

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

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**PROTEAZ ÜRETİCİSİ MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU,  
TANIMLANMASI VE PROTEAZ ENZİMLERİNİN BİYOTEKNOLOJİK  
UYGULANABİLİRLİĞİ**

**FATMA ŞEYMA DUMAN**

**HAZİRAN 2017**

**Biyoloji Anabilim Dalında** Fatma Şeyma DUMAN tarafından hazırlanan **PROTEAZ ÜRETİCİSİ MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE PROTEAZ ENZİMLERİNİN BİYOTEKNOLOJİK UYGULANABİLİRLİĞİ** 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 İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE PROTEAZ ENZİMLERİNİN BİYOTEKNOLOJİK UYGULANABİLİRLİĞİ

DUMAN, Fatma Şeyma

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Haziran 2017, 172 sayfa

Bu tezin amacı, proteaz üreten mikroorganizmaların izolasyonu, tanımlanması ve proteaz enzimlerinin karakterizasyonunun yapılmasıdır. Proteaz üreticisi mikroorganizmaların izolasyonu amacıyla; Kırıkkale Üniversitesi'nin atık depolama alanından toprak örneği alındı. Toprak örnekleri skim milk agar besiyerine yayma ekim yapıldı. Örnekler 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Skim milk hidrolizi sonucu koloni etrafında şeffaf zon oluşturan izolatlar proteaz üreticisi olarak kabul edildi. Çalışmada toplam 6 bakteri izole edildi. İzolatların tanımlanması amacıyla; makroskopik (koloni morfolojileri), mikroskopik (gram ve spor boyama), fizyolojik (gelişim gösterdikleri sıcaklık ve pH koşulları) ve biyokimyasal (IMVIC, katalaz, nişasta hidrolizasyon ve jelatin hidrolizasyon testi) özellikleri incelendi. Üreme eğrileri saptandı. Daha ileri tanımlama için DNA izolasyonu, PZR ile 16S rRNA analizi, PZR optimizasyonu ve ARDRA analizleri yapıldı. Sonuçlar agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. İzolatlar *Bacillus mojavensis* (RFLK01), *Bacillus thuringiensis* (RFLK03), *Bacillus mojavensis* (RFLK06), *Aeromonas salmonicida* (RFLK07), *Bacillus anthracis* (RFLK08) ve *Bacillus stratosphericus* (RFLK12) olarak tanımlandı. Tanımlanmış izolatlar enzim üretim besiyerine ekildi ve 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda +4°C'de 5.000 rpm'de, 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant ham homojenat olarak kullanıldı. Ham homojenatın proteaz aktivitesi (U/mL) hesaplandı. Çalışmalara *Bacillus thuringiensis* (RFLK03)

izolatından devam edildi. RFLK03'ün optimum enzim üretimi için üretim koşulları belirlendi. Optimum enzim üretiminin 27 °C, pH 7.0'da, 72. saat ve %1 inokulum ile gerçekleştiği saptandı. Enzimin biyoteknolojik uygulanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla; enzimin çeşitli parametrelerdeki (sıcaklık, pH, metal iyonları, kimyasallar, organik çözücüler, inhibitörler, substrat özgülüğü) proteaz aktivitesi hesaplandı. Enzimin 17-80°C ve pH 7.0-11.0 arasında aktivitesini koruduğu, optimum enzim aktivitesinin 70 °C ve pH 7.0 olduğu saptandı. Manganın proteaz aktivitesini arttırdığı bulundu. Ayrıca oksitleyici ajan olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin aktiviteyi büyük ölçüde arttırdığı saptandı. Ham homojenatın PMSF VE EDTA ile inhibe olduğu belirlendi. Enzim amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE Sefaroz iyon değişimi kromatografisi ile saflaştırıldı. Spesifik aktivite(U/mg) ve saflaştırma katsayısı sırası ile 576.7, 1155.4 ve 1.3, 2.6 bulundu. 2 farklı proteaz enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE analizinde yaklaşık 75 kDa ve 47 kDa olarak belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Proteaz, *Bacillus* sp., 16S rRNA, ARDRA, Biyoteknoloji, Kısmi Saflaştırma, Karakterizasyon

## ABSTRACT

### PROTEASE PRODUCER MICROORGANISMS ISOLATION AND IDENTIFICATION FROM KIRIKKALE AND BIOTECHNOLOGICAL APPLICABILITY OF PROTEASE

