560 ve 140 baz çifti uzunluğunda 3 bant açığa çıkmıştır.

3.5.5.8. İzolatların Farklı Kesim Enzimlerle Kesim Yürütmeleri

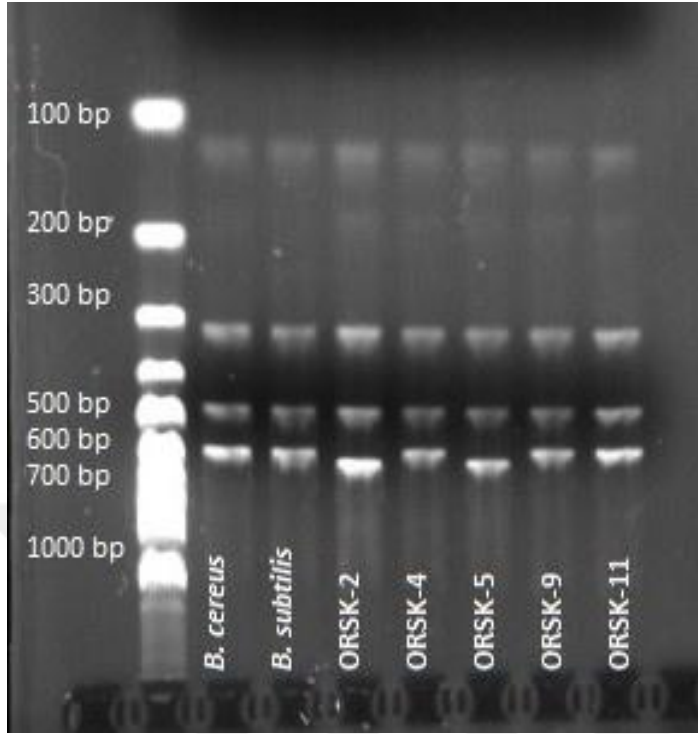
3.5.5.8.1. Alu I Enzimi



Şekil 3.34. Alu I kesim enziminin referans suşlar ve tüm izolatlardaki ARDRA Profili

Referans suşlar ve 5 izolatın 16S rRNA gen bölgelerinin Alu I restriksiyon enzimiyle kesilmesi sonucu ORSK-2 (*B.mojavensis*) ve ORSK-5 (*B.licheniformis*) izolatlarının *B.cereus* ATCC 10876 ve *B.subtilis* ATCC 6633 suşundan farklı kesim profili sergilediği bulunmuştur. ORSK-4 (*B.cereus*), ORSK-9 (*B.thuringiensis*) ve ORSK-11 (*B.toyonensis*) izolatları ise referans suşlarla aynı kesim profilini göstermiştir.

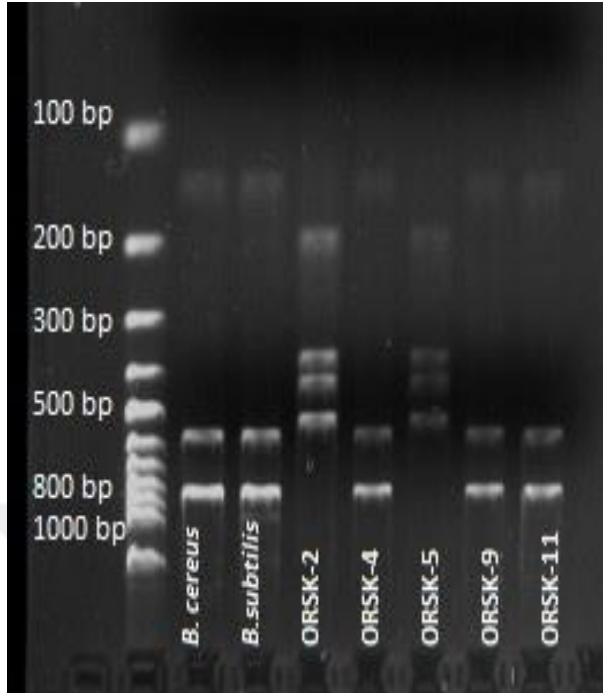
3.5.5.8.2. Hae III Enzimi



Şekil 3.35. Hae III kesim enziminin referans suşlar ve tüm izolatlardaki ARDRA Profili

Referans suşlar ve 5 izolatın 16S rRNA gen bölgelerinin Hae III restriksiyon enzimiyle kesilmesi sonucu ORSK-2 (*B. mojavensis*) ve ORSK-5 (*B. licheniformis*) izolatlarının *B. cereus* ATCC 10876 ve *B. subtilis* ATCC 6633 suşundan farklı kesim profili sergilediği bulunmuştur. ORSK-4 (*B. cereus*), ORSK-9 (*B. thuringiensis*) ve ORSK-11 (*B. toyonensis*) izolatları ise referans suşlarla aynı kesim profilini göstermiştir.

3.5.5.8.3. Taq I Enzimi



Şekil 3.36. Taq I kesim enziminin referans suşlar ve tüm izolatlardaki ARDRA Profili

Referans suşlar ve 5 izolatın 16S rRNA gen bölgelerinin Taq I restriksiyon enzimiyle kesilmesi sonucu ORSK-2 (*B. mojavensis*) ve ORSK-5 (*B. licheniformis*) izolatlarının *B. cereus* ATCC 10876 ve *B. subtilis* ATCC 6633 suşundan farklı kesim profili sergilediği bulunmuştur. ORSK-4 (*B. cereus*), ORSK-9 (*B. thuringiensis*) ve ORSK-11 (*B. toyonensis*) izolatları ise referans suşlarla aynı kesim profilini göstermiştir.

3.6. Mikroorganizmaların Proteaz Enzimi Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi

3.6.1. Proteaz Aktivitesinin Ölçülmesi

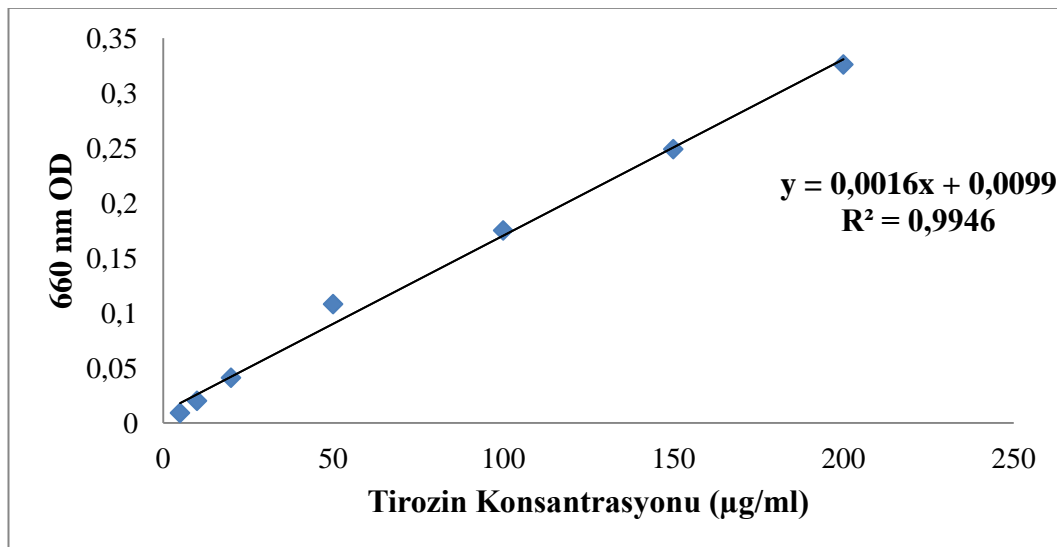
Takami (1989)'nin kullanmış olduğu yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu yöntemde uygun besiyerinde inkübasyonu tamamlanan örnekler 5000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

3.6.2. Tirozin Standart Grafiği

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan tirozinin ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi için 10 mg/ml tirozin pH 9'luk 50 mM Glisin-NaOH tamponunda çözdürülerek stok hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200 µg/mL olacak şekilde seyreltmeler yapılmıştır. Hazırlanan seyreltmelerden 3 tekrarlı olacak şekilde; 25 µL alınmış ve üzerine sırasıyla 125 µl 0.5 M Na₂CO₃ ile 25 µL1N Folin-Ciocalteu's Phenol reaktifi eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda her seyreltmenin 660 nm'deki optik yoğunluğu ölçülerek tekrarların ortalama sonuçlarıyla standart grafik çizilmiştir (Şekil 3.37). Standart grafikteki eğim, (formüldeki X değerinin katsayısı) Ekstinksiyon katsayısı olarak alınmıştır.

Bir ünite (U/ml) proteaz enzimi, 37 °C'de, dakikada 1 µg tirozinin açığa çıkması için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Aktivitenin hesaplanması aşağıdaki formüle göre yapılacaktır.

$$\text{Enzim Aktivitesi(U/ml)} = \frac{(\text{OD660/eğim}) \times \text{Toplam Hacim}}{\text{Enzim Hacmi (ml)} \times \text{İnkübasyon Süresi}} \quad (3.1)$$



Şekil 3.37. Tirozin Standart Grafiği

3.6.3. Proteaz Enzimi Üretiminde Kullanılan Besiyeri

Proteaz enzimi üretimi için Gessese ve ark. (1997) kullandığı besi yeri kullanılmış ve bu besiyerindeki proteaz enzimi üretimi ile nutrient broth besiyerindeki proteaz enzimi üretimleri karşılaştırılmıştır.

3.6.4. Optimum Enzim Üretim Sıcaklığının, pH'sının ve Gününün Belirlenmesi

3.6.4.1 ORSK-2 (*Bacillus mojavensis*) İzolatının Optimum Enzim Üretim Şartlarının Belirlenmesi

ORSK-2 (*Bacillus mojavensis*) izolatının enzim besiyerindeki (E.B) ve Nutrient broth (N.B) besiyerindeki optimum proteaz enzim aktiviteleri Çizelge 3.9 ve Şekil 3.38 'te verilmiştir.

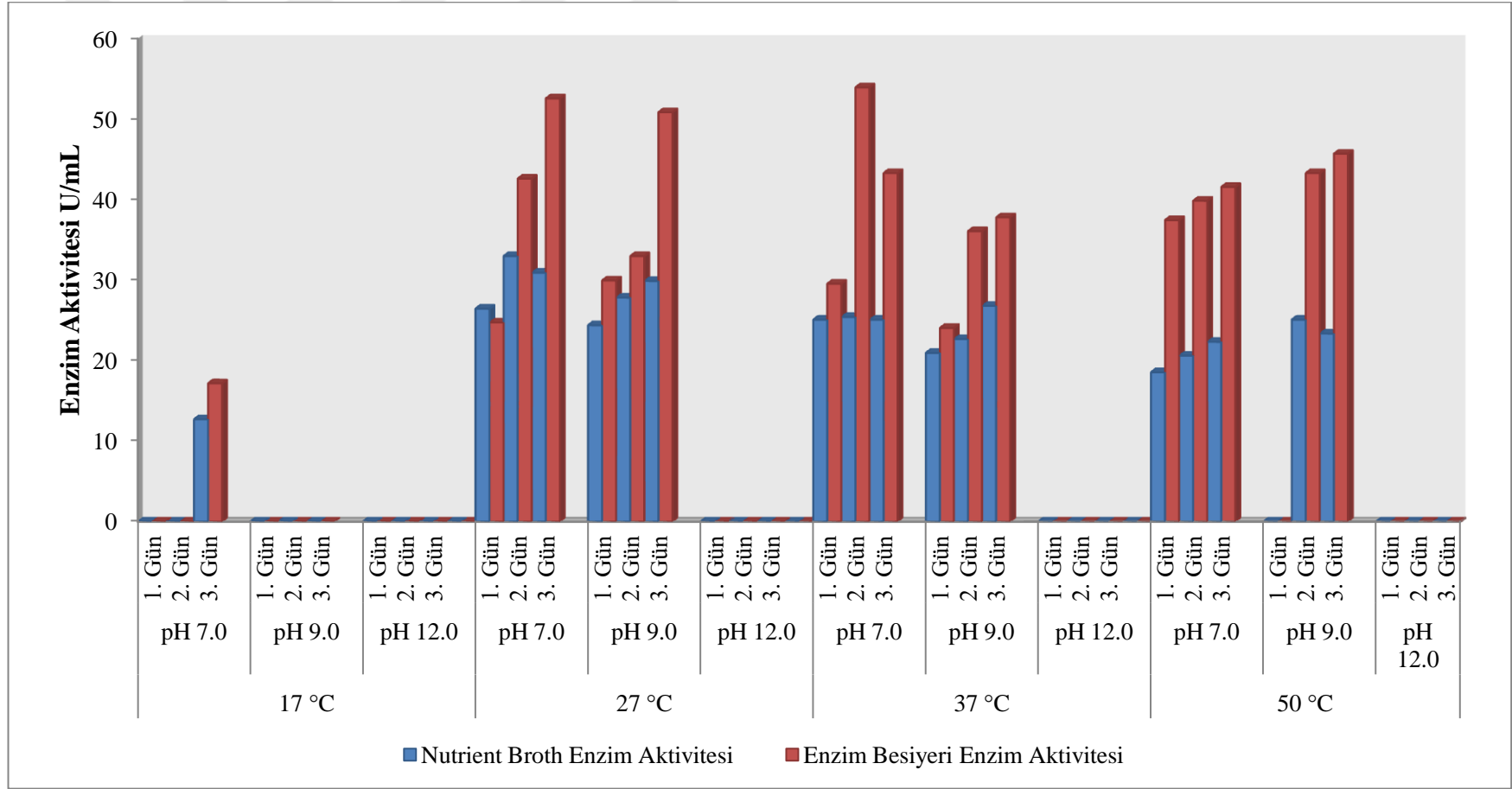
Çizelge 3.9. ORSK-2 (*Bacillus mojavensis*) izolatının optimum enzim üretim şartları

17 °C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	0	0	12,718	0	0	0	0	0	0
E.B Enzim Aktivitesi	0	0	17,187	0	0	0	0	0	0

27 °C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	26,468	33	30,937	24,406	27,843	29,906	0	0	0
E.B Enzim Aktivitesi	24,75	42,625	52,593	29,968	33	50,875	0	0	0

37 °C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	25,093	25,437	25,093	20,968	22,687	26,812	0	0	0
E.B Enzim Aktivitesi	29,562	53,968	43,312	24,062	36,093	37,812	0	0	0

50°C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	18,562	20,625	22,343	0	25,093	23,375	0	0	0
E.B Enzim Aktivitesi	37,468	39,875	41,593	0	43,312	45,718	0	0	0



Şekil 3.38. ORSK-2 (*Bacillus mojavensis*) izolatının optimum enzim üretim şartları

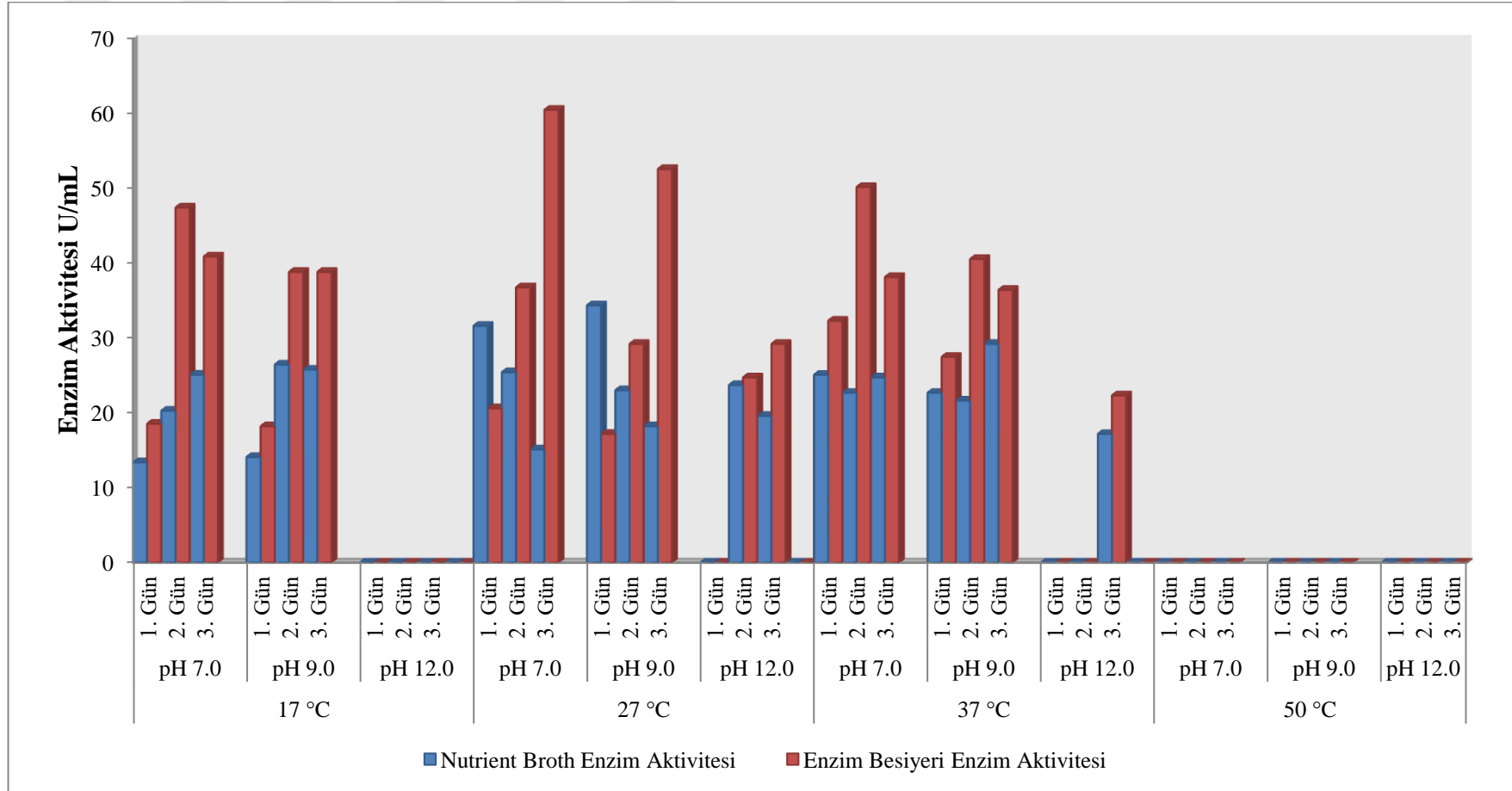
En yüksek enzim aktivitesi, enzim besiyerinde, 37 °C, pH 7.0 ve 2 günlük inkübasyon süresinde 53,964 U/mL olarak bulunmuştur.

3.6.4.2. ORSK-4 (*Bacillus cereus*) İzolatının Optimum Enzim Üretim Şartlarının Belirlenmesi

ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatının enzim besiyerindeki (E.B) ve Nutrient broth besiyerindeki (N.B) optimum proteaz enzim aktiviteleri Çizelge 3.10 ve Şekil 3.39 'te verilmiştir.