DUMAN, Fatma Şeyma

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Science

Department of Biology, Ph. D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Aysun ERGENE

June 2017, 172 pages

Purpose of this thesis is on isolation and identification microorganisms which are able to produce protease and characterization of protease. In order to isolate the microorganisms in this study, soil samples were collected from the waste storage area of Kırıkkale University. Samples were plated onto skim milk agar plates. Plates were incubated at 37 °C for 24 h. A clear zone of skim milk hydrolysis was accepted as an indication of protease producing the organisms. A total of 6 bacteria were isolated. To identify the isolates, macroscopic (colony morphology), microscopic (gram and spor staining), physiological (optimum growth temperature and pH conditions) and biochemical (IMVIC, catalase, starch hydrolysis and gelatin hydrolysis test) properties of isolates were examined. Growth curves were detected. For further identification, DNA isolation, 16S rRNA analysis with PZR, PZR optimization and ARDRA analyzes were evaluated. The results were displayed on agarose gel electrophoresis. Isolates were identified as *Bacillus mojavensis* (RFLK01), *Bacillus thuringiensis* (RFLK03), *Bacillus mojavensis* (RFLK06), *Aeromonas salmonicida* (RFLK07), *Bacillus anthracis* (RFLK08) and *Bacillus stratosphericus* (RFLK12). The identified microorganisms were inoculum on the enzyme production medium and incubated for 72 hours. At the incubation, the supernatant was used as crude homogenate by centrifugation at 5,000 rpm at +4 ° C for 20 minutes. The protease activity of the crude homogenate was calculated as

(U/mL). Studies continued with *Bacillus thuringiensis* (RFLK03). The production conditions for the optimum enzyme of the RFLK03 were determined. Optimum enzyme production was determined in 27 °C, pH 7.0, 72 hours as incubation time and %1 as inoculum ratio. The protease activity was calculated to determine the biotechnological applicability with various parameters (temperature, pH, metal ions, chemicals, organic solvents, inhibitors, substrate specificity). It has been observed that, protease enzyme maintains activity between 17-70 °C and pH 7-11, optimum enzyme activity was 70 °C and pH 7.0. Manganese was found to increase protease activity. Also, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, an oxidizing agent, has greatly increased protease activity. Crude homogenate was inhibited by PMSF and EDTA. The enzyme was purified by ammonium sulphate precipitation and DEAE Sepharose ion exchange chromatography. Specific activity (U / mg) and purification coefficient were found as 576.7, 1155.4 and 1.3, 2.6, respectively. The molecular weight of the two protease enzymes was determined to be approximately 75 kDa and 47 kDa by SDS-PAGE analysis.

**Key words:** Protease, *Bacillus* sp., 16S rRNA, ARDRA, Biotechnology, Partial Purification, Characterization

## TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması esnasında benden hiçbir yardım ve desteğini esirgemeyen ve bilimsel deney imkanlarını sonuna kadar sağlayan, danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Aysun ERGENE'ye, tezimin bir çok aşamasında daima yardım ve desteğini gördüğüm arkadaşım Karcan IŐIK'a, örnek toplanması ve diğer laboratuvar uygulamaları esnasında yardımlarını gördüğüm Tayfun COŐKUN ve Murat ÇAKMAK'a ve son olarak benden maddi manevi hiçbir konuda desteklerini esirgemeyen, büyük fedakarlıklarla daima yardımcı olan canım aileme teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xvi</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Proteazların Sınıflandırılması .....	1
1.1.1. Proteazların Kaynaklarına Göre Sınıflandırılması .....	2
1.1.1.1. Bitkisel Proteazlar .....	2
1.1.1.2. Hayvansal Proteazlar .....	3
1.1.1.3. Mikrobiyal Proteazlar .....	4
1.1.2. Proteazların Katalizlediği Reaksiyon Tipine Göre Sınıflandırılması .....	8
1.1.2.1. Ekzopeptidazlar .....	9
1.1.2.1.1. Amino Proteazlar .....	9
1.1.2.1.2. Karboksipeptidazlar .....	10
1.1.2.2. Omega peptidazlar .....	10
1.1.2.3. Endopeptidazlar .....	10
1.1.3. Proteazların Katalizlediği Bölgenin Yapısına Göre Sınıflandırılması .....	11
1.1.3.1. Serin Proteazlar .....	11
1.1.3.2. Sistein Proteazlar .....	12
1.1.3.3. Aspartik Proteazlar .....	13
1.1.3.4. Metalloproteazlar .....	14
1.2. Proteazların Fizyolojik İşlevleri .....	15
1.2.1. Protein Sindirimi .....	16
1.2.2. Protein Dönüşümü .....	16
1.2.3. Sporulasyon .....	16
1.2.4. Çimlenme .....	17
1.2.5. Enzim Modifikasyonu .....	17
1.2.6. Beslenme .....	18
1.2.7. Gen İfadesinin Regülasyonu .....	18
1.2.8. Diğer Fizyolojik Görevler .....	18
1.3. Proteazların Endüstriyel Kullanım Alanları .....	19
1.3.1. Biyomühendislik .....	19
1.3.2. Deterjan endüstrisi .....	19
1.3.3. Bira Endüstrisi .....	21
1.3.4. Fırın Endüstrisi .....	21
1.3.5. Gıda endüstrisi .....	22
1.3.6. Yem endüstrisi .....	22



1.3.7. Yan ürün olarak kullanımı .....	23
1.3.8. Protein Geri Kazanımının Arttırılması .....	23
1.3.9. Deri Endüstrisi .....	23
1.3.10. Tekstil endüstrisi .....	24
1.3.11. Kozmetik Sektörü.....	24
1.3.12. Organik Kimya.....	24
1.3.13. Farmösitik ve tıp .....	25
1.3.14. Peynir yapımı .....	26
1.3.15. Peptit sentezi .....	27
1.3.16. Lezzet arttırıcı .....	28
1.4. Yöntemler.....	28
1.4.1. DNA İzolasyonu.....	28
1.4.2. PZR ve Temel Aşamaları .....	29
1.4.2.1 DNA Zincirinin Açılması (Denaturation) .....	30
1.4.2.2. Primerlerin DNA Zincirlerine Bağlanması (Annealing).....	30
1.4.2.3. Primer Uzaması (Primer Extesion) .....	30
1.4.3. PZR Temel Bileşenleri ve PZR Optimizasyonu .....	31
1.4.3.1. DNA/RNA Örneği .....	31
1.4.3.2. Taq DNA Polimeraz Enzimi .....	31
1.4.3.3. Primerler.....	31
1.4.3.4. dNTP (Deoksinükleotid trifosfat) .....	32
1.4.3.5. Tampon .....	32
1.4.3.6. Magnezyum ( $Mg^{+2}$ ).....	32
1.4.3.7. Su .....	33
1.4.4. ARDRA (Amplifiye edilmiş rDNA Restriksiyon Analizi).....	33
1.4.5. Elektroforik Analiz.....	34
1.4.5.1. Agaroz Jel Elektroforezi .....	34
1.4.5.2. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) .....	35
1.4.6. Kromatografik Yöntemler.....	36
1.4.6.1. İyon Değişim Kromatografisi .....	36
1.4.6.1.1. İyon Değişimi Kromatografi ile Ayırma işlemi .....	37
1.4.6.1.2. İyon Değişimi Kromatografisinde Saflaştırmayı Etkileyen Faktörler .....	37
1.4.6.1.2.1. Kullanılan Matriks ve Özellikleri.....	37
1.4.6.1.2.2. Tampon Tuzları ve pH aralıkları.....	38
1.4.6.1.2.3. Tuz konsantrasyonu .....	39
1.4.6.1.2.4. Kolon Akış Hızı .....	39
1.4.6.1.2.5. Sıcaklık.....	39
1.5. Tezin Amacı .....	39
<b>2. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>41</b>
2.1. MATERYAL .....	41
2.1.1. Referans Suşlar.....	41
2.1.2. Proteaz Üreticisi İzolatlar.....	41
2.1.3. Kullanılan Besiyerleri .....	41
2.1.3.1. Nutrient Agar besiyeri.....	41
2.1.3.2. Nutrient Broth besiyeri.....	41
2.1.3.3. Skimmilk Agar Besiyeri.....	42
2.1.3.4. N1 Agar Besiyeri .....	42