Çizelge 3.10. ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatının optimum enzim aktiviteleri

17 °C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	13,406	20,281	25,093	14,093	26,468	25,781	0	0	0
E.B Enzim Aktivitesi	18,562	47,437	40,906	18,218	38,843	38,843	0	0	0
27 °C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	31,625	25,437	15,125	34,375	23,031	18,218	0	23,718	19,593
E.B Enzim Aktivitesi	20,625	36,781	60,5	17,187	29,218	52,593	0	24,75	29,218
37 °C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	25,093	22,687	24,75	22,687	21,656	29,218	0	0	17,187
E.B Enzim Aktivitesi	32,312	50,187	38,156	27,5	40,562	36,437	0	0	22,343
50°C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E.B Enzim Aktivitesi	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 3.39. ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatının optimum enzim üretim şartları

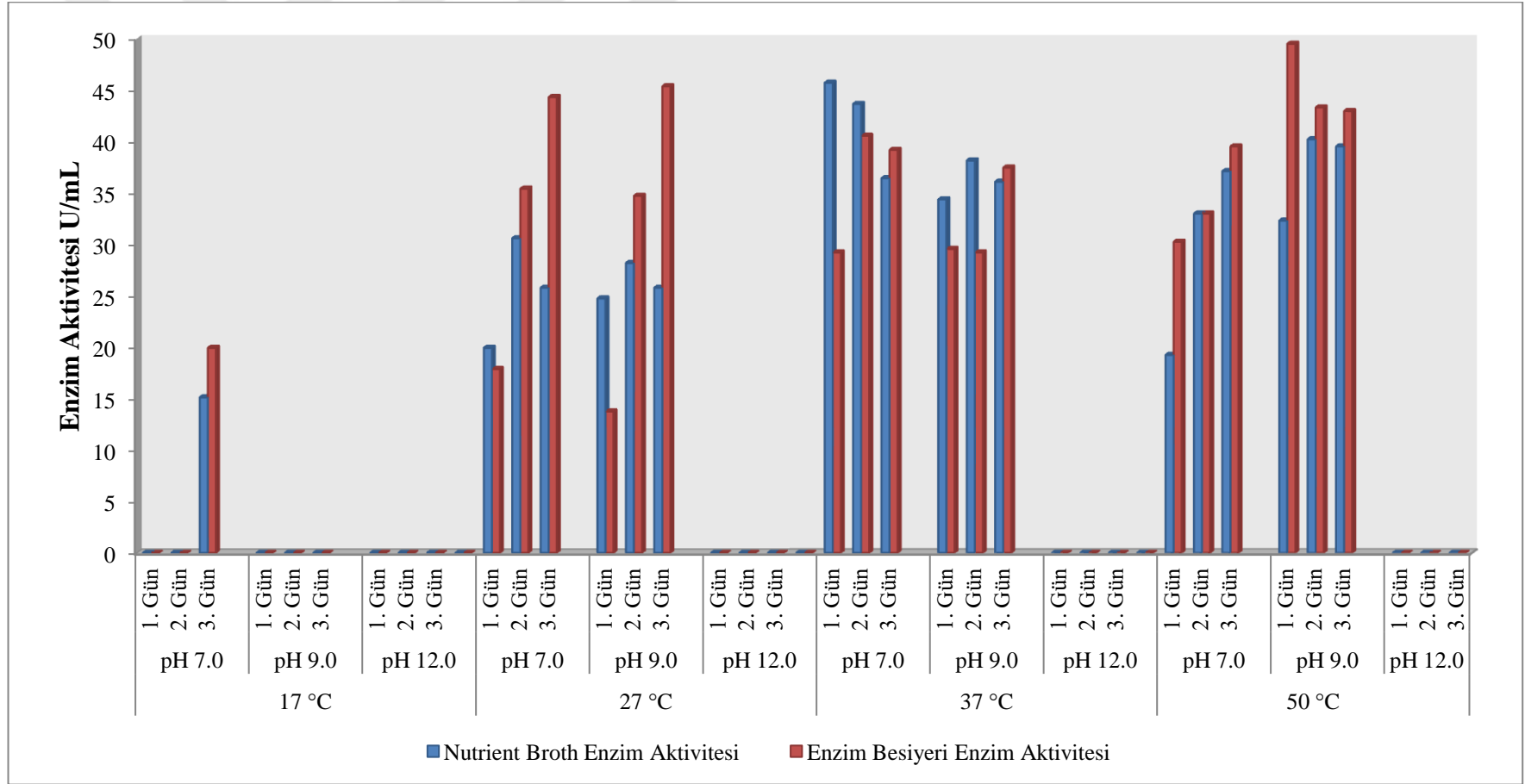
En yüksek enzim aktivitesi, enzim besiyerinde, 27 °C, pH 7.0 ve 3 günlük inkübasyon süresinde 60,5 U/mL olarak bulunmuştur.

3.6.4.3. ORSK-5 (*Bacillus licheniformis*) İzolatının Optimum Enzim Üretim Şartlarının Belirlenmesi

ORSK-5 (*Bacillus licheniformis*) izolatının enzim besiyerindeki (E.B) ve Nutrient broth besiyerindeki (N.B) optimum proteaz enzim aktiviteleri Çizelge 3.11 ve Şekil 3.40'ta verilmiştir.

Çizelge 3.11. ORSK-5 (*Bacillus licheniformis*) izolatının optimum enzim üretim şartları

17 °C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	0	0	15,125	0	0	0	0	0	0
E.B Enzim Aktivitesi	0	0	19,937	0	0	0	0	0	0
27 °C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	19,937	30,593	25,781	24,75	28,187	25,781	0	0	0
E.B Enzim Aktivitesi	17,875	35,406	44,323	13,75	34,718	45,375	0	0	0
37 °C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	45,718	43,656	36,437	34,375	38,156	36,093	0	0	0
E.B Enzim Aktivitesi	29,218	40,562	39,187	29,562	29,218	37,468	0	0	0
50°C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	19,25	33	37,125	32,312	40,218	39,531	0	0	0
E.B Enzim Aktivitesi	30,25	33	39,531	49,5	43,312	42,968	0	0	0



Şekil 3.40. ORSK-5 (*Bacillus licheniformis*) izolatının optimum enzim üretim şartları

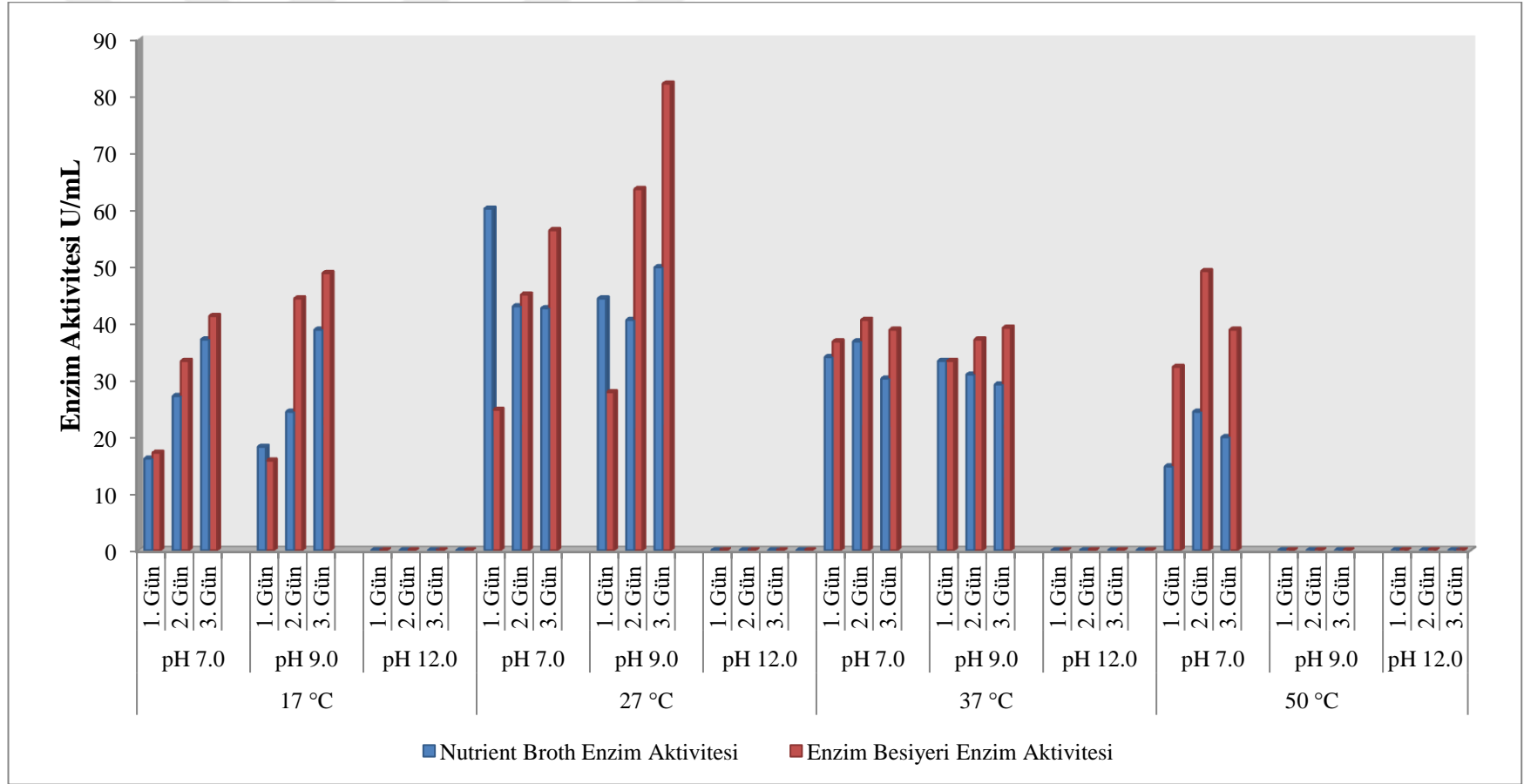
En yüksek enzim aktivitesi, enzim besiyerinde, 50 °C, pH 9.0 ve 1 günlük inkübasyonda 49,5 U/mL olarak bulunmuştur.

3.6.4.4. ORSK-7 (*Aeromonas salmonicida*) İzolatının Optimum Enzim Üretim Şartlarının Belirlenmesi

ORSK-7 (*Aeromonas salmonicida*) izolatının enzim besiyerindeki (E.B) ve Nutrient broth besiyerindeki (N.B) optimum proteaz enzim aktiviteleri Çizelge 3.12 ve Şekil 3.41’te verilmiştir.

Çizelge 3.12. ORSK-7 (*Aeromonas salmonicida*) izolatının optimum enzim üretim şartları

17 °C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	16,156	27,156	37,125	18,218	24,406	38,843	0	0	0
E.B Enzim Aktivitesi	17,187	33,343	41,25	15,812	44,343	48,812	0	0	0
27 °C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	60,156	42,968	42,625	44,343	40,562	49,843	0	0	0
E.B Enzim Aktivitesi	24,75	45,031	56,375	27,843	63,593	82,156	0	0	0
37 °C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	34,031	36,781	30,25	33,343	30,937	29,218	0	0	0
E.B Enzim Aktivitesi	36,781	40,562	38,843	33,343	37,125	39,187	0	0	0
50°C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	14,781	24,406	19,937	0	0	0	0	0	0
E.B Enzim Aktivitesi	32,312	49,156	38,843	0	0	0	0	0	0



Şekil 3.41. ORSK-7 (*Aeromonas salmonicida*) izolatının optimum enzim üretim şartları

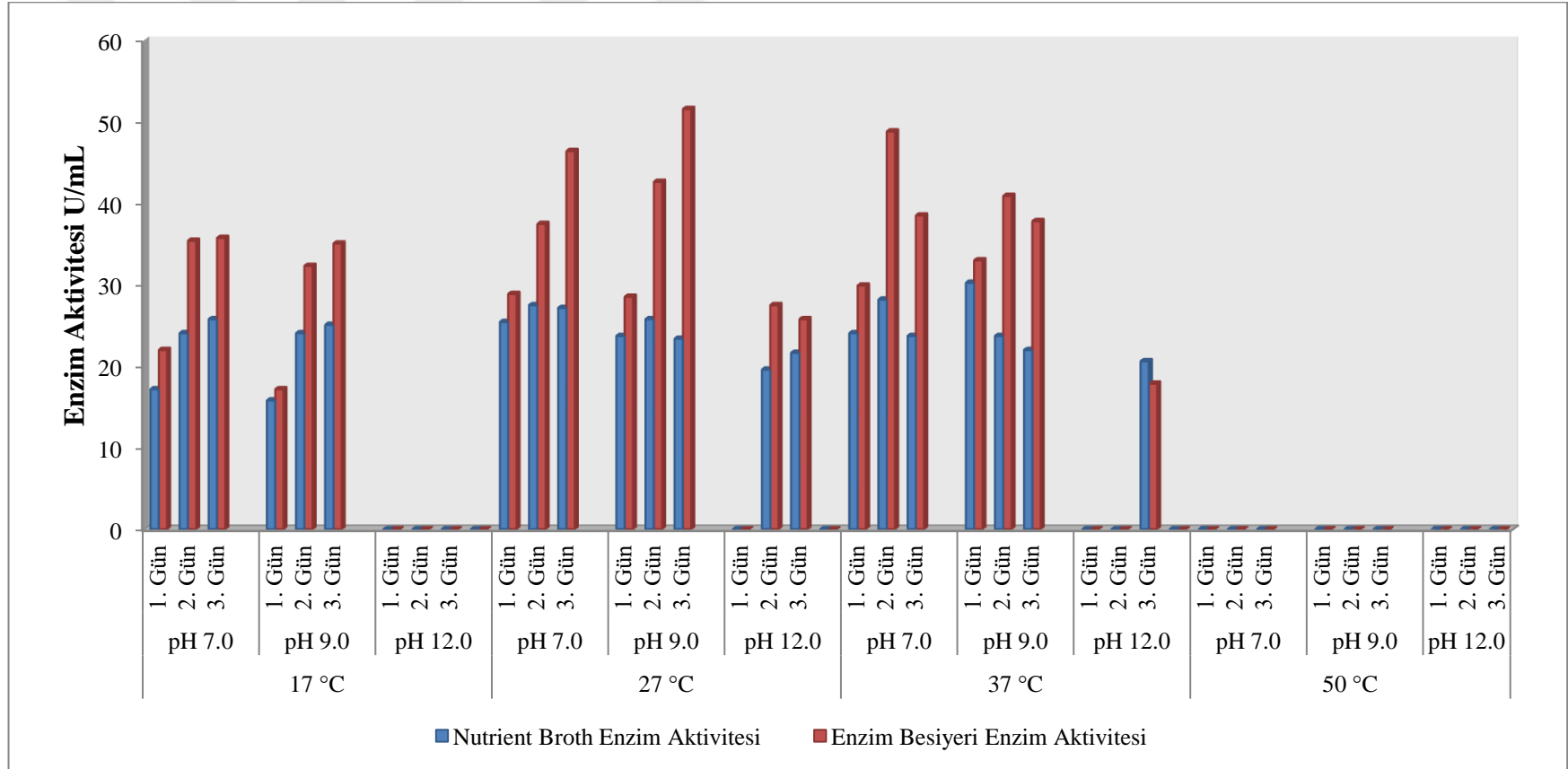
En yüksek enzim aktivitesi, enzim besiyerinde, 27 °C, pH 9.0 ve 3 günlük inkübasyonda 82,156 U/mL olarak bulunmuştur.

3.6.4.5. ORSK-9 (*Bacillus thuringiensis*) İzolatının Optimum Enzim Üretim Şartlarının Belirlenmesi

ORSK-9 (*Bacillus thuringiensis*) izolatının enzim besiyerindeki (E.B) ve Nutrient broth besiyerindeki (N.B) optimum proteaz enzim aktiviteleri Çizelge 3.13 ve Şekil 3.42 'te verilmiştir.

Çizelge 3.13. ORSK-9 (*Bacillus thuringiensis*) izolatının optimum enzim üretim şartları

17 °C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	17,187	24,062	25,781	15,812	24,062	25,093	0	0	0
E.B Enzim Aktivitesi	22	35,406	35,75	17,187	32,312	35,062	0	0	0
27 °C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	25,437	27,5	27,156	23,718	25,781	23,375	0	19,593	21,656
E.B Enzim Aktivitesi	28,875	37,468	46,406	28,531	42,625	51,562	0	27,5	25,781
37 °C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	24,062	28,187	23,718	30,25	23,718	22	0	0	20,625
E.B Enzim Aktivitesi	29,906	48,812	38,5	33	40,906	37,812	0	0	17,875
50°C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E.B Enzim Aktivitesi	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 3.42. ORSK-9 (*Bacillus thuringiensis*) izolatının optimum enzim üretim şartları

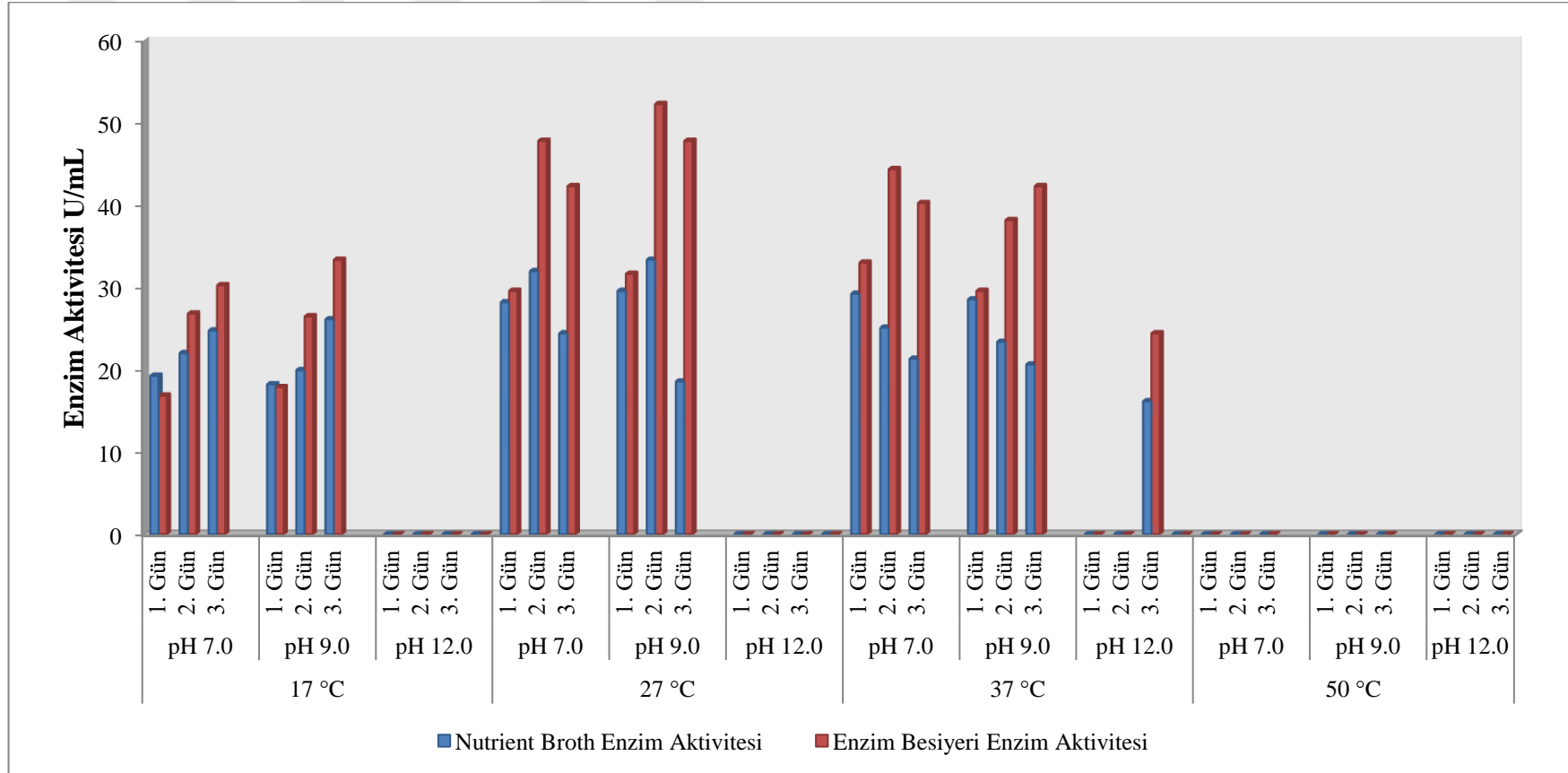
En yüksek enzim aktivitesi, enzim besiyerinde, 27 °C, pH 9.0 ve 3 günlük inkübasyonda 51,562 U/mL olarak bulunmuştur.

3.6.4.6. ORSK-11 (*Bacillus toyonensis*) İzolatının Optimum Enzim Üretim Şartlarının Belirlenmesi

ORSK-11 (*Bacillus toyonensis*) izolatının enzim besiyerindeki (E.B) ve Nutrient broth besiyerindeki (N.B) optimum proteaz enzim aktiviteleri Çizelge 3.14 ve Şekil 3.43'te verilmiştir.