2.1.3.5. Gliserollü Besiyeri .....	42
2.1.3.6. Enzim Üretim Besiyeri.....	42
2.1.4. Kullanılan Çözelti ve Reaktifler.....	43
2.1.4.1. 2N NaOH Tampon Çözeltisi.....	43
2.1.4.2. 1N HCl Tampon Çözeltisi.....	43
2.1.4.3. 50 mM Fosfat Tamponu (pH 7.3) .....	43
2.1.4.4. 10 mM NaCl içeren 50 mM Fosfat Tamponu (pH 7.3) .....	43
2.1.4.5. 100 mM NaCl içeren 50 mM Fosfat Tamponu (pH 7.3) .....	44
2.1.4.6. 1 M NaCl içeren 50 mM Fosfat Tamponu (pH 7.3) .....	44
2.1.4.7. Metil Red Reaktifinin Hazırlanması .....	44
2.1.4.8. Voges-Proskauer Reaktifinin Hazırlanması.....	44
2.1.4.9. % 3'lük H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Hazırlanması .....	44
2.1.4.10. % 5'lik Malaşit Yeşili Çözeltisinin Hazırlanması.....	45
2.1.4.11. Bradford Reaktifinin Hazırlanması .....	45
2.1.5. DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	45
2.1.5.1. 50 mM Tris-EDTA tamponu (pH 8.0) .....	45
2.1.5.2. % 10'luk SDS.....	45
2.1.5.3. 5M NaCl çözeltisi .....	45
2.1.5.4. CTAB / NaCl çözeltisi .....	46
2.1.5.5. Kloroform/İzoamilalkol Çözeltisi .....	46
2.1.5.6. Kloroform / İzoamilalkol / Fenol Çözeltisi.....	46
2.1.5.7. % 70'lik etanol .....	46
2.1.6. Agaroz Jel Elektoroforezinde Kullanılan Çözeltiler .....	46
2.1.6.1. 10X TBE tamponu .....	46
2.1.6.2. Agaroz Çözeltisi Hazırlanması .....	47
2.1.6.3. Etidium Bromide Çözeltisi.....	47
2.1.6.4. 6x Yükleme Tamponu (10 mL).....	47
2.1.7. Proteaz Aktivitesi Hesaplanmasında Kullanılan Çözelti ve Tamponlar .....	47
2.1.7.1. TCA Çözeltisi .....	47
2.1.7.2. 50 mM Glisin-NaOH Tamponu (pH 9.0).....	48
2.1.7.3. 2N NaOH Çözeltisi (pH 9.0).....	48
2.1.7.4. % 0.6'lık kazein çözeltisi .....	48
2.1.7.5. 0,5M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Çözeltisi .....	48
2.1.7.6. 1N Folin-Ciocalteu Çözeltisi .....	48
2.1.8. SDS PAGE Analizinde Kullanılan Çözeltiler.....	48
2.1.8.1. (% 30'luk) Akrilamid Bisakrilamid Karışımı .....	48
2.1.8.2. 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) .....	49
2.1.8.3. APS (% 10) .....	49
2.1.8.4. SDS(% 10) .....	49
2.1.8.5. 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) .....	49
2.1.8.6. Gliserol (% 50).....	49
2.1.8.7. Brom fenol mavisi(% 1).....	49
2.1.8.8. Tespit Çözeltisi .....	50
2.1.8.9. Tespit Yıkama Çözeltisi.....	50
2.1.8.10. Coomassie Brilliant Blue boya Çözeltisi .....	50
2.1.8.11.Boya Giderimi Çözeltisi.....	50
2.2. METOT .....	51
2.2.1. Proteaz Üreticisi Mikroorganizmaların İzolasyonu .....	51

2.2.1.1. Örnek Alımı .....	51
2.2.1.2. Proteaz Üreticisi Mikroorganizmaların İzolasyonu .....	51
2.2.1.3. Stok Kültürün Saklanması .....	51
2.2.2. Proteaz Üreticisi Mikroorganizmaların İdentifikasyonu.....	52
2.2.2.1. Mikroorganizmaların Makroskobik Özelliklerinin Belirlenmesi..	52
2.2.2.2. Mikroorganizmaların Mikroskobik Özelliklerinin Belirlenmesi ..	52
2.2.2.2.1. Gram Boyama .....	52
2.2.2.2.2. Spor Boyama.....	53
2.2.2.3. Mikroorganizmaların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi .....	53
2.2.2.3.1. Sıcaklık ve pH'ın Mikroorganizma Üremesine Etkisinin Belirlenmesi.....	53
2.2.2.3.2. Üreme Eğrisinin Belirlenmesi.....	54
2.2.2.4. Mikroorganizmaların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.	54
2.2.2.4.1. İndol Testi .....	54
2.2.2.4.2. Metil Red Testi.....	55
2.2.2.4.3. Voges-Proskauer Testi .....	55
2.2.2.4.4. Sitrat Testi .....	55
2.2.2.4.5. Nişasta Hidrolizasyon Testi .....	55
2.2.2.4.6. Jelatin Hidrolizasyon Testi.....	56
2.2.2.4.7. Katalaz Testi.....	56
2.2.2.5. Mikroorganizmaların Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi .....	56
2.2.2.5.1. DNA İzolasyonu.....	56
2.2.2.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	57
2.2.2.5.3. PZR Optimizasyonu .....	58
2.2.2.5.4. 16S rRNA geni dizi analizi ve Filogenetik Analiz.....	59
2.2.2.5.5. ARDRA (Amplifiye edilmiş Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi) .....	59
2.2.2.5.6. Agaroz jel elektroforezi.....	60
2.2.3. Proteaz Enzimi Üretimi.....	61
2.2.3.1. Proteaz Aktivitesinin Kalitatif Hesaplanması .....	61
2.2.3.2. Proteaz Aktivitesinin Kantitatif Hesaplanması .....	61
2.2.3.2.1 Enzim Ünitesi Tanımı .....	62
2.2.3.2.2. Tirozin Standart Grafiği .....	62
2.2.4. Optimum Proteaz Üretimine Gerçekleştiği Koşulların Belirlenmesi .	63
2.2.4.1. Proteaz Üretiminde Optimum Sıcaklık ve pH Koşullarının Belirlenmesi .....	63
2.2.4.2. Proteaz Üretiminde Optimum İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi .....	63
2.2.4.4. Proteaz Üretiminde Optimum Besiyeri Ortamının Belirlenmesi ..	64
2.2.4.4.1. Optimize Enzim Üretim Besiyeri.....	64
2.2.4.4.2. Tek Azot Kaynağı Bulunan Modifiye Enzim Üretim Besiyeri .....	65
2.2.4.4.3. Karbon Kaynağı Bulunan Modifiye Enzim Üretim Besiyeri.	65
2.2.4.5. RFLK03 Kodlu İzolatın Proteaz Aktivitesinin Referans Suşlar ile Karşılaştırılması .....	66
2.2.5. Enzim Özelliklerinin Belirlenmesi.....	66
2.2.5.1. Enzimin Aktif Olduğu Sıcaklık Aralığının Belirlenmesi.....	66
2.2.5.2. Enzimin Aktif Olduğu pH Aralığının Belirlenmesi .....	66
2.2.5.3. Metal iyonlarının Enzimin Çalışmasına Etkisinin Belirlenmesi...	67