Çizelge 3.14. ORSK-11 (*Bacillus toyonensis*) izolatının optimum enzim üretim şartları

17 °C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	19,25	22	24,75	18,218	19,937	26,125	0	0	0
E.B Enzim Aktivitesi	16,843	26,812	30,25	17,875	26,468	33,343	0	0	0
27 °C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	28,187	31,968	24,406	29,562	33,343	18,562	0	0	0
E.B Enzim Aktivitesi	29,562	47,781	42,281	31,625	52,25	47,781	0	0	0
37 °C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	29,218	25,093	21,312	28,531	23,375	20,625	0	0	16,156
E.B Enzim Aktivitesi	33	44,343	40,218	29,562	38,156	42,281	0	0	24,406
50°C Enzim Aktivitesi (U/mL)									
	pH 7.0			pH 9.0			pH 12.0		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün
N.B Enzim Aktivitesi	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E.B Enzim Aktivitesi	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 3.43. ORSK-11 (*Bacillus toyonensis*) izolatının optimum enzim üretim şartları

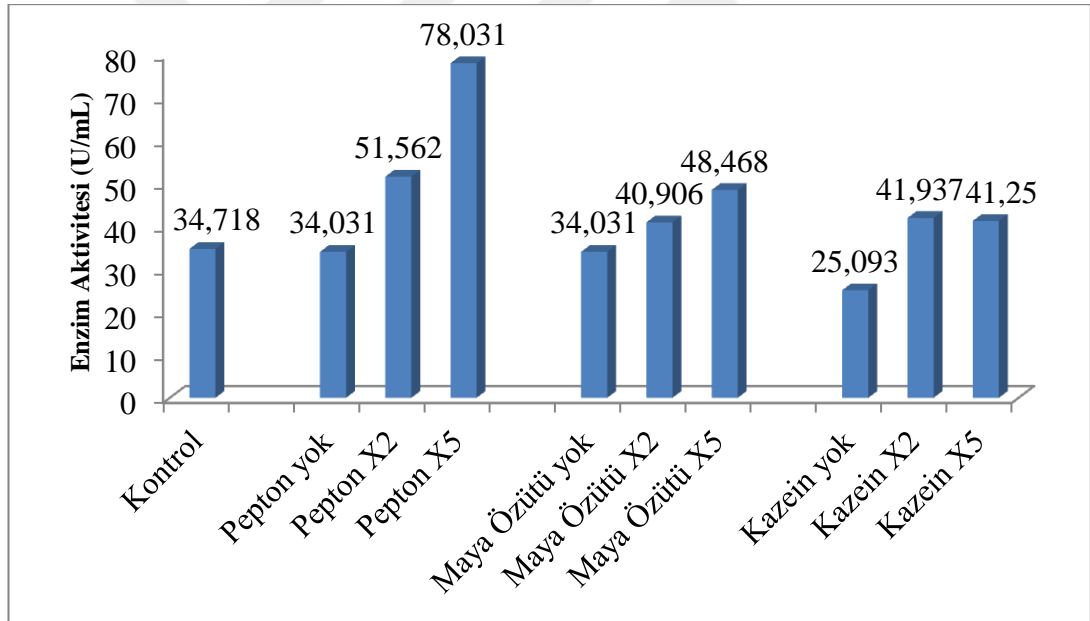
En yüksek enzim aktivitesi, enzim besiyerinde, 27 °C, pH 9.0 ve 2 günlük inkübasyonda 52,25 U/mL olarak bulunmuştur.

6 izolat arasından en yüksek proteaz enzimi aktivitesini ORSK-7 izolatı göstermiştir. Ancak ORSK-7 izolatının moleküler tanımlanma sonucu *Aeromonas salmonicida* çıkmıştır. *Aeromonas salmonicida* patojen bir suş olduğu için endüstride kullanımı uygun değildir. Bundan dolayı sonraki işlemlere en yüksek 2. Proteaz enzimi aktivitesine sahip ORSK-4 izolatı (*Bacillus cereus*) üzerinden devam edilmiştir.

3.6.5. Farklı Üreme Ortamlarının Proteaz Aktivitesine Etkisi

3.6.5.1. Kullanılan Enzim Besiyeri İçerik Değişikliklerinin ORSK-4 (*Bacillus cereus*) Enzim Aktivitesine Etkisi

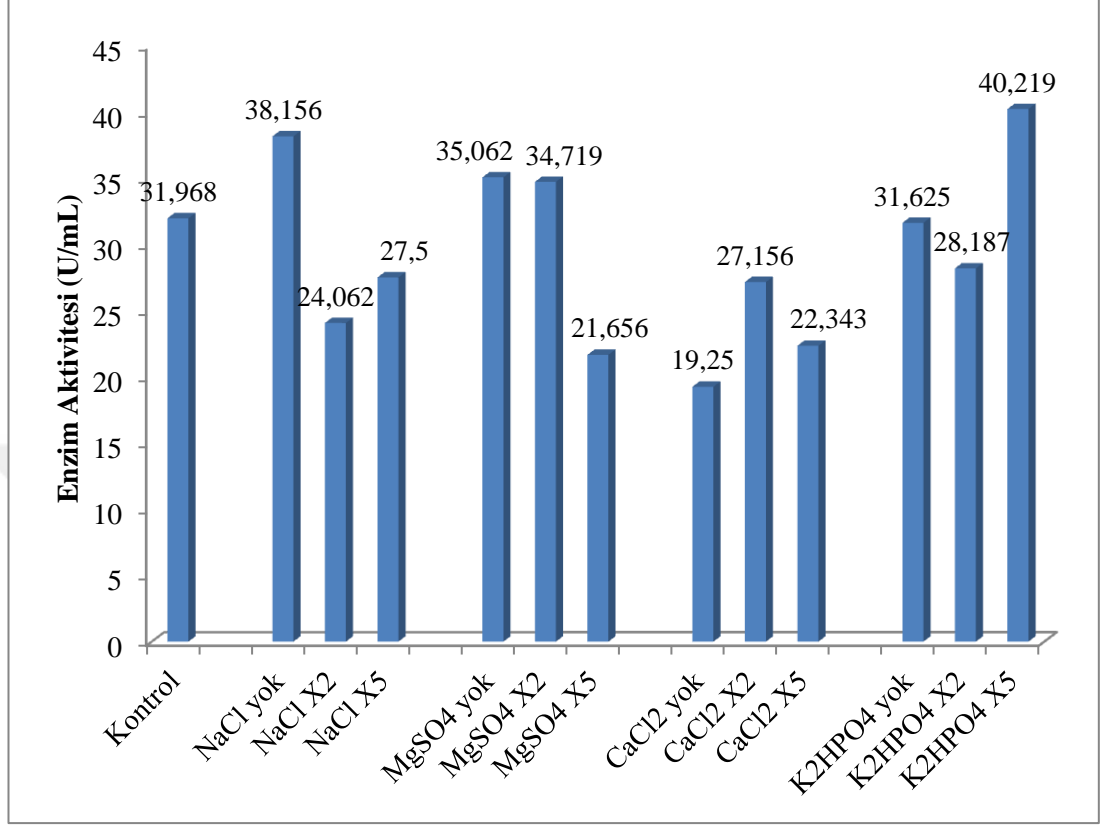
Organik enzim besiyeri içerik değişikliklerinin ORSK-4 (*Bacillus cereus*) proteaz enzimi aktivitesine etkisi Şekil 3.44'te verilmiştir.



Şekil 3.44. Organik enzim besiyeri içerik değişikliklerinin ORSK-4 (*Bacillus cereus*) enzim aktivitesine etkisi

Organik bileşiklerin değiştirilmesi sonucu proteaz enzimi aktivitesini en çok yükselten bileşik kontrole göre 5 kat arttırılmış pepton miktarıdır. Ortamda kazein olmaması da proteaz enzim aktivitesini en fazla düşüren etmendir.

İnorganik enzim besiyeri içerik değişikliklerinin ORSK-4 (*Bacillus cereus*) proteaz enzimi aktivitesine etkisi Şekil 3.45'te verilmiştir.

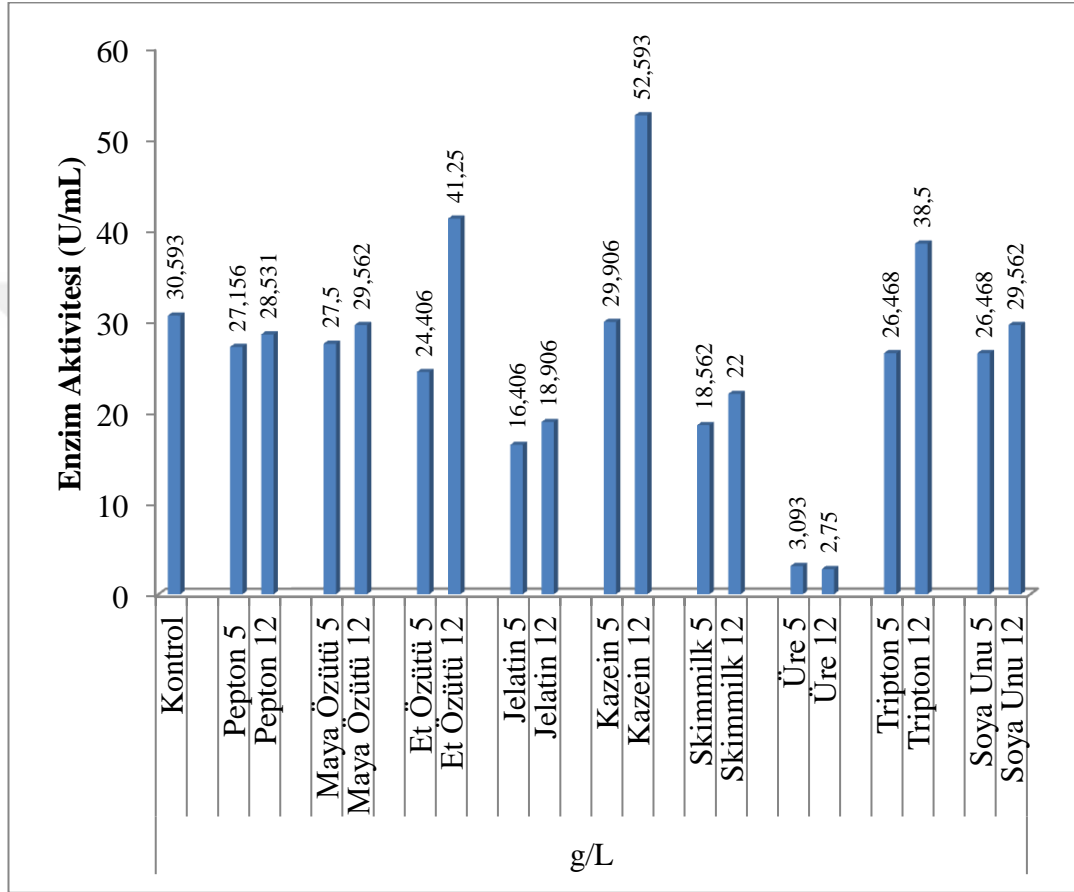


Şekil 3.45. İnorganik enzim besiyeri içerik değişikliklerinin ORSK-4 (*Bacillus cereus*) enzim aktivitesine etkisi

İnorganik bileşiklerin değiştirilmesi sonucu proteaz enzim aktivitesini en çok yükselten bileşik kontrole göre 5 kat arttırılmış K_2HPO_4 miktarıdır. Ortamda $CaCl_2$ olmaması da proteaz enzim aktivitesini en fazla düşüren etmendir.

3.6.5.2. Organik Bileşik Olarak Sadece Azot Kaynağı Kullanılan Besiyerinin ORSK-4 (*Bacillus cereus*) Enzim Aktivitesine Etkisi

Organik bileşik olarak sadece azot kaynağı kullanılan besiyerinin ORSK-4 (*Bacillus cereus*) proteaz enzimi aktivitesine etkisi Şekil 3.46’te verilmiştir.

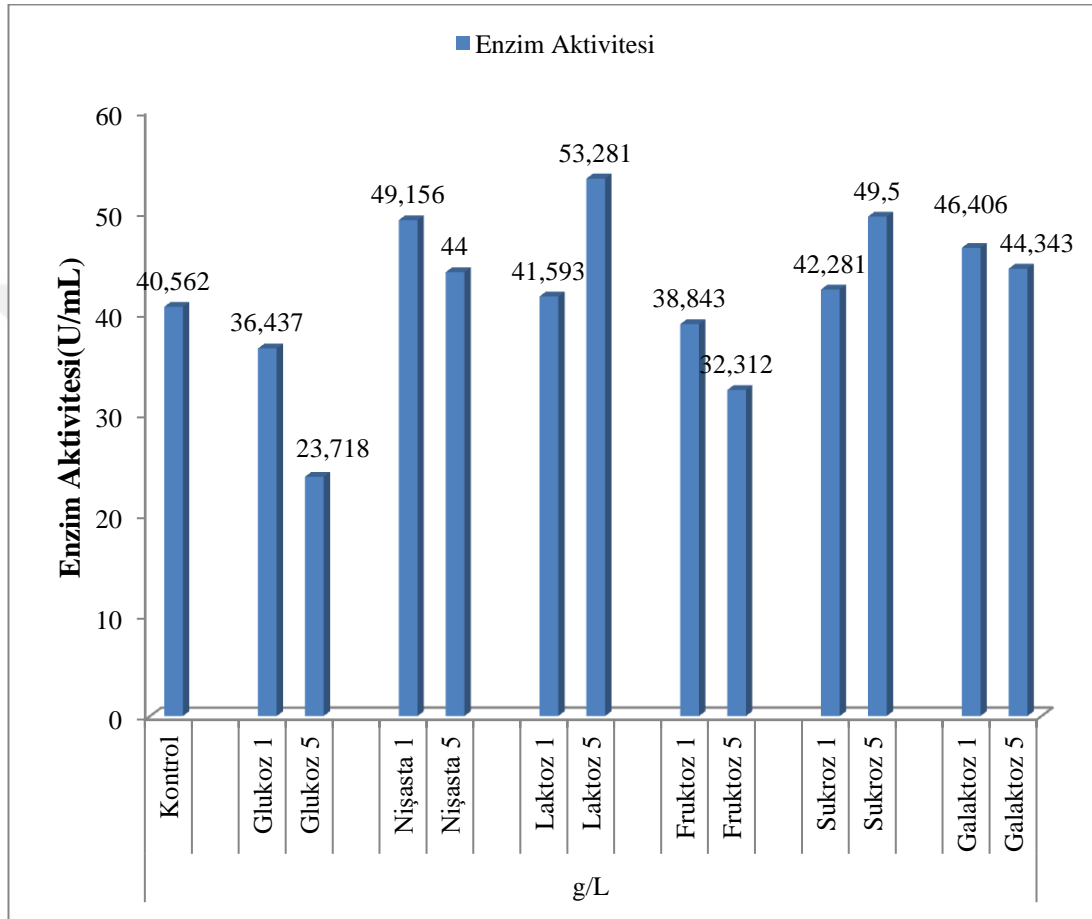


Şekil 3.46. Sadece azot kaynağı kullanılan besiyerinin ORSK-4 (*Bacillus cereus*) enzim aktivitesine etkisi

Tek başına Azot kaynağı olacak şekilde hazırlanan besiyerinde proteaz enzimi aktivitesi en yüksek olan bileşik kazein 12 g/L ve et özütü 12 g/L’dir. Ortamda sadece üre olduğunda ise proteaz enzim aktivitesi yok denilecek kadar azdır.

3.6.5.3. Farklı Karbon Kaynaklarının ORSK-4 (*Bacillus cereus*) Enzim Aktivitesine Etkisi

Farklı karbon kaynaklarının ORSK-4 (*Bacillus cereus*) proteaz enzimi aktivitesine etkisi Şekil 3.47’de verilmiştir.

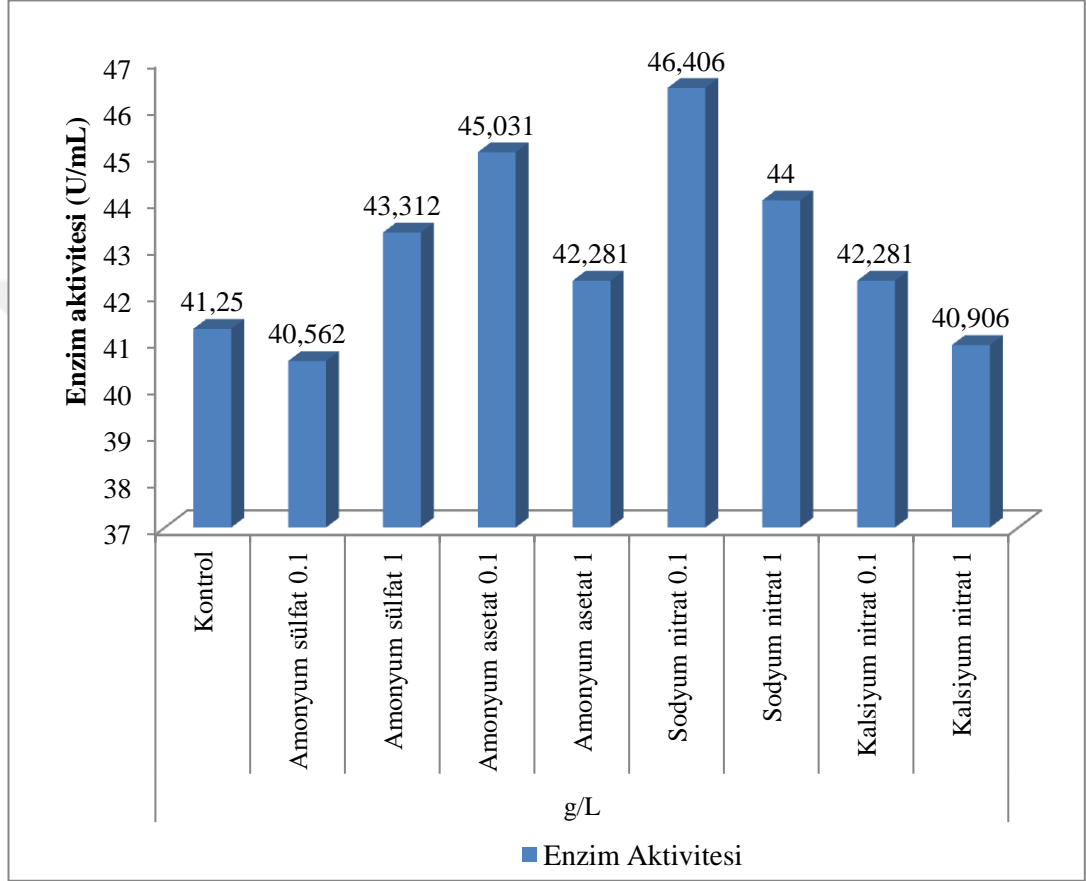


Şekil 3.47. Farklı karbon kaynaklarının ORSK-4 (*Bacillus cereus*) enzim aktivitesine etkisi

Besiyeri içersine glukoz ve fruktoz eklenmesi ORSK-4 (*Bacillus cereus*) proteaz enzimi aktivitesini belirgin şekilde düşürürken, besiyerine nişasta, laktoz, sukroz ve galaktoz eklenmesi ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatının proteaz enzimi aktivitesini arttırmaktadır.

3.6.5.4. Farklı İnorganik Azot Kaynaklarının ORSK-4 (*Bacillus cereus*) Enzim Aktivitesine Etkisi

Farklı inorganik azot kaynaklarının ORSK-4 (*Bacillus cereus*) proteaz enzimi aktivitesine etkisi Şekil 3.48’de verilmiştir.

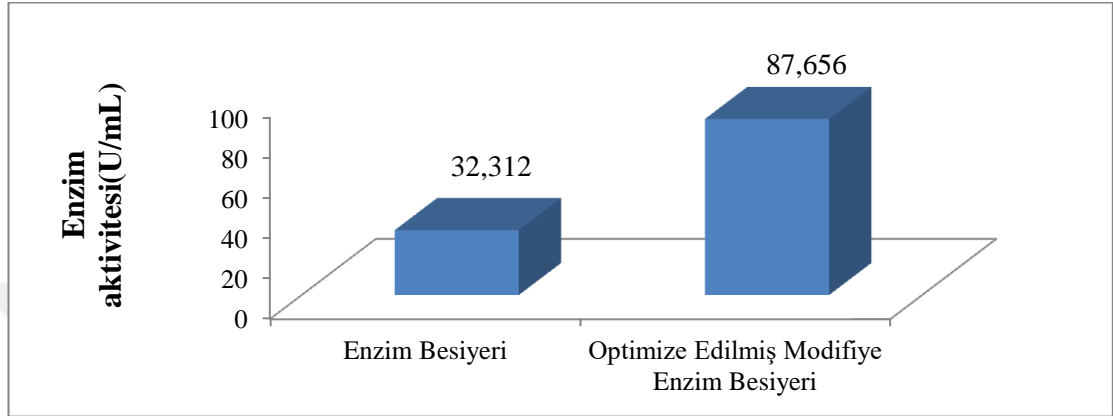


Şekil 3.48. Farklı inorganik azot kaynaklarının ORSK-4 (*Bacillus cereus*) enzim aktivitesine etkisi

Farklı inorganik azot kaynaklarından amonyum asetatın ve sodyum nitratın 0,1 g/L enzim besiyerine eklenmesi ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatının proteaz enzimi aktivitesini en fazla arttırırken; Amonyum sülfatın 0,1 g/L ve kalsiyum nitratın 1 g/L olarak eklenmesi ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatının proteaz enzimi aktivitesini azda olsa azaltmıştır.

3.6.5.5. Optimize Edilmiş Modifiye Besiyerinde ORSK-4 (*Bacillus cereus*) Enzim Aktivitesi

Optimize edilmiş modifiye besiyerinde ORSK-4 (*Bacillus cereus*) proteaz enzimi aktivitesi Şekil 3.49’da verilmiştir.