2.2.5.4. Organik Çözücülerin Enzimin Çalışmasına Etkisinin Belirlenmesi	67
2.2.5.5. Çeşitli Kimyasalların Enzimin Çalışmasına Etkisinin Belirlenmesi	67
2.2.5.6. İnhibitörlerin Enzimin Çalışmasına Etkisinin Belirlenmesi	68
2.2.5.7. Substrat Özgüllüğü	68
2.2.6. Enzimin Kısmi Saflaştırılması	68
2.2.6.1. Santrifügasyon	69
2.2.6.2. Çöktürme	69
2.2.6.3. Diyaliz	70
2.2.6.4. İyon Değişimi Kromatografisi	70
2.2.6.5. Toplam Protein Miktarının Hesaplanması	71
2.2.6.5.1. BSA Standart Grafiği	71
2.2.6.6. SDS-PAGE	72
<b>3. BULGULAR</b>	<b>74</b>
3.1. Proteaz Üreticisi Mikroorganizmaların İzolasyonu	74
3.1.1. Örnek Alımı	74
3.2. Proteaz Üreticisi İzolatların İdentifikasyonu	75
3.2.1. İzolatların Makroskobik Özelliklerinin Belirlenmesi	75
3.2.2. İzolatların Mikroskobik Özelliklerinin Belirlenmesi	75
3.2.2.1. Gram Boyama	76
3.2.2.2. Spor Boyama	76
3.2.3. İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	77
3.2.3.1. Üreme Eğrisinin Belirlenmesi	82
3.2.4. İzolatların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	84
3.2.5. Mikroorganizmaların Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi	85
3.2.5.1. DNA İzolasyonu	85
3.2.5.2. PZR ve PZR Optimizasyonu	86
3.2.5.3. Filogenetik Analiz	89
3.2.5.4. ARDRA	97
3.3. Proteaz Enzimi Üretimi	100
3.3.1. Proteaz Aktivitesinin Kalitatif Belirlenmesi	100
3.3.2. Proteaz Aktivitesinin Kantitatif Belirlenmesi	101
3.4. Optimum Proteaz Üretiminin Gerçekleştiği Koşulların Belirlenmesi	102
3.4.1. Proteaz Enziminin Optimum Üretildiği Sıcaklık ve pH Koşullarının Belirlenmesi	102
3.4.2. Proteaz Enziminin Optimum Üretildiği İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi	108
3.4.3. Proteaz Enziminin Optimum Üretildiği İnokulum Oranının Belirlenmesi	109
3.4.4. Proteaz Enziminin Üretildiği Optimum Besiyerinin Belirlenmesi	110
3.4.4.1. Optimize Enzim Üretim Besiyeri	110
3.4.4.2. Tek Azot Kaynağı Bulunan Modifiye Enzim Üretim Besiyeri	112
3.4.4.3. Karbon Kaynağı Bulunan Modifiye Enzim Üretim Besiyeri	113
3.4.4.4. Farklı besiyerlerinde Elde Edilen Proteaz Aktiviteleri	114
3.4.5. Referans Suşlar ile RFLK03 Kodlu İzolatın Proteaz Aktivitelerinin Karşılaştırılması	115
3.5. Enzim Özelliklerinin Belirlenmesi	115
3.5.1. Sıcaklığın Proteaz Aktivitesine Etkisi	115

3.5.2. pH değerinin Proteaz Aktivitesine Etkisi.....	116
3.5.3. Metal İyonlarının Proteaz Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi .....	117
3.5.5.Organik Çözücülerin Proteaz Aktivitesine Etkisi .....	119
3.5.6. İnhibitörlerin Proteaz Aktivitesine Etkisi.....	120
3.5.7.Substrat Özgüllüğü.....	120
3.6. Enzimin Kısmi Saflaştırılması .....	121
3.6.1. Toplam Protein Miktarının Hesaplanması .....	121
3.6.1.1. BSA Standart Grafiği .....	121
3.6.2. Saflaştırma Basamakları .....	121
3.6.3. SDS-PAGE.....	125
<b>4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>127</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>140</b>



## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Çizelge Sayfa

1.1. Reaksiyon Tipine Göre Proteazlar .....	8
1.2. Proteazların katalizlediği bölgenin yapısına göre sınıflandırılmaları .....	15
1.3. Ticari subtilisinlerin deterjanlarda kullanımı .....	20
1.4. Restriksiyon Enzimlerinin Kesim Yerleri .....	33
1.5. Agaroz jel konsantrasyonları ve ayırım aralıkları .....	34
1.6. Jel derişimi konsantrasyonları ve ayırımları .....	36
1.7. İyon değişimi reçineleri ve özellikleri.....	38
2.1. PZR programı.....	57
2.2. PZR termal döngü programı.....	58
2.3. Restriksiyon enzimlerinin kesim protokolü .....	60
2.4. SDS PAGE analizi .....	72
3.1. İzolatların koloni morfolojileri.....	75
3.2. Gram boyama sonuçları .....	76
3.3. İzolatların spor boyama sonuçları .....	77
3.4. İzolatların biyokimyasal test sonuçları.....	84
3.5. 16S rRNA gen bölgesinin baz çifti uzunlukları (bp) .....	86
3.6. Optimum bağlanma sıcaklığı ve MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonları.....	87
3.7. İzolatlarının zon çapları (mm).....	100
3.8. Optimum proteaz üretiminin gerçekleştiği sıcaklık ve pH koşulları .....	108
3.9. Optimum proteaz üretiminin gerçekleştiği inkübasyon süreleri .....	109
3.10. Optimize enzim üretim besiyeri bileşenleri ve konsantrasyonları .....	112
3.11. Metal İyonlarının Proteaz Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi .....	117
3.12. Saflaştırma basamakları ve parametrelerin etkisi.....	122
3.13. Fraksiyonların Proteaz Aktiviteleri (U/mL), Protein Miktarları (µg/mL) ve Spesifik Aktiviteleri (U/mg) .....	123

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Proteazların reaksiyon tipine göre sınıflandırılması .....	9
1.2. Kazeini oluşturan alt misellerin yapısı .....	26
3.1. a) İzolatların izolasyonu b) RFLK07'nin saflaştırılması .....	74
3.2. a) RFLK08 izolatının gram (+) boyaması b) RFLK07 izolatının gram (-) boyaması .....	76
3.3. RFLK01 (a) ve RFLK03 (b) izolatlarının spor boyaması .....	77
3.4. RFLK01 kodlu izolatın gelişim gösterdiği sıcaklık ve pH koşullarının belirlenmesi .....	79
3.5. RFLK03 kodlu izolatın gelişim gösterdiği sıcaklık ve pH koşullarının belirlenmesi .....	79
3.6. RFLK06 kodlu izolatın gelişim gösterdiği sıcaklık ve pH koşullarının belirlenmesi .....	80
3.7. RFLK07 kodlu izolatın gelişim gösterdiği sıcaklık ve pH koşullarının belirlenmesi .....	80
3.8. RFLK08 kodlu izolatın gelişim gösterdiği sıcaklık ve pH koşullarının belirlenmesi .....	81
3.9. RFLK12 kodlu izolatın gelişim gösterdiği sıcaklık ve pH koşullarının belirlenmesi .....	81
3.10. RFLK01 kodlu izolatın üreme eğrisi .....	82
3.11. RFLK03 kodlu izolatın üreme eğrisi .....	82
3.12. RFLK06 kodlu izolatın üreme eğrisi .....	83
3.13. RFLK07 kodlu izolatın üreme eğrisi .....	83
3.14. RFLK08 kodlu izolatın üreme eğrisi .....	83
3.15. RFLK12 kodlu izolatın üreme eğrisi .....	84
3.16. (a) İndol, (b) Metil-Red, (c) Voges-Proskauer (d) Sitrat testi sonuçları .....	85
3.17. (a) Katalaz testi, (b) Jelatin hidrolizasyon ve (c) Nişasta hidrolizasyon testi sonuçları .....	85
3.18. Kromozomal DNA jel görüntüsü .....	86
3.19. RFLK01 kodlu izolatın PZR Optimizasyonu .....	87
3.20. RFLK03 kodlu izolatın PZR Optimizasyonu .....	88
3.21. RFLK06 kodlu izolatın PZR Optimizasyonu .....	88
3.22. RFLK07 kodlu izolatın PZR Optimizasyonu .....	88

3.23. RFLK08 kodlu izolatin PZR Optimizasyonu.....	89
3.24. RFLK12 kodlu izolatin PZR Optimizasyonu.....	89
3.25. RFLK01 izolatinın uzaklık matriksi.....	91
3.26. RFLK01 izolatinın soy ağacı görüntüsü .....	91
3.27. RFLK03 izolatinın uzaklık matriksi.....	92
3.28. RFLK03 izolatinın soy ağacı görüntüsü .....	92
3.29. RFLK06 izolatinın uzaklık matriksi.....	93
3.30. RFLK06 izolatinın soy ağacı görüntüsü .....	93
3.31. RFLK07 izolatinın uzaklık matriksi.....	94
3.32. RFLK07 izolatinın soy ağacı görüntüsü .....	94
3.33. RFLK08 izolatinın uzaklık matriksi.....	95
3.34. RFLK08 izolatinın soy ağacı görüntüsü .....	95
3.35. RFLK12 izolatinın uzaklık matriksi.....	96
3.36. RFLK12 izolatinın soy ağacı görüntüsü .....	96
3.37. AluI enzimi ile kesim reaksiyon sonucunun jel görüntüsü .....	99
3.38. HaeIII enzimi ile kesim reaksiyon sonucunun jel görüntüsü .....	99
3.39. TaqI enzimi ile kesim reaksiyon sonucunun jel görüntüsü .....	99
3.41. Tirozin Standart Grafiği .....	101
3.42. RFLK01( <i>Bacillus mojavensis</i> ) proteaz enziminin optimum üretildiği sıcaklık ve pH koşulları.....	102
3.43. RFLK03( <i>Bacillus thuringiensis</i> ) proteaz enziminin optimum üretildiği sıcaklık ve pH koşulları.....	103
3.44. RFLK06( <i>Bacillus mojavensis</i> ) proteaz enziminin optimum üretildiği sıcaklık ve pH koşulları.....	104
3.45. RFLK07( <i>Aeromonas salmonicida</i> ) proteaz enziminin optimum üretildiği sıcaklık ve pH koşulları .....	105
3.46. RFLK08( <i>Bacillus anthracis</i> ) proteaz enziminin optimum üretildiği sıcaklık ve pH koşulları .....	106
3.47. RFLK12( <i>Bacillus stratosphericus</i> ) proteaz enziminin optimum üretildiği sıcaklık ve pH koşulları .....	107
3.48. RFLK03 izolatu için; inokulum oranının proteaz üretimine etkisi .....	109
3.49. Enzim üretim besiyerinin proteaz üretimini teşvik yeteneği.....	110
3.50. Enzim üretim besiyerindeki inorganik bileşenlerin proteaz üretimine etkisi. 111	
3.51. Enzim üretim besiyerindeki organik bileşenlerin proteaz üretimine etkisi.....	111
3.52. Besiyerindeki tek azot kaynaklarının proteaz üretimine etkisi .....	113
3.53. Besiyerindeki tek karbon kaynaklarının proteaz üretimine etkisi.....	114