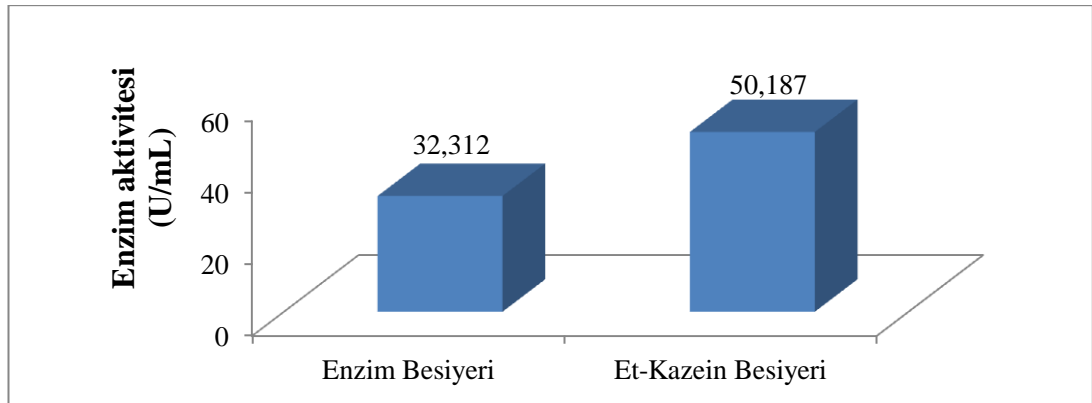


Şekil 3.49. Optimize edilmiş modifiye besiyerinde ORSK-4 (*Bacillus cereus*) enzim aktivitesi

Optimize edilmiş modifiye besiyerinde proteaz enzimi aktivitesi normal enzim besiyerine göre yaklaşık 3 kat daha yüksek olarak ölçülmüştür.

3.6.5.6. Et-Kazein Besiyerinde ORSK-4 (*Bacillus cereus*) Enzim Aktivitesi

Et-kazein besiyerinde ORSK-4 (*Bacillus cereus*) enzim aktivitesi Şekil 3.50’de verilmiştir.

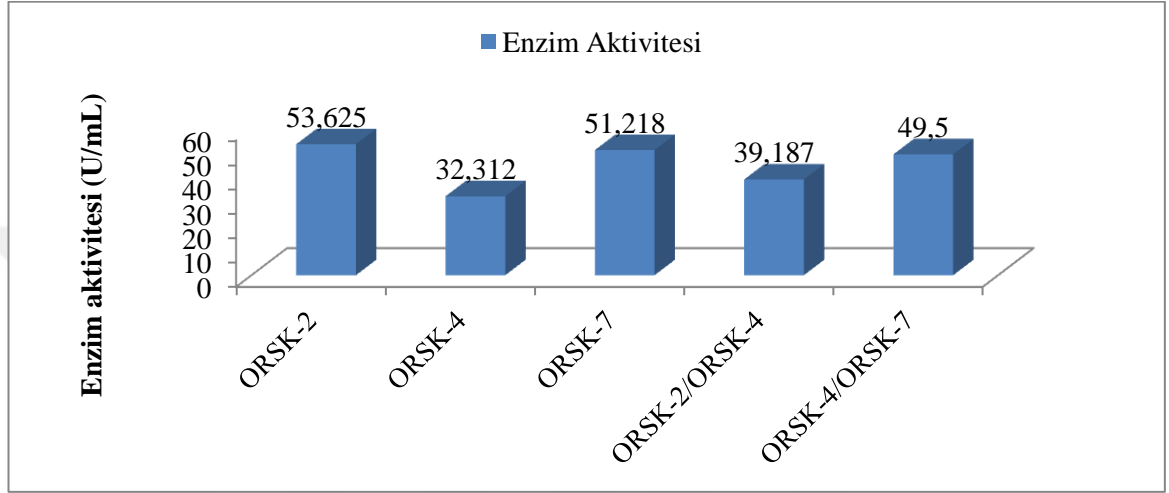


Şekil 3.50. Et-kazein besiyerinde ORSK-4 (*Bacillus cereus*) enzim aktivitesi

Et-Kazein besiyerinde ORSK-4 (*Bacillus cereus*) proteaz enzimi aktivitesi normal besiyerine göre yaklaşık 2 kat daha yüksek ölçülmüştür.

3.6.6. Rekabetin Proteaz Enzimi Üzerine Etkisi

Rekabetin proteaz enzimi üzerine etkisi Şekil 3.51’de verilmiştir.

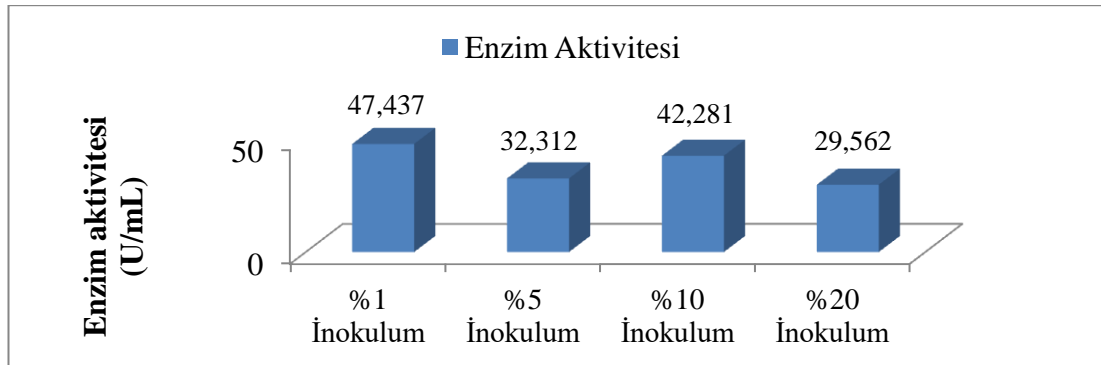


Şekil 3.51. Rekabetin proteaz enzimi üzerine etkisi

İzolatlar arasında rekabet ortamının yaratılması her iki rekabet şartında da proteaz enzim aktivitesini düşürmektedir.

3.6.7. Aşılama Miktarının ORSK-4 (*Bacillus cereus*) Enzim Aktivitesine Etkisi

Aşılama miktarının ORSK-4 (*Bacillus cereus*) proteaz enzimi aktivitesine etkisi Şekil 3.52’de verilmiştir.

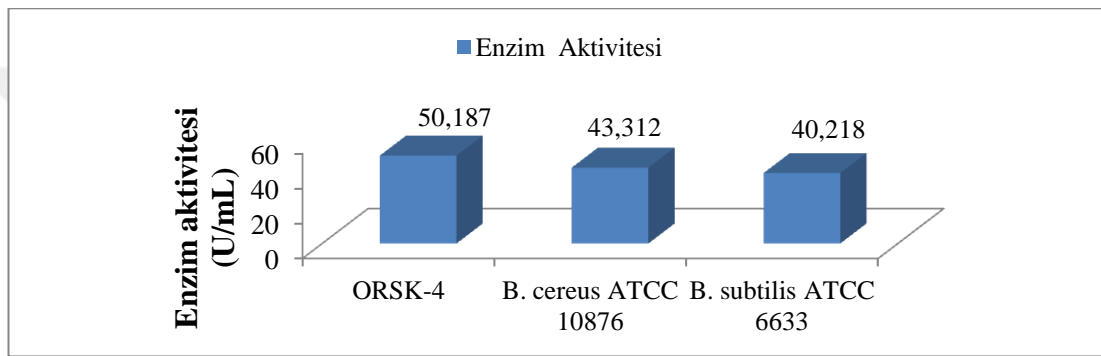


Şekil 3.52. Aşılama oranının ORSK-4 (*Bacillus cereus*) enzim aktivitesine etkisi

En yüksek proteaz aktivitesi aşılama (inokulum) oranının % 1 olduğu şartlarda en yüksek bulunmuştur.

3.6.8. Bazı *Bacillus* Cinsi Mikroorganizmalar ile İzole Edilen ORSK-4 (*Bacillus cereus*)'un Proteaz Aktivitesinin Karşılaştırılması

Bazı *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar ile izole edilen ORSK-4 (*Bacillus cereus*)'un proteaz aktivitesinin karşılaştırılması Şekil 3.53'te verilmiştir.



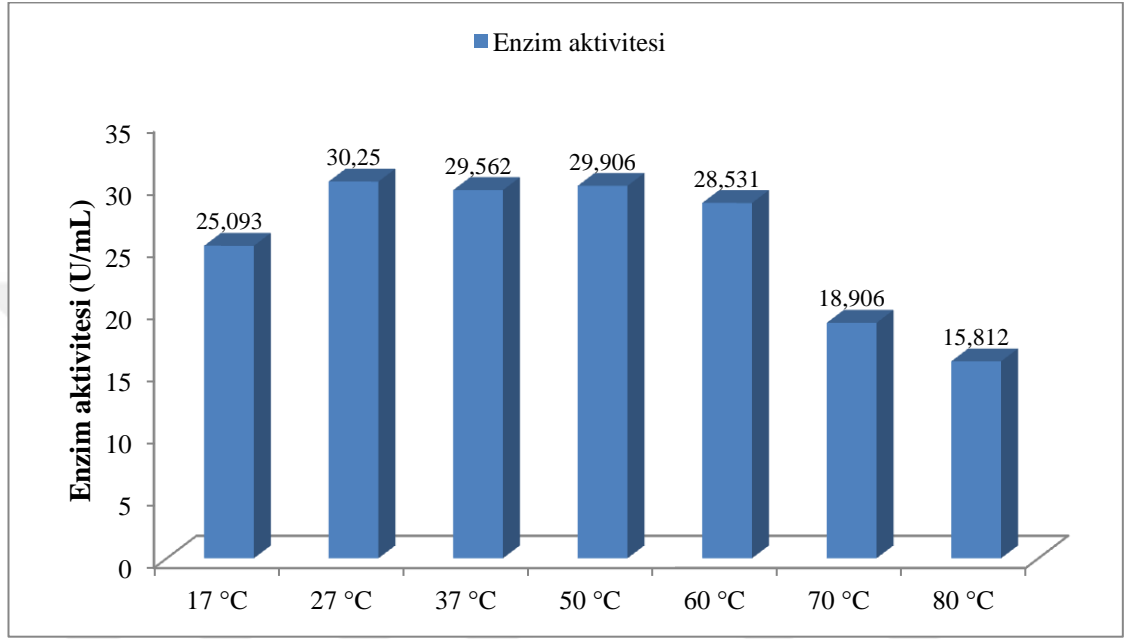
Şekil 3.53. Bazı *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar ile izole edilen ORSK-4 (*Bacillus cereus*)'un proteaz aktivitesinin karşılaştırılması

ORSK-4 izolatının enzim aktivitesi karşılaştırılan ATCC suşlarına göre daha yüksek aktivite göstermektedir.

3.6.9. İzole edilen ORSK-4 (*Bacillus cereus*)’ten Elde Edilen Proteaz Enziminin Kararlılığı

3.6.9.1. Enzimin Optimum Çalışma Sıcaklığının Saptanması

Enzimin optimum çalışma sıcaklığının saptanması Şekil 3.54’te verilmiştir.

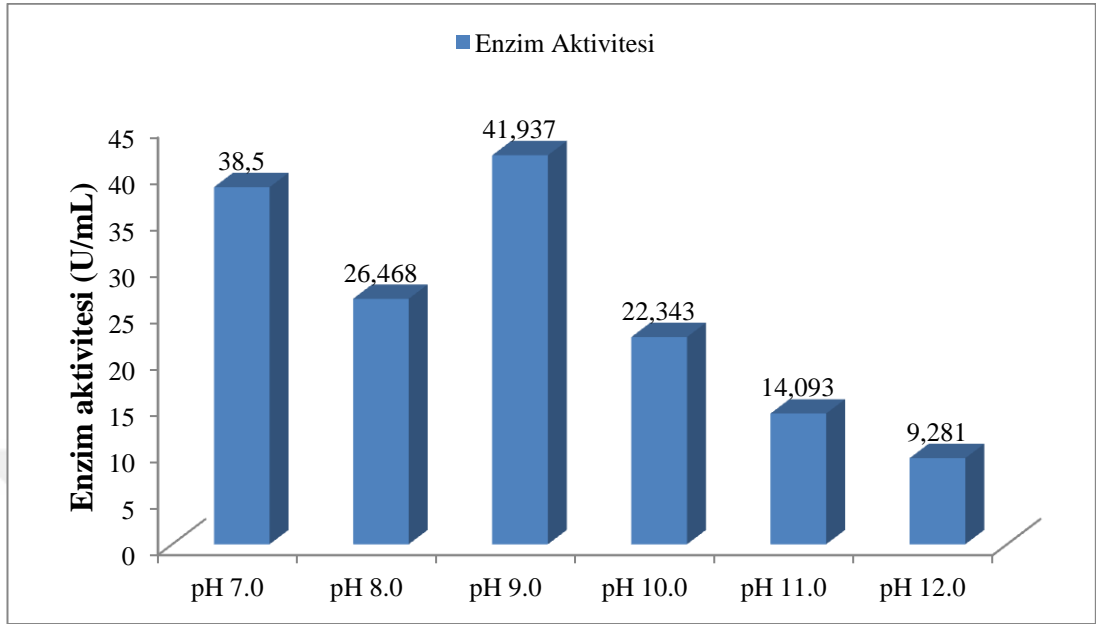


Şekil 3.54. Enzimin optimum çalışma sıcaklığının saptanması

İzole edilen ORSK-4 (*Bacillus cereus*)’ten elde edilen proteaz enziminin 27 °C ile 60 °C derece arasında benzer aktivite gösterdiği ancak 70 ve 80 °C ‘de aktivitesinin azaldığı gözlemlenmiştir.

3.6.9.2. Enzimin Optimum Çalışma pH'sının Saptanması

Enzimin optimum çalışma pH'sının saptanması Şekil 3.55'de gösterilmiştir.

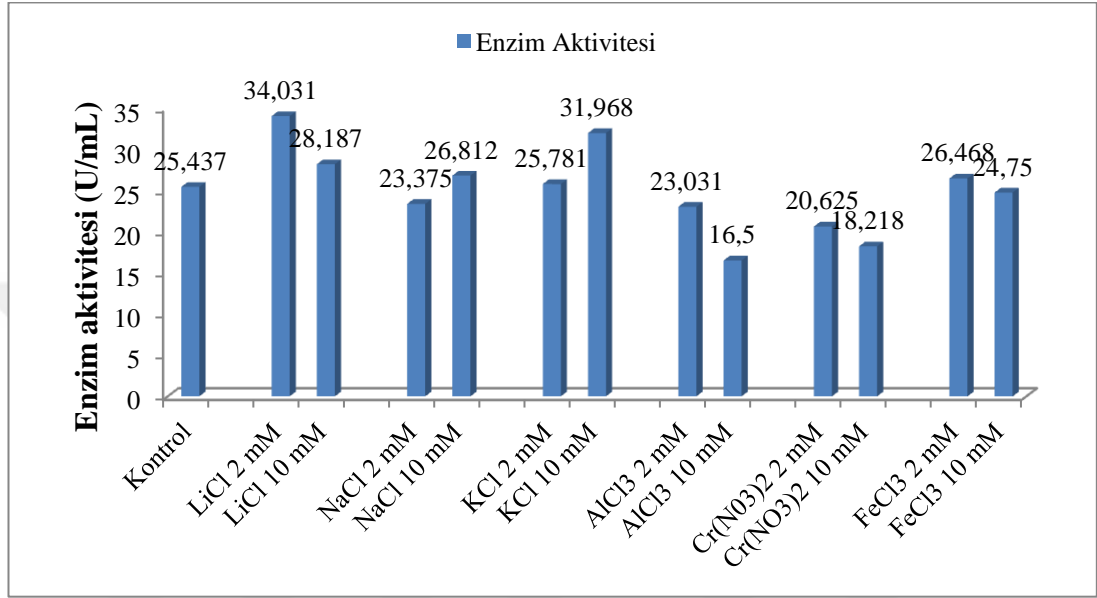


Şekil 3.55. Enzimin optimum çalışma pH'sının saptanması

İzole edilen ORSK-4 (*Bacillus cereus*)'ten elde edilen proteaz enziminin pH 9.0'da en yüksek aktivite gösterdiği ancak pH 10.0'da ve sonrasında aktivitesinin azaldığı gözlemlenmiştir.

3.6.9.3. Enzim Aktivitesine Metal İyonları, Sürfektanlar, İnhibitörler, Deterjan, Organik Çözücüler, Oksidan ve Farklı Substratların Etkisi

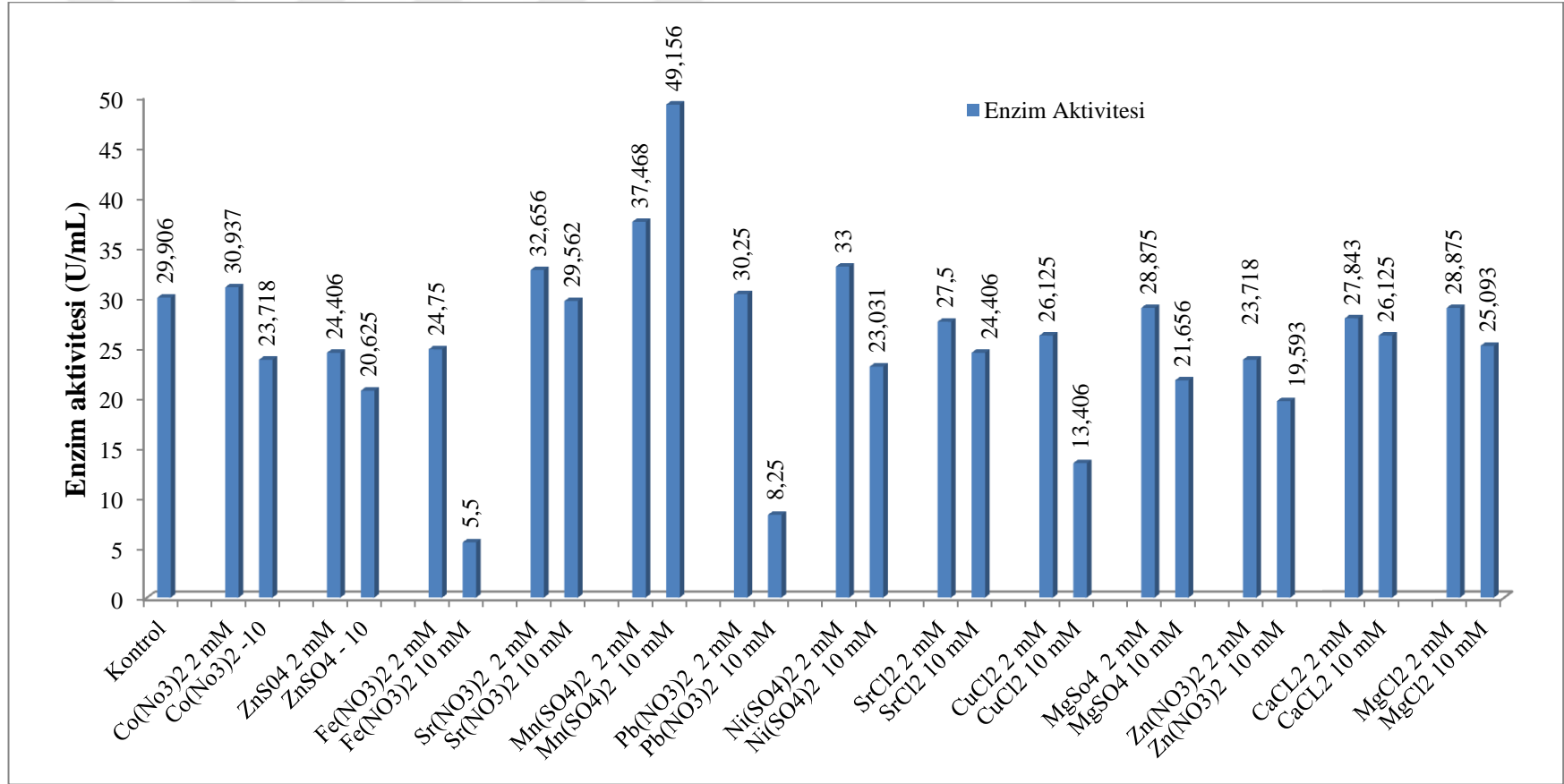
+1 ve +3 değerlikli metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi Şekil 3.56'da verilmiştir.



Şekil 3.56. +1 ve +3 değerlikli metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi

Enzim Aktivitesini, LiCl'nin 2 mM konsantrasyonu 10 mM'dn daha fazla arttırmıştır. 10 mM KCl enzim aktivitesini arttırırken AlCl₃ ve Cr(NO₃)₂ iyonları enzimi inhibe etmiştir.

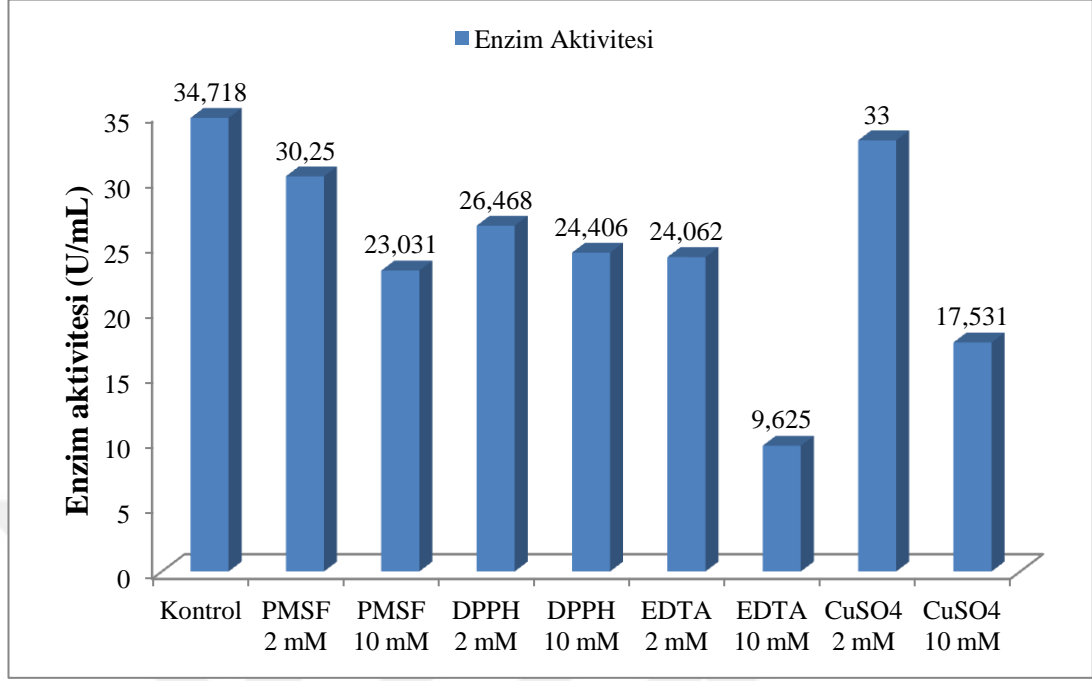
+2 değerlikli metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi Şekil 3.57'de verilmiştir.



Şekil 3.57. +2 değerlikli metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi

MnSO₄ enzim aktivitesini iki kat arttırırken, Fe(NO₃)₂ CuCl₂ ve Pb(NO₃)₂'nin 10 mM konsantrasyonları enzimi inhibe etmiştir.

İnhibitörlerin enzim aktivitesine etkisi Şekil 3.58’da verilmiştir.

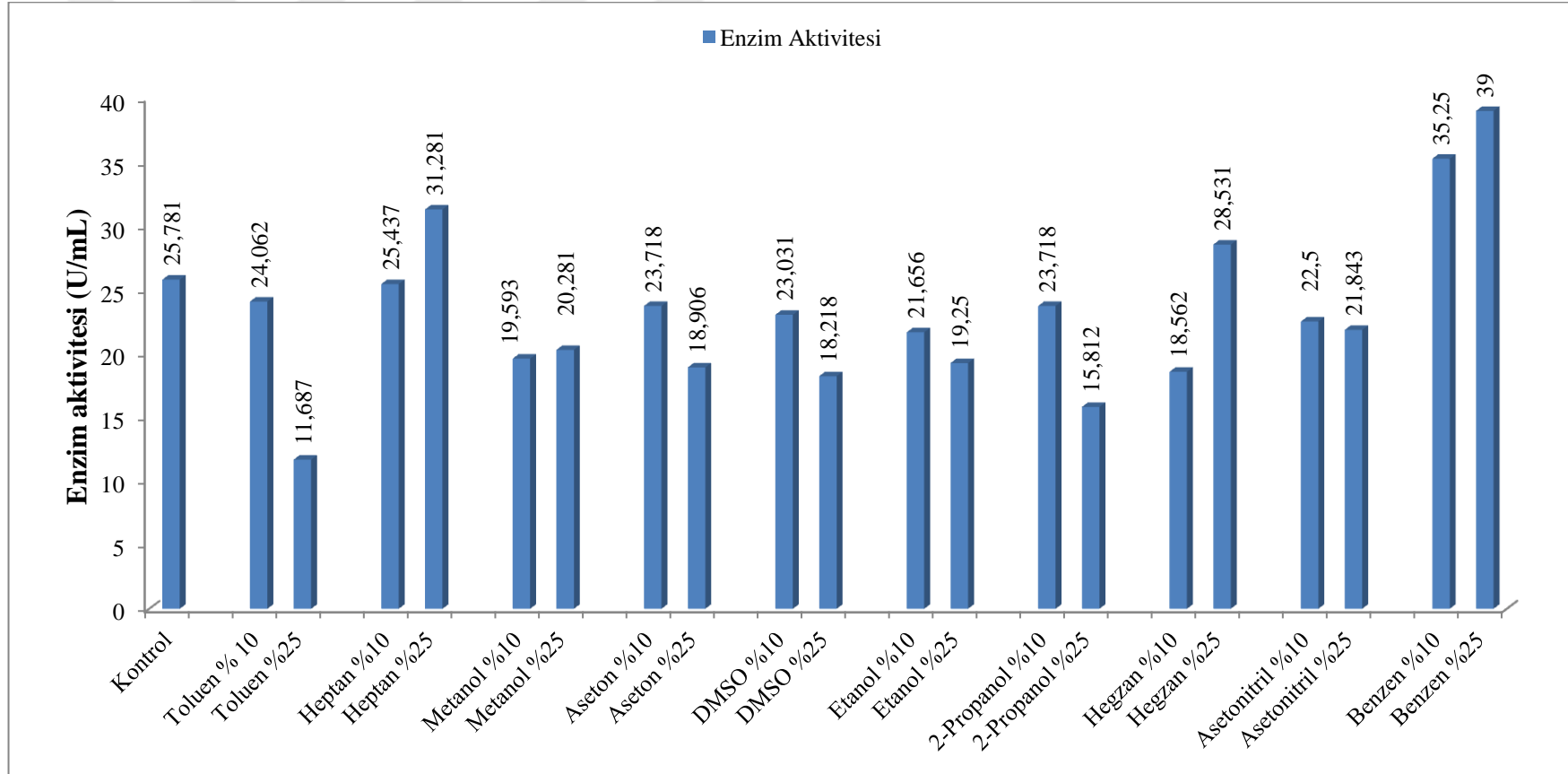


Şekil 3.58. İnhibitörlerin enzim aktivitesine etkisi

İnhibitör	İnhibisyon Yüzdesi
PMSF 2 mM	12,87 %
PMSF 10 mM	33,66 %
DPPH 2 Mm	23,76 %
DPPH 10 mM	29,52 %
EDTA 2 mM	42,21 %
EDTA 10 mM	72,28 %
CuSO ₄ 2 mM	4,95 %
CuSO ₄ 10 mM	49,50 %

Enzimin EDTA varlığında % 72.28 e varan aktivite kaybı elde edilen proteazın Metalloproteaz olduğunu göstermektedir. Ancak PMSF varlığında da % 33’lük inhibisyon oranı serin proteaz varlığında göstermektedir. ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatu hücre dışına büyük oranda metalloproteaz salgılamaken bunun yanında serin proteazda sentezlemektedir.

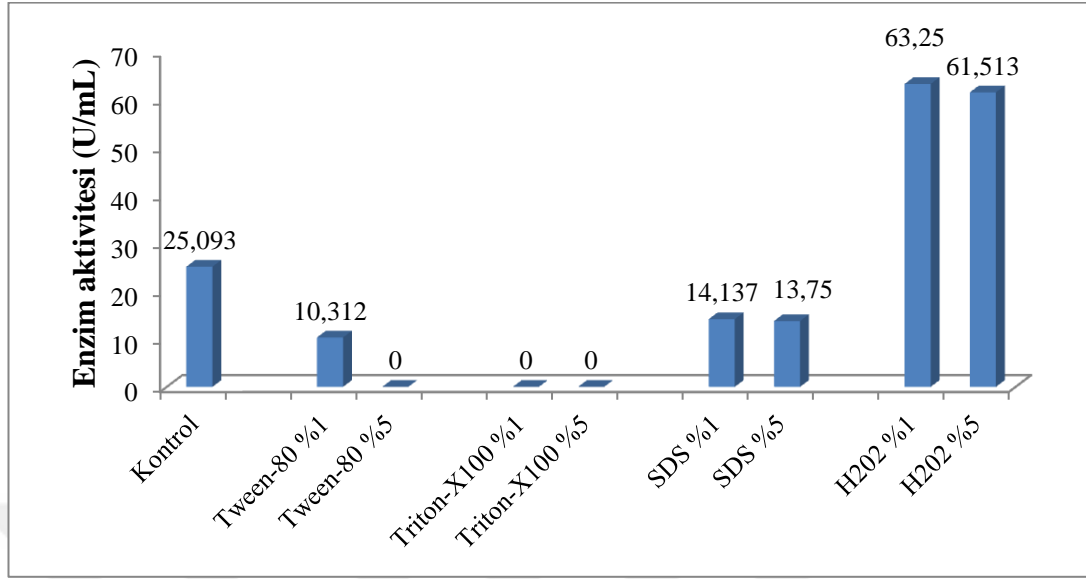
Organik çözücülerin enzim aktivitesine etkisi Şekil 3.59’da verilmiştir.



Şekil 3.59. Organik çözücülerin enzim aktivitesine etkisi

Heptan, hegzan ve benzen proteaz enziminin aktivitesini artırırken diğer çözücüler proteaz enziminin aktivitesini azaltmıştır.

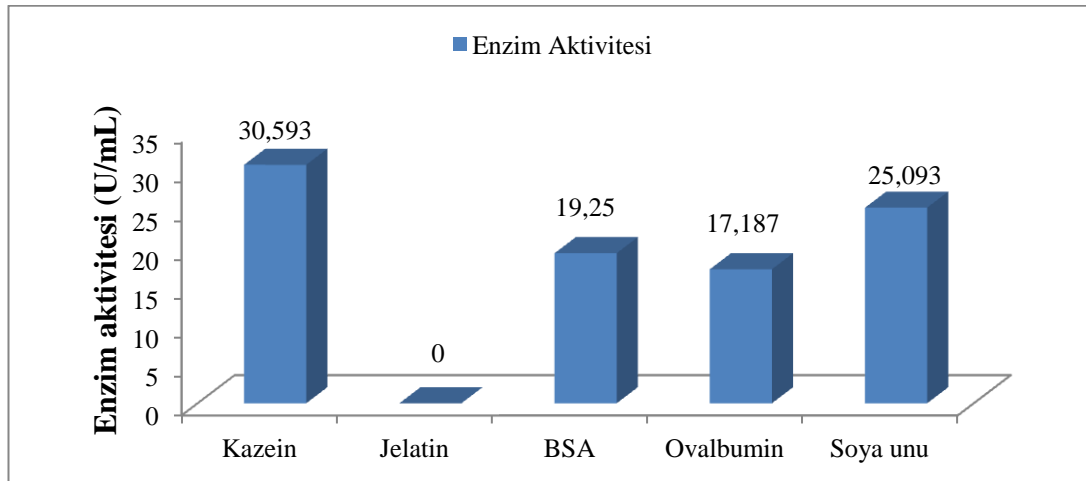
Sürfektan, deterjan ve oksidanların enzim aktivitesine etkisi Şekil 3.60’da verilmiştir.



Şekil 3.60. Sürfektan, deterjan ve oksidanların enzim aktivitesine etkisi

Hidrojen peroksit proteaz enzim aktivitesini % 250 artırırken Triton-X100 proteaz enzimini % 100 oranında inhibe etmiştir.

Farklı substratların enzim aktivitesine etkisi Şekil 3.61’de verilmiştir.



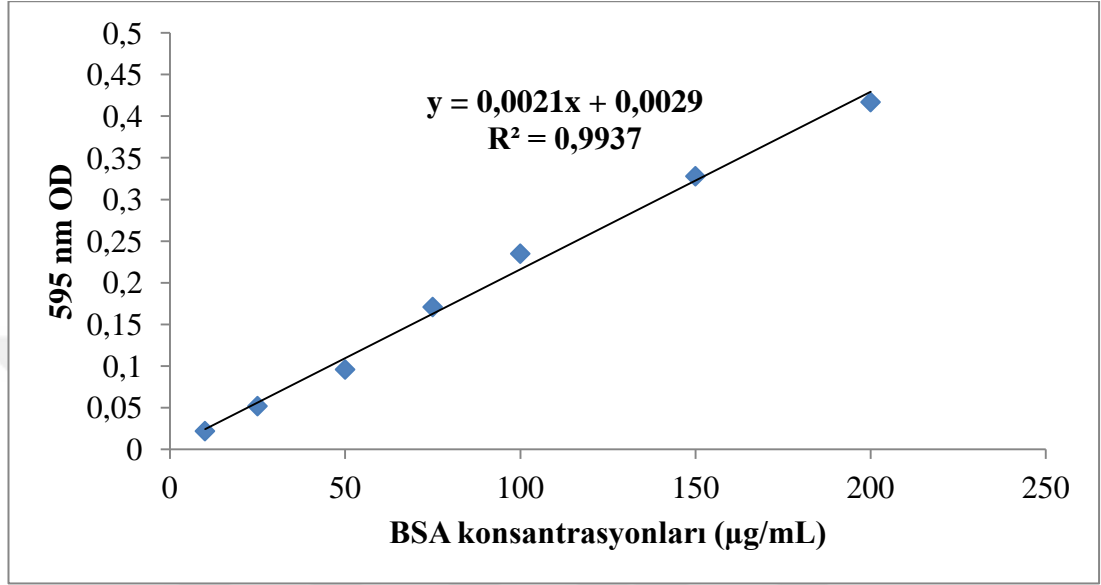
Şekil 3.61. Farklı substratların enzim aktivitesine etkisi

En yüksek proteaz enzim aktivitesi kazeinin substrat olduğu tamponda gözlenirken, jelatinin olduğu tamponda hiç proteaz aktivitesi gözlenmemiştir.

3.6.10. Bradford Yöntemi İle Protein Miktarlarının Hesaplanması

3.6.10.1 Bradford Standart Grafiği

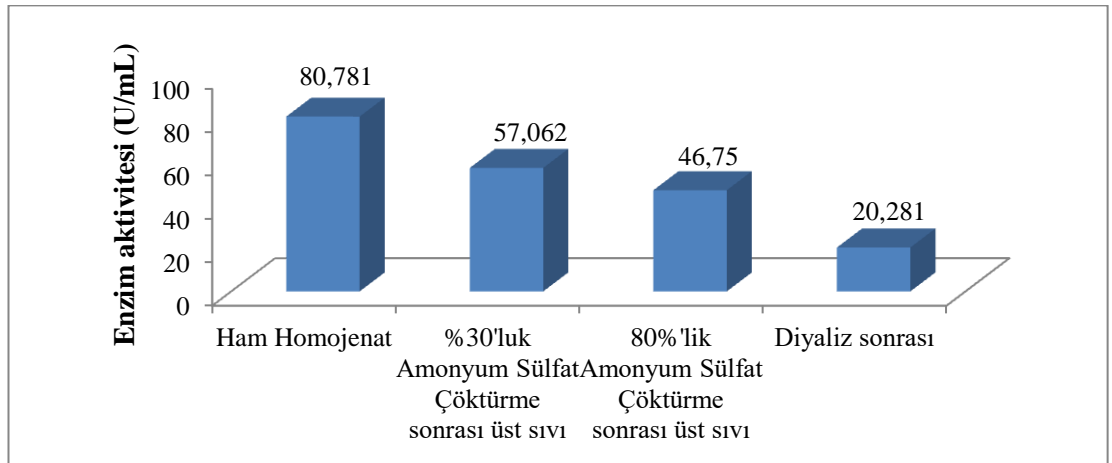
Bradford standart grafiği Şekil 3.62’de verilmiştir.



Şekil 3.62. Bradford standart grafiği

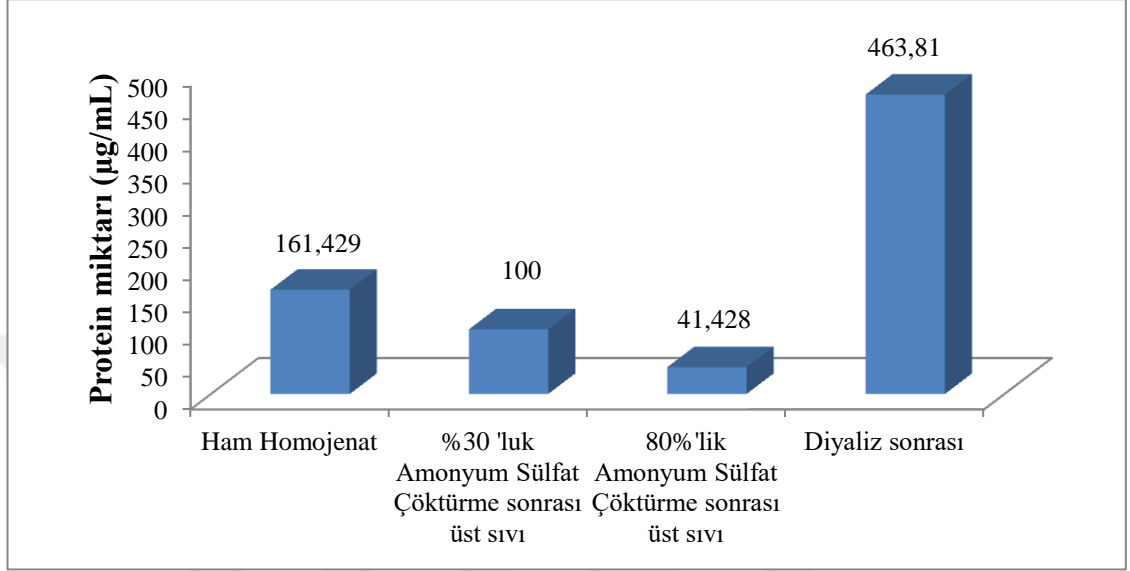
3.6.11. ORSK-4 (*Bacillus cereus*)’ten Elde Edilen Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması ve Protein Miktarları

Amonyum sülfat çöktürme öncesi ve sonrası; enzim aktiviteleri ile protein miktarları Şekil 3.63 ve Şekil 3.64’te DEAE iyon değıştirici kromatografi sonrası enzim aktivitesi ve protein miktarları Şekil 3.65’da ve Çizelge3.15’da verilmiştir.



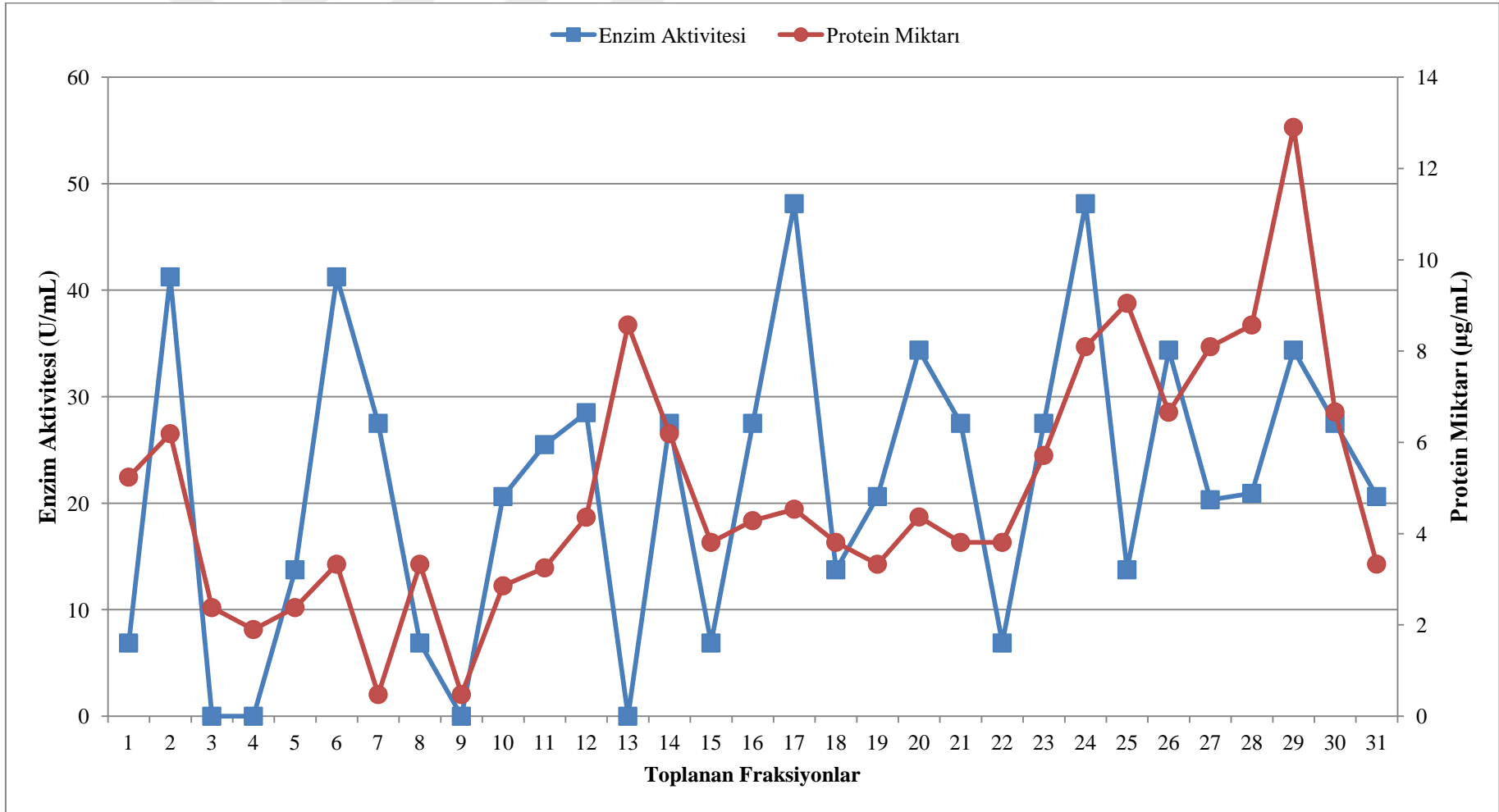
Şekil 3.63. Amonyum sülfat çöktürme öncesi ve sonrası enzim aktiviteleri

Başlangıçta 80,781(U/mL) olan enzim aktivitesi % 80'lik amonyum sülfat çöktürme sonrası üst sıvıda 46,75 (U/mL)'ye düşmüştür. Amonyum sülfat çöktürmesi ile % 42,13 oranında proteaz enzimi çöktürülmüştür. Diyaliz sonrası ise enzim aktivitesi uzaklaşan iyonlar nedeniyle 20,281 (U/mL)'ye düşmüştür.



Şekil 3.64. Amonyum sülfat çöktürme öncesi ve sonrası protein miktarları

Başlangıçta 161,429 µg/mL olan protein miktarı % 80'lik amonyum sülfat çöktürme sonrası üst sıvıda 41,428 µg/mL'ye düşmüştür. Proteinlerin amonyum sülfat çöktürme sonrası diyalizindeki protein miktarı ise 463,81 µg/mL olarak ölçülmüştür.



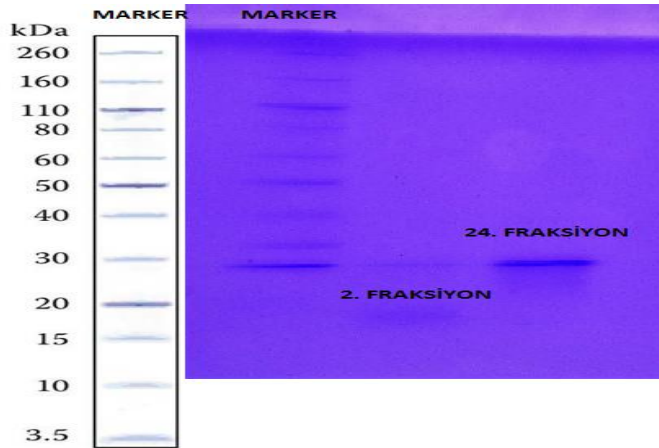
Şekil 3.65. DEAE İyon değıştirici kromatografi sonrası enzim aktivitesi ve protein miktarları

Çizelge 3.15. DEAE İyon değiştirici kromatografi sonrası enzim aktivitesi ve protein miktarları ile spesifik aktivite değerleri

Fraksiyonlar	2	6	17	24
Enzim				
Aktivitesi (U/mL)	41,25	41,25	48,125	48,125
Protein				
Miktarı (µg/mL)	6,19	3,33	4,536	8,095
Spesifik				
Aktivite (U/mg)	6.664	12.388	10.610	5.946

3.6.12. SDS PAGE ile Proteaz Enziminin Moleküler Büyüklüğünün Belirlenmesi

Kromatografi sonrası 2. ve 24. fraksiyonlara SDS PAGE yapılmıştır. 2. fraksiyonda ve 24. fraksiyonda birer bant gözlenmiştir. 2. fraksiyondaki proteazın moleküler ağırlığı 20 kDa olduğu saptanmıştır. 24. fraksiyondaki proteazın ise moleküler ağırlığı 30 kDa olarak bulunmuştur. SDS PAGE yürütme görüntüsü Şekil 3.66'da verilmiştir.



Şekil 3.66. DEAE İyon değiştirici kromatografi sonrası SDS-PAGE yürütme görüntüsü

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmamızda proteince zengin olan bir bölgeden alınan toprak örneğindeki proteaz üreticisi mikroorganizmalar saflaştırılarak bu mikroorganizmaların; en uygun üreme şartları ve en uygun proteaz enzimi üretim şartları belirlenmiş, üretilen proteaz enzimi üzerine bir takım çalışmalar yapılmıştır.

İzolatlar skimlikli besiyerinde oluşturdukları zon büyüklüklerine göre ve koloni morfolojisi farklılıklarına göre 6 izolat elde edilmiştir.

Agasthya ve ark (2013) topraktan zon büyüklüğüne göre izole ettiği proteaz üreticisi mikroorganizmaları 16S rRNA analizi ile *B. thuringiensis* olarak tanımlamıştır [126]. Nadeem ve ark. (2007) çürümekte olan toprak örneğinden izole edilen 80 bakterinin 32 tanesini *Bacillus* sp. olarak tanımlamışlardır [127]. Jeroen ve ark. (2004) aldıkları toprak örneğinden 42 farklı türde *Bacillus* türü izole etmişlerdir [128]. Aslim ve ark. (2002) yaptığı çalışmada 40 izolatın 27 tanesi *Bacillus* sp. olarak tanımlamıştır [129]. İzole edilen 6 mikroorganizmanın en uygun üreme şartları 600 nm ölçülerek; ORSK-2 (*Bacillus mojavensis*) izolatının en uygun üreme şartları 27 °C pH 7.0'de 0,638 olarak bulunmuştur. ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatının en uygun üreme şartları 37 °C pH 7.0'de 0,368 OD olarak bulunmuştur. ORSK-5 (*Bacillus licheniformis*) izolatının en uygun üreme ortamı 50 °C pH 7.0'de 0,35 OD olarak bulunmuştur. ORSK-7 (*Aeromonas salmanicida*) izolatının en uygun üreme ortamı 37 °C pH 5.0'de 0,378 OD olarak bulunmuştur. ORSK-9 (*Bacillus thuringiensis*) izolatının en uygun üreme ortamı 37 °C pH 12.0'de 0,374 OD olarak bulunmuştur. ORSK-11 (*Bacillus toyonensis*) izolatının en uygun üreme ortamı 37 °C pH 5.0'de 0,272 OD olarak bulunmuştur.

İzole edilen mikroorganizmaları fiziksel olarak tanımlamak amacıyla bazı biyokimyasal testler yapılmıştır. Bu biyokimyasal test sonuçlarına göre izole edilen 5 mikroorganizma Gram pozitif ve sporlu yapıdayken 1 mikroorganizma Gram negatif özelliktedir. Tüm mikroorganizmaların Voges Proskauer testi pozitifken 5 izolatın; jelatin hidroliz testi, katalaz testi ve sitrat testi pozitifken 1 izolatın negatiftir. 5

izolatın indol testi negatifken 5 izolat indol pozitifdir. 3 izolat nişastayı metabolize edebilirken 3 tanesi nişasta hidrolizi yapamamaktadır. 4 izolatın indol testleri pozitifken 4 izolat indol negatifdir.

Uyar ve ark (2011) yaptığı çalışmada 16S rRNA analizi ile *Bacillus cereus* grubuna ait olduğu belirlenen mikroorganizmanın gram pozitif, çubuk şeklinde, aerobik, katalaz pozitif ve spor oluşumunun gözlemlendiğini belirtmiştir [130]. Mody ve ark. (2010) yapmış olduğu çalışmada topraktan izole edilen proteaz üreticisi mikroorganizmanın Gram pozitif; kazein, jelatin, nişasta, lipaz ve katalaz hidroliz testlerinin pozitif olduğunu bildirmiştir [131]. Nadeem ve ark. (2007) *Bacillus subtilis* izolatının biyokimyasal testlerini; kazein, jelatin, katalaz hidrolizlerini pozitif, indol testini negatif ve Voges Proskauer testini pozitif olarak bulmuştur [127].

İzolatların üreme eğrileri incelendiğinde ORSK-2 (*Bacillus mojavensis*), ve ORSK-7 (*Aeromonas salmanicida*) izolatları 48. saatte logaritmik üreme fazını tamamlarken, ORSK-4 (*Bacillus cereus*), ORSK-9 (*Bacillus thuringiensis*) ve ORSK-11 (*Bacillus toyonensis*) izolatları logaritmik üreme fazını 24. saatte tamamlamıştır. ORSK-5 (*Bacillus licheniformis*) izolatu ise logaritmik üreme fazını 10. saatte tamamlamıştır. 27F ve 1492 R primerleri kullanılarak PZR ile çoğaltılan 16S rRNA geninin yaklaşık 1500 baz çiftlik bir gen bölgesi olduğu jel elektroforezinde gösterilmiştir. Chen ve ark. (2012) ve Peter ve ark.(2001) yaptığı çalışmalarda bu primerler kullanılarak çoğaltılan gen bölgesinin yaklaşık 1500 baz çifti içerdiğini göstermişlerdir [132, 133].

İzolatların 16S rRNA gen analizlerinde 5 mikroorganizma *Bacillus* cinsine aitken 1 mikroorganizma *Aeromonas* cinsine aittir.

Wang ve ark yaptığı çalışmada mikroorganizmaların sınıflandırılması için 16S rRNA dizisinin karşılaştırılmasını en güçlü araçlardan olarak tanımlanmıştır [134]. Wattiau ve ark. (2001), *B. cereus*, Hansen ve ark (2001) *B. thuringiensis* ve Djordjevic ve ark. (2000) *Bacillus alvei* gibi *Bacillus* türlerinin tanımlanması için diziye özel primerler tasarlamıştır [135-137]. Heyndrickx ve ark. (1996) ve Nakamura ve

Swezey (1983) *Bacillus* türleri arasında yüksek bir heterojenite olduğunu bildirmişlerdir [138, 139]. Heyndrickx ve ark. (1996) tür ayrımı için ARDRA metodunu geliştirmiştir [138].

Bu tez çalışmasında izolatların ARDRA analizlerinde *B.cereus* ATCC 10876, *B.subtilis* ATCC 6633, ORSK-4 (*Bacillus cereus*), ORSK-9 (*Bacillus thuringiensis*) ve ORSK-11 (*Bacillus toyonensis*) izolatlarının kesim enzimleri ile kesim profilleri birbiri ile aynı çıkmıştır. Ancak ORSK-2 (*Bacillus mojavensis*) ve ORSK-5 (*Bacillus licheniformis*) izolatlarının bant profilleri hem birbirinden hemde diğer izolatlardan farklıdır. Bu farklılık bize sekans sonucunun doğruluğunu da göstermektedir.

16S rRNA genine dayalı bir moleküler teknik olan ARDRA'yı, De Baere ve ark. (2002) *Mycobacterium*'daki türlerin ayıtımı için, Logan ve ark. (2002) *Brevibacillus* türlerinin ayrımı için, Gurtler ve ark. (1991) *Clostridium*'daki türlerin ayrımı için cins filogenetik ve taksonomik çalışmalarda kullanmıştır [140-142]. Daha önce, evrensel primerleri kullanan Vaerewijck ve ark. (2001) ARDRA'nın *B. pumilus* ve *B. subtilis*'i *B. licheniformis*'ten ayıramadığı bildirilmiştir [143]. Ancak, bu çalışmada *B. licheniformis* *B.subtilisten* ARDRA ile ayrılabilmiştir. Wu ve ark (2006) yaptığı çalışmada *B. cereus*, *B. thuringiensis* ve *B. anthracis* , 'in Alu I ve Taq I enzimleriyle kesildiğinde bir ayırım gözlenmediğini rapor etmişlerdir. *B. cereus* ve *B. thuringiensis*, 16S rRNA dizisi temelinde ayırt edilemez ve bu nedenle de ARDRA tahlili ile de ayırt edilemezler [144]. Ash ve ark (1991) *B. cereus*, *B. thuringiensis* ve *B. anthracis* grubunun bir üyesi olan *B. mycoides* ve *B. cereus*'la da 6-8 baz farklılığı olduğu ve ARDRA ile ayırlamayacağını bildirmişlerdir [145]. Çalışmamızda *B.cereus* ATCC 10876 ile *B.thuringiensis* izolatımız birbirinden ayırlamamıştır. ORSK-5 izolatının (*B. licheniformis*) Hae III, Alu I ve Taq I restriksiyon enzimleriyle kesim profilinin Cihan ve ark. (2012) *B.licheniformis* grubunu Hae III, Alu I ve Taq I restriksiyon enzimleriyle kesim profilleri benzer sonuçlar göstermektedir [146].

Çalışmamızda, ORSK-2 (*Bacillus mojavensis*) izolatının optimum enzim üretim şartları, enzim besiyerinde, 37 °C, pH 7.0 ve 2 günlük inkübasyon süresinde 53,964 U/mL olarak bulunmuştur. ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatının optimum enzim üretim şartları, enzim besiyerinde, 27 °C, pH 7.0 ve 3 günlük inkübasyon süresinde 60,5 U/mL olarak bulunmuştur. ORSK-5 (*Bacillus licheniformis*) izolatının optimum enzim üretim şartları, enzim besiyerinde 50 °C, pH 9.0 ve 1 günlük inkübasyonda 49,5 U/mL olarak bulunmuştur. ORSK-7 (*Aeromonas salmonicida*) izolatının optimum enzim üretim şartları, enzim besiyerinde 27 °C, pH 9.0 ve 3 günlük inkübasyonda 82,156 U/mL olarak bulunmuştur. ORSK-9 (*Bacillus thuringiensis*) izolatının optimum enzim üretim şartları, enzim besiyerinde 27 °C, pH 9.0 ve 3 günlük inkübasyonda 51,562 U/mL olarak bulunmuştur. ORSK-11 (*Bacillus toyonensis*) izolatının optimum enzim üretim şartları, enzim besiyerinde 27 °C, pH 9.0 ve 2 günlük inkübasyonda 52,25 U/mL olarak bulunmuştur.

Beg ve ark. (2003), Mabrouk ve ark (1999), ve Chu ve ark.(1992) yaptığı çalışmalarda enzim üretimi optimum 24 saatle 120 saat arasında bulmuşlardır. [79, 147, 148] Deviram ve ark. (2015) yaptığı çalışmada en yüksek enzim aktivitesini 36. saatte elde etmişlerdir [149]. Nilegaonkar ve ark. (2007) *B. cereus* ile yaptığı çalışmada en yüksek enzim aktivitesini 35. saatte elde etmiştir [150].

Çalışmamızda, 6 izolat arasından en yüksek proteaz enzim aktivitesini ORSK-7 izolatı göstermiştir. Ancak ORSK-7 izolatının moleküler tanımlanma sonucu *Aeromonas salmonicida* çıkmıştır. *Aeromonas salmonicida* patojen bir suş olduğu için endüstride kullanımı uygun değildir. Bundan dolayı sonraki işlemlere en yüksek 2. enzim aktivitesine sahip ORSK-4 izolatı (*Bacillus cereus*) üzerinden devam edilmiştir.

Organik bileşiklerin değiştirilmesi sonucu ORSK-4 (*Bacillus cereus*) proteaz enzim aktivitesini en çok yükselten bileşik kontrole göre 5 kat arttırılmış pepton miktarıdır. Ortamda kazein olmaması da aktiviteyi en fazla düşüren etmendir.

Rose (1980) yaptığı çalışmada en yüksek proteaz aktivitesinin litrede 100-150 gram kompleks organik bileşik olduğunda en yüksek olacağını bildirmiştir [58].

İnorganik bileşiklerin değiştirilmesi sonucu ORSK-4 (*Bacillus cereus*) proteaz enzim aktivitesini en çok yükselten bileşik kontrole göre 5 kat arttırılmış K_2HPO_4 miktarıdır. Ortamda $CaCl_2$ olmaması da aktiviteyi en fazla düşüren etmendir.

Tsuchiya ve ark. (1991) yaptığı çalışmada, alkalın proteaz üretimi için yüksek konsantrasyonda sodyum iyonları gerekli olduğunu bildirmişlerdir [73]. Birçok çalışmada K_2HPO_4 fosfat kaynağı olarak ve ortamın tamponlanmasından sorumlu olduğu gösterilmiştir [59]. Moon ve ark. (1991) yaptığı çalışmada, litrede 2 g K_2HPO_4 miktarını proteaz üretimi için en uygun olarak bulmuştur. Bununla birlikte, bu konsantrasyonu aşan miktarlar, proteaz üretiminde bir inhibisyon göstermiştir[57].

Bu çalışmada tek azot kaynağı içeren besiyerinde ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatının en yüksek proteaz enzim aktivitesi kazein (12 g/L) ve et özütü (12 g/L) içeren besiyerlerinde saptanmıştır. Ortamda sadece üre olduğunda ise proteaz aktivitesi yok denilecek kadar azdır.

Yapılan çeşitli çalışmalarda soya ununun proteaz üretimi için uygun bir azot kaynağı olduğu bildirilmiştir [67, 84, 151]. Deming ve ark. (1986) yaptığı çalışmada soya fasulyesi yerine soya fasulyesinin bir asit hidrolizatı kullanıldığında toplam enzim aktivitesinde üç kat artış gözlemiştir [152]. Ayrıca tripton (% 2) ve kazeinin (% 1-2) de mükemmel azot kaynakları olarak kullanılabilceği bildirilmiştir [70, 74]. Nilegaonkar ve ark. (2007) *B. cereus* ile yaptığı çalışmada en yüksek enzim aktivitesini soya ununda elde ederken en düşük enzim aktivitesini kezeinde elde etmiştir [150].

Çalışmamızda besiyeri içersine glukoz ve fruktoz eklenmesi ORSK-4 (*Bacillus cereus*) proteaz enzim aktivitesini belirgin şekilde düşürürken, besiyerine nişasta, laktoz, sukroz ve galaktoz eklenmesi enzim aktivitesini arttırdığı saptanmıştır.

Deviram ve ark. (2015) *B. subtilis* ile yaptığı çalışmada en yüksek enzim aktivitesini selüloz ve galaktoz içeren ortamda, en düşük enzim aktivitesini ise sukroz ve nişasta içeren ortamda bulmuşlardır [149]. Ghorbel ve ark. (2005) *B. pumilus* ile yaptığı çalışmada tek karbon kaynağı olarak maltoz kullanıldığında en yüksek enzim

aktivitesini elde ederken, glukoz kullanıldığında en düşük enzim aktivitesini elde etmiştir [153]. Cheng ve ark. (1995) *Bacillus licheniformis* PWD-1 ile yaptığı çalışmada, glukoz ve malt özütünün enzim aktivitesini çok fazla düşürdüğünü, galaktozun ise enzim aktivitesini arttırdığını bildirmiştir [151].

Çalışmamızda farklı inorganik azot kaynaklarından amonyum asetatın ve sodyum nitratın 0.1 g/L oranında enzim besiyerine eklenmesi ORSK-4 (*Bacillus cereus*) proteaz enzim aktivitesini en fazla arttırırken; amonyum sülfatın 0.1 g/L ve kalsiyum nitratın 1 g/L oranlarında eklenmesi proteaz aktivitesini azda olsa azaltmıştır.

Deviram ve ark. (2015) *B. subtilis* yaptığı çalışmada amonyum sülfatın aktiviteyi pepton kadar arttırdığını rapor etmiştir [149]. Nehete ve ark (1986) yaptığı çalışmada amonyum tuzlarının aktiviteyi düşürmediği belirlenmiştir [154]. Sinha ve Satyanarayana (1991) tarafından yapılan çalışmada amonyum sülfat ve potasyum nitrat ilavesi ile proteaz üretiminde bir artış gözlenmiştir [155]. Banerjee ve ark. (1992) yapmış olduğu çalışmada % 0,25 sodyum nitratın içeren besiyeri ortamında proteaz üretiminde artışa neden olduğu saptanmıştır [156]. Phadatare ve ark. (1993) yaptığı çalışmada sodyum nitratın yerine ortamda amonyum nitrat kullanılması, enzim üretimini daha da arttırmıştır [74]. Nilegaonkar ve ark. (2007) *B. cereus* ile yaptığı çalışmada en yüksek enzim aktivitesini sodyum nitrat kullanıldığında elde ederken en düşük enzim aktivitesini amonyum fosfat kullanılmasıyla elde edildiğini bildirmiştir [150].

Çalışmamızda ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatının optimize edilmiş modifiye besiyerinde elde edilen proteaz enzim aktivitesi normal enzim besiyerinde elde edilen proteaz enzim aktivitesine göre yaklaşık 3 kat daha yüksek olarak ölçülmüştür. Et-Kazein besiyerinde ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatının proteaz enzim aktivitesi normal besiyerine göre yaklaşık 2 kat daha yüksek ölçülmüştür.

Çalışmamızda izolatlar arasında rekabet ortamının yaratılması her iki rekabet şartında da proteaz enzim aktivitesini düşürmektedir.

En yüksek proteaz aktivitesi ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatında aşılama (inokulum) miktarının % 1 oranında olduğu şartlarda en yüksek bulunmuştur.

Genckal ve ark. (2006) yaptığı çalışmada proteaz üretimi için en uygun aşılama oranını % 5 olarak belirtmişlerdir [157]. Kanekar ve ark (2002) *Bacilluslar* için en uygun proteaz üretim şartını % 2 ile % 5 olarak belirtmişlerdir [158].

ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatının enzim aktivitesi karşılaştırılan ATCC suşlarına göre daha yüksek aktivite göstermektedir.

ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatından elde edilen proteaz enziminin 27 °C ile 60 °C arasında benzer aktivite gösterdiği ancak 70 ve 80 °C'de enzim aktivitesinin azaldığı gözlemlenmiştir.

Deviram ve ark. (2015) *B. subtilis* ile yaptığı çalışmada en yüksek enzim aktivitesini 40 ve 50 °C elde ederken 50 °C'den 100 °C doğru enzim aktivitesinin kademeli olarak azalttığını bulmuşlardır [149]. Nilegaonkar ve ark. (2007) *B. cereus* ile yaptığı çalışmada optimum enzim aktivitesini 40 ila 60 °C olduğunu ve enzimin 80 °C tamamen inhibe olduğunu bildirmiştir [150]. Almas ve ark. (2009) *Bacillus spp.* ile yaptığı çalışmada elde edilen proteaz enziminin en uygun 60 °C'de aktivite gösterdiğini bildirmiştir [159]. Doddapaneni ve ark. (2009) *B. cereus* ile yaptığı çalışmada saflaştırılan proteaz enziminin en uygun çalışma sıcaklığını 60 olduğunu bildirmiştir [160].

ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatından elde edilen proteaz enziminin pH 9.0'da en yüksek aktivite gösterdiği ancak pH 10.0'da ve sonrasında aktivitesinin azaldığı gözlemlenmiştir.

Cowan ve ark. (1996) izole ettikleri proteaz enziminin optimum çalışma pH'sını 6 ile 9 arasında bulmuşlardır [161]. Uyar ve ark. (2011) yaptığı çalışmada optimum çalışma pH değerini 8 olarak bulmuşlardır [130]. Deviram ve ark. (2015) *B. subtilis* yaptığı çalışmada en yük senzim aktivitesini pH 7.4'te olduğunu bildirmişlerdir [149]. Nilegaonkar ve ark. (2007) *B. cereus* ile yaptığı çalışmada optimum enzim aktivitesini pH 8.0 ve 9.0 arasında olduğunu bildirmiştir [150]. Almas ve ark. (2009) *Bacillus spp.* ile yaptığı çalışmada elde edilen proteaz enziminin en uygun pH 9.0'da

aktivite gösterdiğini bildirmiştir [159]. Doddapaneni ve ark. (2009) *B. cereus* ile yaptığı çalışmada saflaştırılan proteaz enziminin en uygun çalışma pH'sını 10.0 olarak göstermiştir [160]. Nadeem ve ark. (2007) yaptığı çalışmada elde edilen proteaz enziminin maksimum pH 11.0'de aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir [127]. Çalışmamızda ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatından elde edilen proteaz enziminin aktivitesini, LiCl'nin 2 mM konsantrasyonun 10 mM' göre daha fazla arttırdığı saptanmıştır. 10 mM KCl enzim aktivitesini artırırken AlCl₃ ve Cr(NO₃)₂ iyonları enzimi inhibe etmiştir. MnSO₄ enzim aktivitesini yaklaşık iki kat artırırken, Fe(NO₃)₂ CuCl₂ ve Pb(NO₃)₂'nin 10 mM konsantrasyonları enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir. Nilegaonkar ve ark. (2007) *B. cereus* ile yaptığı çalışmada enzim aktivitesini en çok arttıran etmenin CaCO₃, en az arttıran etmenin ise MnSO₄ olduğunu bildirmiştir [150]. Deng ve ark. (2010) yaptığı *Bacillus* spp. ile yaptığı çalışmada Ca²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Fe³⁺'ün enzim aktivitesini artırırken Fe²⁺, Cu²⁺'nin enzim aktivitesini azalttığını bildirmiştir [162].

ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatından elde edilen proteaz enziminin EDTA varlığında % 72.28 oranında inhibe olduğu gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuç, proteazın metalloproteaz olduğunu göstermektedir. Ancak PMSF varlığında da % 33'lük inhibisyon oranı serin proteaz varlığını da göstermektedir. ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatı hücre dışına büyük oranda metalloproteaz salgılamakta bunun yanında serin proteazda sentezlemektedir.

Nilegaonkar ve ark. (2007) *B. cereus* ile yaptığı çalışmada enzim aktivitesinin 5 mM EDTA ve HgCl₂ ile tamamen inhibe olduğunu bildirmiştir [150]. Nadeem ve ark. (2007) yaptığı çalışmada elde edilen proteaz enzimi PMSF ile tamamen inhibe olmuştur [127]. Joo ve ark. (2003) *B. clausii* ile yaptığı çalışmada elde edilen proteaz enziminin PMSF ile % 98 oranında inhibe olurken, EDTA enzim aktivitesini % 2 oranında arttırmıştır [163].

ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatından elde edilen proteaz enziminde heptan, hegzan ve benzen proteaz enzim aktivitesini artırırken diğer çözücüler enzim aktivitesini azaltmıştır.

Mody ve ark. (2010) yaptığı çalışmada, topraktan izole edilen proteaz üreticisi mikroorganizmanın enzim aktivitesini en çok toluen arttırken, enzim aktivitesini en çok butanol azalttığını bulmuşlardır [131].

ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatından elde edilen proteaz enziminin aktivitesini hidrojen peroksit % 250 arttırırken Triton-X100 enzimi % 100 oranında inhibe etmiştir.

Nilegaonkar ve ark. (2007) *B. cereus* ile yaptığı çalışmada % 5 hidrojen peroksitin enzim aktivitesini en çok arttıran oran olarak belirlemiştir [150]. Mody ve ark. (2010) yapmış olduğu çalışmada, topraktan izole edilen proteaz üreticisi mikroorganizmanın enzim aktivitesini Triton X-100 azaltırken, Tween 80 arttırdığını bildirmişlerdir [131]. Joo ve ark. (2003) yaptığı çalışmada *B. clausii* I-52'den izole edilen alkalın proteazın, % 5 SDS ile muamele edildiğinde yaklaşık % 72 aktivitesini muhafaza ederken, Kumar (2002) yaptığı çalışmada *B. pumilus* alkalın proteazının, % 0.1 SDS ile 1 saat boyunca muamele edildiğinde % 22 oranında aktivitesini kaybettiğini saptamıştır [163, 164]. Nilegaonkar ve ark. (2007) *B. cereus* ile yaptığı çalışmada % 1 SDS'in enzim aktivitesini neredeyse sıfıra indirdiğini bildirmiştir [150].

ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatından elde edilen proteaz enziminin en yüksek enzim aktivitesi kazeinin substrat olduğu tamponda gözlenirken, jelatinin olduğu tamponda hiç aktivite gözlenmemiştir.

Adinarayana ve ark. (2003) *B. subtilis* ile yaptığı çalışmada substrat olarak kazein kullanılarak en yüksek enzim aktivitesi elde edilirken, substrat olarak jelatin kullanıldığında ise en düşük enzim aktivitesini elde etmiştir [165].

ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatından elde edilen proteaz enziminin başlangıçta 80,781 (U/mL) olan enzim aktivitesi % 80'lik amonyum sülfat çöktürme sonrası üst sıvıda 46,75 (U/mL)'ye düşmüştür. Amonyum sülfat çöktürmesi ile % 42,13 oranında proteaz enzimi çöktürülmüştür. Diyaliz sonrası ise enzim aktivitesi uzaklaşan iyonlar nedeniyle 20,281 (U/mL)'ye düşmüştür. Başlangıçta 161,429

$\mu\text{g/mL}$ olan protein miktarı % 80'lik amonyum sülfat çöktürme sonrası üst sıvıda 41,428 $\mu\text{g/mL}$ 'ye düşmüştür. Proteinlerin amonyum sülfat çöktürme sonrası diyalizindeki protein miktarı ise 463,81 $\mu\text{g/mL}$ olarak ölçülmüştür.

Meera ve ark (2007) yaptığı çalışmada ham kültür süzöntü 5.2 U/mg'lık bir spesifik aktiviteye sahipken, amonyum sülfatla çöktürülen fraksiyonu, 5.57 U/mg'lık bir spesifik aktivite göstermiştir [166]. Yan ve ark (2000) yaptığı çalışmada bir deterjan proteazının, 30 kDa'lık bir molekül ağırlığına ve 0.5 U / mg spesifik aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir [167].

Çalışmamızda ORSK-4 (*Bacillus cereus*) izolatından elde edilen proteaz enzimine DEAE iyon değiştirici kromatografi uygulanmış ve 31 fraksiyon toplanmıştır. Bu fraksiyonlardan en yüksek proteaz enzimi aktivitesine ile protein miktarına sahip olan 2. ve 24. fraksiyonlara SDS PAGE yapılmıştır.

SDS PAGE sonrası 2. fraksiyonda ve 24. fraksiyonda birer bant gözlenmiştir. 2. fraksiyondaki proteazın moleküler ağırlığı 20 kDa olduğu saptanmıştır. 24. fraksiyondaki proteazın ise moleküler ağırlığı 30 kDa olarak bulunmuştur.

Meera ve ark (2007) yaptığı çalışmada diyalize yapılan proteaz enzimi SDS PAGE'de 30 kDa'da tek bir bant göstermiştir [166]. Nilegaonkar ve ark. (2007) *B. cereus* ile yaptığı çalışmada non-denatüre PAGE'de 45 kDa ve 36 kDa büyüklüğünde iki proteaz göstermiştir [150]. Kim ve ark. (2001) *B. cereus* BG1'den izole edilen bir kalsiyuma bağımlı proteazın moleküler ağırlığını 34 kDa olduğu bildirilmiştir [168]. Ghorbel ve ark. (2005) *B. pumilus*'dan elde edilen proteazın yaptığı çalışmada 34 kDa olduğunu bildirmiştir [153]. Doddapaneni ve ark. (2009) *B. cereus* ile yaptığı çalışmada saflaştırılan proteaz enzimini 28 kDa olarak bulmuştur [160]. Deng ve ark. (2010) yaptığı *Bacillus* spp. ile yaptığı çalışmada proteaz enziminin moleküler büyüklüğü 28 kDa olarak bulunmuştur [162]. Cheng ve ark. (1995) *Bacillus licheniformis* PWD-1 ile yaptığı çalışmada referans olarak kullanılan proteazın moleküler büyüklüğünü 23,7 kDa, elde ettikleri proteazın moleküler büyüklüğünü ise 31,4 kDa olarak bildirmiştir [151].

KAYNAKÇA

1. Pogson, M., G. Georgiou, and B.L. Iverson, *Engineering next generation proteases*. Current Opinion in Biotechnology, 2009. **20**(4): p. 390-397.
2. Gupta, R., et al., *An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases*. Appl Microbiol Biotechnol, 2002. **60**(4): p. 381-95.
3. Banik, R.M. and M. Prakash, *Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from Bacillus cereus*. Microbiol Res, 2004. **159**(2): p. 135-40.
4. Maurer, K.H., *Detergent proteases*. Curr Opin Biotechnol, 2004. **15**(4): p. 330-4.
5. Kalisz, H.M., *Microbial proteinases*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 1988. **36**: p. 1-65.
6. Rao, M.B., et al., *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(3): p. 597-635.
7. Godfrey, T. and S. West, *Industrial enzymology*. 2nd ed. 1996, New York: Macmillan Publishers Inc.,.
8. Barrett, A.J., *Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases*, in *Methods Enzymology*. 1994.
9. Hartley, B.S., *Proteolytic enzymes*. Annu Rev Biochem, 1960. **29**: p. 45-72.
10. Argos, P., *A sensitive procedure to compare amino acid sequences*. J Mol Biol, 1987. **193**(2): p. 385-96.
11. Rawlings, N.D. and A.J. Barrett, *Evolutionary families of peptidases*. Biochem J, 1993. **290** (Pt 1): p. 205-18.
12. Menon, A.S. and A.L. Goldberg, *Protein substrates activate the ATP-dependent protease La by promoting nucleotide binding and release of bound ADP*. J Biol Chem, 1987. **262**(31): p. 14929-34.
13. Watson, R.R., *Chapter I Substrate Specificities of Aminopeptidases: A Specific Method for Microbial Differentiation*. Methods in microbiology, 1976. **9**: p. 1-14.
14. Labbe, J.P., P. Rebeyrotte, and M. Turpin, *[Demonstration of extracellular leucine aminopeptidases (EC 3.4.1) of Aspergillus oryzae (IP 410). Study of*

- the leucine aminopeptidase 2 fraction*]. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D, 1974. **278**(21): p. 2699-702.
15. Chang, P.C., et al., *Extracellular metalloprotease gene of Streptomyces cacaoi: structure, nucleotide sequence and characterization of the cloned gene product*. Gene, 1990. **88**(1): p. 87-95.
 16. Stoll, E., H.G. Weder, and H. Zuber, *Aminopeptidase II from Bacillus stearothermophilus*. Biochim Biophys Acta, 1976. **438**(1): p. 213-20.
 17. DeMarco, A.C. and A.J. Dick, *Aminopeptidase I activities in several microorganisms*. Can J Biochem, 1978. **56**(1): p. 66-71.
 18. Felix, F. and N. Brouillet, [*Purification and properties of 2 peptidases from baker's yeast*]. Biochim Biophys Acta, 1966. **122**(1): p. 127-44.
 19. Lu, A.Y., K.W. Junk, and M.J. Coon, *Resolution of the cytochrome P-450-containing omega-hydroxylation system of liver microsomes into three components*. J Biol Chem, 1969. **244**(13): p. 3714-21.
 20. Boguslawski, G., J.L. Shultz, and C.O. Yehle, *Purification and characterization of an extracellular protease from Flavobacterium arborescens*. Anal Biochem, 1983. **132**(1): p. 41-9.
 21. Phadtare, S., M. Rao, and V. Deshpande, *A serine alkaline protease from the fungus Conidiobolus coronatus with a distinctly different structure than the serine protease subtilisin Carlsberg*. Arch Microbiol, 1996. **166**(6): p. 414-7.
 22. Fitzgerald, P.M., et al., *Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type 1 protease and acetyl-pepstatin at 2.0-A resolution*. J Biol Chem, 1990. **265**(24): p. 14209-19.
 23. Barrett, A.J., *Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallo Peptidases*, in *Methods in Enzymology*. 1995, Academic Press. p. 183.
 24. Browner, M.F., W.W. Smith, and A.L. Castelhana, *Matrilysin-inhibitor complexes: common themes among metalloproteases*. Biochemistry, 1995. **34**(20): p. 6602-10.
 25. Singhal, P., V.K. Nigam, and A.S. Vidyarthi, *Studies on Production, Characterization And Applications of Microbial Alkaline Proteases*. International Journal of Advanced Biotechnology and Research, 2012. **3**(3): p. 653-669.

26. Ito, S., et al., *Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures*. Extremophiles, 1998. **2**(3): p. 185-90.
27. Saeki, K., et al., *Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures*. J Biosci Bioeng, 2007. **103**(6): p. 501-8.
28. Ghafoor, A. and S. Hasnain, *Characteristics of an extracellular protease isolated from Bacillus subtilis AG-1 and its performance in relation to detergent components*. Annals of Microbiology, 2009. **59** (3): p. 559-563.
29. Abou-Elela, G.M., et al., *Alkaline protease production by alkaliphilic marine bacteria isolated from Marsa-Matrouh (Egypt) with special emphasis on Bacillus cereus purified protease*. African Journal of Biotechnology, 2011. **10**(22): p. 4631-4642.
30. Bryan, P.N., *Protein engineering of subtilisin*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1543**(2): p. 203-222.
31. Saeki, K., et al., *Novel oxidatively stable subtilisin-like serine proteases from alkaliphilic Bacillus spp.: enzymatic properties, sequences, and evolutionary relationships*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **279**(2): p. 313-9.
32. Giongo, J.L., et al., *Keratinolytic proteases of Bacillus species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006. **23**(3): p. 375-382.
33. Mukherjee, A.K., H. Adhikari, and S.K. Rai, *Production of alkaline protease by a thermophilic Bacillus subtilis under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrica grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation*. Biochemical Engineering Journal, 2008. **39**: p. 353-361.
34. Arunachalam, C. and K. Saritha, *Protease enzyme: an eco-friendly alternative for leather industry* Indian Journal of Science and Technology 2009. **2009**(Vol.2 No. 12): p. 29-32.
35. Yadav, S.K., et al., *Oxidant and solvent stable alkaline protease from Aspergillus flavus and its characterization*. African Journal of Biotechnology, 2011. **10**(43): p. 8630-8640.
36. Sen, S., et al., *Characterization of a novel surfactant and organic solvent stable high-alkaline protease from new Bacillus pseudofirmus SVB1*. Research Journal of Microbiology, 2011. **6**(11): p. 769.

37. Gupta, A. and S. Khare, *Enhanced production and characterization of a solvent stable protease from solvent tolerant Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007. **42**(1): p. 11-16.
38. Jaouadi, B., et al., *The Bioengineering and Industrial Applications of Bacterial Alkaline Proteases: the Case of SAPB and KERAB*. 2011: Intech Open Access Publisher.
39. Wang, N., et al., *Enzyme-catalyzed regioselective synthesis of lipophilic guaiifenesin ester derivatives*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004. **27**(2): p. 97-102.
40. Davidenko, T., *Immobilization of alkaline protease on polysaccharides of microbial origin*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 1999. **33**(9): p. 487-489.
41. Rao, M.B., et al., *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 1998. **62**(3): p. 597-635.
42. Simkhada, J.R., et al., *A novel fibrinolytic protease from Streptomyces sp. CS684*. *Process Biochemistry*, 2010. **45**(1): p. 88-93.
43. Mukherjee, A.K. and S.K. Rai, *A statistical approach for the enhanced production of alkaline protease showing fibrinolytic activity from a newly isolated Gram-negative Bacillus sp. strain AS-S20-I*. *New biotechnology*, 2011. **28**(2): p. 182-189.
44. Ramnani, P., R. Singh, and R. Gupta, *Keratinolytic potential of Bacillus licheniformis RG1: structural and biochemical mechanism of feather degradation*. *Canadian journal of microbiology*, 2005. **51**(3): p. 191-196.
45. Ni, H., et al., *Improved keratinase production for feather degradation by Bacillus licheniformis ZJUEL31410 in submerged cultivation*. *African Journal of Biotechnology*, 2011. **10**(37): p. 7236-7244.
46. Cortezi, M., et al., *Characterization of a feather degrading by Bacillus amyloliquefaciens protease: A new strain*. *World Journal of Agricultural Sciences*, 2008. **4**(5): p. 648-656.
47. Kojima, M., et al., *Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from Bacillus pseudofirmus FA30-01*. *Extremophiles*, 2006. **10**(3): p. 229-235.

48. Ali, T.H., N.H. Ali, and L.A. Mohamed, *Production, purification and some properties of extracellular keratinase from feathers-degradation by Aspergillus oryzae NRRL-447*. Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation, 2011. **6**(2): p. 123-136.
49. Sharma, M., M. Sharma, and V.M. Rao, *In vitro biodegradation of keratin by dermatophytes and some soil keratinophiles*. African Journal of Biochemistry Research, 2011. **5**(1): p. 1-6.
50. Gupta, R. and P. Ramnani, *Microbial keratinases and their prospective applications: an overview*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006. **70**(1): p. 21.
51. Neklyudov, A., A. Ivankin, and A. Berdutina, *Properties and uses of protein hydrolysates (Review)*. Applied Biochemistry and Microbiology, 2000. **36**(5): p. 452-459.
52. Nakiboglu, N., D. Toscali, and G. Nisli, *A novel silver recovery method from waste photographic films with NaOH stripping*. Turkish Journal of Chemistry, 2003. **27**(1): p. 127-133.
53. Nakiboglu, N., D. Toscali, and İ. Yasa, *Silver Recovery from Waste Photographic Films by Using Enzymatic Method*. Turkish Journal of Chemistry, 2001. **25**(3): p. 349-353.
54. Shankar, S., S. More, and R.S. Laxman, *Recovery of silver from waste X-ray film by alkaline protease from Conidiobolus coronatus*. Kathmandu university journal of science, engineering and technology, 2010. **6**(1): p. 60-69.
55. Ahmed, S.A., et al., *Optimization, immobilization of extracellular alkaline protease and characterization of its enzymatic properties*. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2008. **4**(5): p. 434-446.
56. Gulrajani, M., R. Agarwal, and S. Chand, *Degumming of silk with a fungal protease*. 2000.
57. Moon, S.H. and S.J. Parulekar, *A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of Bacillus firmus*. Biotechnology and bioengineering, 1991. **37**(5): p. 467-483.
58. Rose, A.H., *Microbial enzymes and bioconversions*. 1980: Academic Press New York.

59. Kumar, C.G. and H. Takagi, *Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint*. Biotechnology advances, 1999. **17**(7): p. 561-594.
60. Aunstrup, K., *Industrial production of proteolytic enzymes*. Industrial aspects of biochemistry, Part A. North Holland-American Amsterdam: Elsevier, 1974: p. 23-46.
61. Shah, D., et al., *Isolation of Bacillus licheniformis mutants for stable production profiles of alkaline protease*. Biotechnology letters, 1986. **8**(2): p. 103-106.
62. Ito, S., et al., *Enhanced production of extracellular enzymes by mutants of Bacillus that have acquired resistance to vancomycin and ristocetin*. Agricultural and biological chemistry, 1991. **55**(9): p. 2387-2391.
63. Aunstrup, K., et al., *Proteases from alkalophilic Bacillus species*. Ferment Technol Today, 1972. **4**: p. 299-305.
64. Zamost, B.L., et al., *Production and characterization of a thermostable protease produced by an asporogenous mutant of Bacillus stearothermophilus*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1990. **5**(5): p. 303-312.
65. George, S., et al., *Production of protease by Bacillus amyloliquefaciens in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins*. Process Biochemistry, 1995. **30**(5): p. 457-462.
66. Kole, M., I. Draper, and D.F. Gerson, *Production of protease by Bacillus subtilis using simultaneous control of glucose and ammonium concentrations*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1988. **41**(3): p. 197-206.
67. Sen, S. and T. Satyanarayana, *Optimization of alkaline protease production by thermophilic Bacillus licheniformis S-40*. Indian Journal of Microbiology, 1993. **33**: p. 43-43.
68. Giesecke, U.E., et al., *Production of alkaline protease with Bacillus licheniformis in a controlled fed-batch process*. Applied microbiology and biotechnology, 1991. **35**(6): p. 720-724.
69. Frankena, J., et al., *Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by Bacillus licheniformis*. Applied microbiology and biotechnology, 1986. **24**(2): p. 106-112.

70. Ong, P.S. and G.M. Gaucher, *Production, purification and characterization of thermomycolase, the extracellular serine protease of the thermophilic fungus Malbranchea pulchella var. sulfurea*. Canadian journal of microbiology, 1976. **22**(2): p. 165-176.
71. Ikura, Y. and K. Horikoshi, *Effect of amino compounds on alkaline amylase production by alkalophilic Bacillus sp.* Journal of fermentation technology, 1987. **65**(6): p. 707-709.
72. Malathi, S. and R. Chakraborty, *Production of alkaline protease by a new Aspergillus flavus isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent*. Applied and Environmental Microbiology, 1991. **57**(3): p. 712-716.
73. Tsuchiya, K., et al., *Production of thermostable alkaline protease by alkalophilic Thermoactinomyces sp. HS682*. Agricultural and biological chemistry, 1991. **55**(12): p. 3125-3127.
74. Phadatare, S.U., V.V. Deshpande, and M.C. Srinivasan, *High activity alkaline protease from Conidiobolus coronatus (NCL 86.8. 20): enzyme production and compatibility with commercial detergents*. Enzyme and microbial technology, 1993. **15**(1): p. 72-76.
75. Donaghy, J. and A. McKay, *Production and properties of an alkaline protease by Aureobasidium pullulans*. Journal of Applied Microbiology, 1993. **74**(6): p. 662-666.
76. McKay, A., *Production of an alkaline protease by Fusarium graminearum grown on whey*. Milchwissenschaft (Germany, FR), 1992.
77. Gusek, T.W., D.B. Wilson, and J.E. Kinsella, *Influence of carbon source on production of a heat stable protease from Thermomonospora fusca YX*. Applied microbiology and biotechnology, 1988. **28**(1): p. 80-84.
78. Chaloupka, J., *Temperature as a factor regulating the synthesis of microbial enzymes*. Microbiological sciences, 1984. **2**(3): p. 86-90.
79. Chu, I.-M., C. Lee, and T.-S. Li, *Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of Bacillus subtilis ATCC 14416*. Enzyme and Microbial Technology, 1992. **14**(9): p. 755-761.

80. Strauch, M.A. and J.A. Hoch, *Transition-state regulators: sentinels of Bacillus subtilis post-exponential gene expression*. Molecular microbiology, 1993. **7**(3): p. 337-342.
81. Priest, F.G., *Extracellular enzyme synthesis in the genus Bacillus*. Bacteriological reviews, 1977. **41**(3): p. 711.
82. Uehara, H., et al., *Regulation of neutral protease productivity in Bacillus subtilis: transformation of high protease productivity*. Journal of bacteriology, 1974. **119**(1): p. 82-91.
83. Hiroshi, T., *Protein engineering on subtilisin*. International journal of biochemistry, 1993. **25**(3): p. 307-312.
84. Tsai, Y.-C., et al., *Production and further characterization of an alkaline elastase produced by alkalophilic Bacillus strain Ya-B*. Applied and environmental microbiology, 1988. **54**(12): p. 3156-3161.
85. Mukhopadhyay, A., S. Chakrabarti, and P. Bajpai, *Treatment and clarification of fermented broth in bacterial enzyme production*. Biotechnology techniques, 1990. **4**(2): p. 121-126.
86. Strathmann, H., *The use of membranes in downstream processing*. 1990.
87. Bohdziewicz, J. and M. Bodzek, *Ultrafiltration preparation of pectinolytic enzymes from citric acid fermentation broth*. Process biochemistry, 1994. **29**(2): p. 99-107.
88. Bohdziewicz, J., *Ultrafiltration of technical amylolytic enzymes*. Process biochemistry, 1996. **31**(2): p. 185-191.
89. Manachini, P.L., M.G. Fortina, and C. Parini, *Thermostable alkaline protease produced by Bacillus thermoruber—a new species of Bacillus*. Applied microbiology and biotechnology, 1988. **28**(4): p. 409-413.
90. Boyer, E.W. and G.S. Byng, *Bacillus proteolyticus species which produce an alkaline protease*. 1996, Google Patents.
91. Peek, K., et al., *Purification and characterization of a thermostable proteinase isolated from Thermus sp. strain Rt41A*. European Journal of Biochemistry, 1992. **207**(3): p. 1035-1044.
92. Bell, D., M. Hoare, and P. Dunnill, *The formation of protein precipitates and their centrifugal recovery*, in *Downstream processing*. 1983, Springer. p. 1-72.

93. Shih, Y.C., J.M. Prausnitz, and H.W. Blanch, *Some characteristics of protein precipitation by salts*. *Biotechnology and bioengineering*, 1992. **40**(10): p. 1155-1164.
94. Kumar, C., *Studies on microbial alkaline proteases for use in dairy detergents*. 1997, PhD Thesis, National Dairy Research Institute, Deemed University, Karnal, India.
95. Fujiwara, N., A. Masui, and T. Imanaka, *Purification and properties of the highly thermostable alkaline protease from an alkaliphilic and thermophilic Bacillus sp.* *Journal of biotechnology*, 1993. **30**(2): p. 245-256.
96. Tsuchiya, K., et al., *Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic Thermoactinomyces sp. HS682*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1992. **56**(2): p. 246-250.
97. Keay, L. and B.S. Wildi, *Proteases of the genus Bacillus. I. Neutral proteases*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1970. **12**(2): p. 179-212.
98. Kobayashi, T., et al., *Purification of alkaline proteases from a Bacillus strain and their possible interrelationship*. *Applied microbiology and biotechnology*, 1996. **45**(1-2): p. 63-71.
99. Boeckle, B., B. Galunsky, and R. Mueller, *Characterization of a keratinolytic serine proteinase from Streptomyces pactum DSM 40530*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995. **61**(10): p. 3705-3710.
100. LARCHER, G., et al., *A 33 kDa serine proteinase from Scedosporium apiospermum*. *Biochemical Journal*, 1996. **315**(1): p. 119-126.
101. Sinha, R., et al., *Partitioning of a Bacillus alkaline protease in aqueous two-phase systems*. *Bioresource technology*, 1996. **55**(2): p. 163-166.
102. Hotha, S. and R.M. Banik, *Production of Alkaline Protease by Bacillus thuringiensis H 14 in Aqueous Two-Phase Systems*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1997. **69**(1): p. 5-10.
103. Sharma, B., P. Khangarot, and S. Ahmed, *Alkaline protease from Bacillus alcalophilus*. *Proceedings of Micon International*, 1994. **94**: p. 9-12.
104. Mullis, K., et al. *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 1986. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

105. Mullis, K.B. and F.A. Faloon, [21] *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods in enzymology, 1987. **155**: p. 335-350.
106. Kahya, S., E. Buyukcangaz, and K.T. Carli, *Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) optimizasyonu*. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2013. **32**(1).
107. Arı, Ş., *DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması*. Editörler: Temizkan G., Arda N. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. Biyogem yayımları, Nobel Tıp Kitabevleri, 2004(1): p. 101-120.
108. GÜNGÖR, N.D., *Some Molecular Techniques Applied In Determination of Environmental Microbial Diversity*. Sigma, 2015. **33**: p. 54-64.
109. Gonzalez, J. and C. Saiz-Jimenez, *Unknown Microbial Communities on Rock Art Paintings. Consequences for Conservation and Future Perspectives*. Coalition: CSIC Thematic Network on Cultural Heritage, 2005(10): p. 4-7.
110. Dakal, T.C. and P.K. Arora, *Evaluation of potential of molecular and physical techniques in studying biodeterioration*. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2012. **11**(1): p. 71-104.
111. Rastogi, G. and R.K. Sani, *Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment*, in *Microbes and microbial technology*. 2011, Springer. p. 29-57.
112. Cockerill, F. and T.F. Smith, *Rapid-cycle real-time PCR: a revolution for clinical microbiology*. ASM News-American Society for Microbiology, 2002. **68**(2): p. 77-83.
113. Sachse, K., *Specificity and performance of PCR detection assays for microbial pathogens*. Molecular biotechnology, 2004. **26**(1): p. 61-79.
114. Demirel, S., *Molecular Techniques For Determining Microbial Diversity in Treatment Systems*. Sigma, 2012. **30**: p. 179-192.
115. Kita-Tsukamoto, K., et al., *Rapid identification of marine bioluminescent bacteria by amplified 16S ribosomal RNA gene restriction analysis*. FEMS microbiology letters, 2006. **256**(2): p. 298-303.
116. Gich, F.B., et al., *Assessment of microbial community structure changes by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)*. International Microbiology, 2010. **3**(2): p. 103-106.

117. Liu, W.-T., et al., *Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA*. Applied and environmental microbiology, 1997. **63**(11): p. 4516-4522.
118. Błaszczuk, D., et al., *Amplified ribosomal dna restriction analysis (ARDRA) as a screening method for normal and bulking activated sludge sample differentiation*. Polish J Environ Stud, 2011. **20**: p. 29-36.
119. Singh, J., N. Batra, and R. Sobti, *Serine alkaline protease from a newly isolated Bacillus sp. SSR1*. Process Biochemistry, 2001. **36**(8): p. 781-785.
120. Richter, G., *Handbook of Amylases and Related Enzymes. Edited by the Amylase Research Society of Japan. Pergamon Press, Oxford 1988. 274 pp., with 57 Figures and 102 Tables. ISBN 0-08-036141-2. Hardcover DM 152,-. Starch-Stärke, 1990. 42(8): p. 325-325.*
121. Gessesse, A. and B.A. Gashe, *Production of alkaline protease by an alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline soda lake*. Biotechnology letters, 1997. **19**(5): p. 479.
122. Cutting, S. and P. Vander Horn, *Genetic analysis, p 27–74*. Molecular biological methods for Bacillus. John Wiley & Sons, Sussex, England, 1990.
123. Takami, H., T. Akiba, and K. Horikoshi, *Production of extremely thermostable alkaline protease from Bacillus sp. no. AH-101*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1989. **30**(2): p. 120-124.
124. Kazan, D., et al., *Purification and characterization of a serine alkaline protease from Bacillus clausii GMBAE 42*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2005. **32**(8): p. 335-344.
125. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
126. Agasthya, A.S., et al., *Isolation and molecular characterisation of alkaline protease producing Bacillus thuringiensis*. Cell biochemistry and biophysics, 2013. **66**(1): p. 45-51.
127. Nadeem, M., et al., *Studies on commercially important alkaline protease from Bacillus lichniformis N-2 isolated from decaying organic soil*. Turkish Journal Of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi, 2007. **32**(4): p. 171-177.

128. Heyrman, J., et al., *Bacillus novalis* sp. nov., *Bacillus vireti* sp. nov., *Bacillus soli* sp. nov., *Bacillus bataviensis* sp. nov. and *Bacillus drentensis* sp. nov., from the Drentse A grasslands. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2004. **54**(1): p. 47-57.
129. Aslim, B., Z. Yuksekdog, and Y. Beyatli, *Determination of PHB growth quantities of certain Bacillus species isolated from soil*. Turkish electronic journal of biotechnology, 2002: p. 24-30.
130. Uyar, F., et al., *Optimal conditions for production of extracellular protease from newly isolated Bacillus cereus strain CA15*. EurAsian Journal of BioSciences, 2011. **5**.
131. Shah, K., et al., *Purification and characterization of a solvent, detergent and oxidizing agent tolerant protease from Bacillus cereus isolated from the Gulf of Khambhat*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2010. **67**(1): p. 85-91.
132. Yu, C., et al., *Analysis of the bacterial diversity existing on animal hide and wool: Development of a preliminary PCR-restriction fragment length polymorphism fingerprint database for identifying isolates*. Journal of AOAC International, 2012. **95**(6): p. 1750-1754.
133. Dees, P.M. and W.C. Ghiorse, *Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA*. FEMS Microbiology Ecology, 2001. **35**(2): p. 207-216.
134. Wang, X., et al., *Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis*. Journal of applied microbiology, 2003. **95**(3): p. 508-520.
135. Wattiau, P., et al., *A PCR test to identify Bacillus subtilis and closely related species and its application to the monitoring of wastewater biotreatment*. Applied microbiology and biotechnology, 2001. **56**(5): p. 816-819.
136. Hansen, B.M., T.D. Leser, and N.B. Hendriksen, *Polymerase chain reaction assay for the detection of Bacillus cereus group cells*. FEMS Microbiology Letters, 2001. **202**(2): p. 209-213.
137. Djordjevic, S.P., et al., *Genetic and Biochemical Diversity among Isolates of Paenibacillus alvei Cultured from Australian Honeybee (Apis mellifera)*

- Colonies*. Applied and environmental microbiology, 2000. **66**(3): p. 1098-1106.
138. Heyndrickx, M., et al., *Virgibacillus: a new genus to accommodate Bacillus pantothenicus (Proom and Knight 1950). Emended description of Virgibacillus pantothenicus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1998. **48**(1): p. 99-106.
 139. Nakamura, L. and J. Swezey, *Deoxyribonucleic acid relatedness of Bacillus circulans Jordan 1890 strains*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1983. **33**(4): p. 703-708.
 140. De Baere, T., et al., *BMC microbiology Volume: 2 ISSN: 1471-2180 ISO Abbreviation: BMC Microbiol. Publication Date: 2002 Mar. Detail:.*
 141. Logan, N.A., et al., *Polyphasic identification of Bacillus and Brevibacillus strains from clinical, dairy and industrial specimens and proposal of Brevibacillus invocatus sp. nov.* International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2002. **52**(3): p. 953-966.
 142. Gurtler, V., V.A. Wilson, and B.C. Mayall, *Classification of medically important clostridia using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rDNA*. Microbiology, 1991. **137**(11): p. 2673-2679.
 143. Vaerewijck, M., et al., *Occurrence of Bacillus sporothermodurans and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle*. Journal of applied microbiology, 2001. **91**(6): p. 1074-1084.
 144. Wu, X.-Y., et al., *Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of Bacillus species of environmental significance*. Journal of microbiological methods, 2006. **64**(1): p. 107-119.
 145. Ash, C., et al., *Phylogenetic heterogeneity of the genus Bacillus revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences*. Letters in Applied Microbiology, 1991. **13**(4): p. 202-206.
 146. Cihan, A.C., et al., *The genetic diversity of genus Bacillus and the related genera revealed by 16S rRNA gene sequences and ardra analyses isolated from geothermal regions of turkey*. Brazilian Journal of Microbiology, 2012. **43**(1): p. 309-324.

147. Beg, Q.K. and R. Gupta, *Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from Bacillus mojavensis*. Enzyme and Microbial Technology, 2003. **32**(2): p. 294-304.
148. Mabrouk, S., et al., *Optimization of alkaline protease productivity by Bacillus licheniformis ATCC 21415*. Bioresource Technology, 1999. **69**(2): p. 155-159.
149. Deviram, G., et al., *Production, optimization and partial purification of protease from Bacillus subtilis*. 2015.
150. Nilegaonkar, S., et al., *Production and partial characterization of dehairing protease from Bacillus cereus MCM B-326*. Bioresource technology, 2007. **98**(6): p. 1238-1245.
151. Cheng, S.-W., et al., *Production and characterization of keratinase of a feather-degrading Bacillus licheniformis PWD-1*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1995. **59**(12): p. 2239-2243.
152. Takagi, H., et al., *Improved production and recovery of alkaline elastase from alkalophilic Bacillus strain by a change of medium composition*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1995. **59**(8): p. 1591-1592.
153. Ghorbel-Frikha, B., et al., *Production and purification of a calcium-dependent protease from Bacillus cereus BGI*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2005. **32**(5): p. 186-194.
154. Nehete, P., V. Shah, and R. Kothari, *Isolation of a high yielding alkaline protease variant of Bacillus licheniformis*. Enzyme and microbial technology, 1986. **8**(6): p. 370-372.
155. Sinha, N. and T. Satyanarayana, *Alkaline protease production by thermophilic Bacillus licheniformis*. Indian journal of microbiology. New Delhi, 1991. **31**(4): p. 425-430.
156. Banerjee, R. and B. Bhattacharyya, *Optimization of multiple inducers effect on protease biosynthesis by Rhizopus oryzae*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 1992. **7**(5): p. 225-228.
157. Gençkal, H. and C. Tari, *Alkaline protease production from alkalophilic Bacillus sp. isolated from natural habitats*. Enzyme and Microbial Technology, 2006. **39**(4): p. 703-710.

158. Kanekar, P., et al., *Optimization of protease activity of alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline lake in India*. Bioresource Technology, 2002. **85**(1): p. 87-93.
159. Almas, S., A. Hameed, and P. Mohan, *Purification and characterization of a novel protease from Bacillus strain SAL1*. African Journal of Biotechnology, 2009. **8**(15): p. 3603.
160. Doddapaneni, K.K., et al., *Purification and characterization of a solvent and detergent-stable novel protease from Bacillus cereus*. Microbiological Research, 2009. **164**(4): p. 383-390.
161. Cowan, D.A. and R.M. Daniel, *Rapid purification of two thermophilic proteinases using dye-ligand chromatography*. Journal of biochemical and biophysical methods, 1996. **31**(1-2): p. 31-37.
162. Deng, A., et al., *Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from Bacillus sp. B001*. Bioresource technology, 2010. **101**(18): p. 7100-7106.
163. Joo, H.S., et al., *Oxidant and SDS-stable alkaline protease from Bacillus clausii I-52: Production and some properties*. Journal of applied microbiology, 2003. **95**(2): p. 267-272.
164. Kumar, C., *Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic Bacillus pumilus*. Letters in applied microbiology, 2002. **34**(1): p. 13-17.
165. Adinarayana, K., P. Ellaiah, and D.S. Prasad, *Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated Bacillus subtilis PE-11*. Aaps Pharmscitech, 2003. **4**(4): p. 440-448.
166. Venugopal, M. and A. Saramma, *An alkaline protease from Bacillus circulans BM15, newly isolated from a mangrove station: characterization and application in laundry detergent formulations*. Indian journal of microbiology, 2007. **47**(4): p. 298-303.
167. Yang, J.-K., et al., *Production and purification of protease from a Bacillus subtilis that can deproteinize crustacean wastes* ☆. Enzyme and Microbial Technology, 2000. **26**(5): p. 406-413.

168. Kim, S., Y. Kim, and I.-K. Rhee, *Purification and characterization of a novel extracellular protease from Bacillus cereus KCTC 3674*. Archives of Microbiology, 2001. **175**(6): p. 458-461.