3.54. Farklı besiyerlerinin proteaz aktivitelerinin karşılaştırılması .....	114
3.55. Referans Suşların Proteaz Aktiviteleri ile Karşılaştırılması.....	115
3.56. Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi.....	116
3.57. pH'ın enzim aktivitesine etkisi.....	116
3.58. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi.....	118
3.59. Çeşitli kimyasalların Enzim Aktivitesine Etkisi .....	119
3.60. Organik Çözücülerin Enzim Aktivitesine Etkisi.....	119
3.61. İnhibitörlerin Enzim Aktivitesine Etkisi .....	120
3.62. Substrat Özgüllüğü.....	120
3.63. BSA Standart Grafiği .....	121
3.64. Kısmi saflaştırmanın proteaz aktivitesine etkisi .....	122
3.65. Kısmi saflaştırmanın protein miktarına etkisi .....	123
3.66. DEAE Sepharose İyon Değiştirici Kromatografi Sonrası Fraksiyonların Proteaz Aktiviteleri (U/mL).....	124
3.67. DEAE Sepharose İyon Değiştirici Kromatografi Sonrası Fraksiyonların Protein Miktarları (µg/mL) .....	125
3.68. SDS-PAGE analiz sonuçları .....	126

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

- EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit  
SDS: Sodyum dodesil sülfat  
CTAB: Setrimonyum bromür  
PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu  
ARDRA: Amplifiye edilmiş rDNA restriksiyon analizi  
TBE: Tris borik asit EDTA  
APS: Amonyum persülfat  
TEMED: N,N,N',N'- Tetrametil etilen diamin  
BLAST: Basic Local Alignment Search  
MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis  
BSA: Bovin serum albumin  
TCA: Trikloro asetik asit  
DEAE: Dietilaminoetil  
PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride  
DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen peroksit  
MgCl<sub>2</sub>: Magnezyum klorür  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Amonyum sülfat  
MgSO<sub>4</sub>: Magnezyum sülfat  
CaCl<sub>2</sub>: Kalsiyum klorür  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Potasyum dihidrojen fosfat

# 1.GİRİŞ

Proteazlar, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Nomenklatür Komitesinin (NC-IUBMB) Enzim Adlandırması ve MEROPS'un veri tabanına göre; peptit bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. 3. sırada yer alan hidrolazlar sınıfında bulunmaktadır. Peptidazlar aynı zamanda, proteazlar, proteinazlar ve proteolitik enzimler olarak bilinirler.

Bitkilerden ve hayvanlardan elde edilen proteaz enzimleri ile ilgili kayda değer bilgilere 1940'lı yıllarda ulaşılmıştır. O dönemde pepsin, kimotripsin ve papain enzimleri kristalize edilmiştir. Mikrobiyal proteazlar ile ilgili çalışmalara ise 1950'li yıllarda çalışılmaya başlanmıştır. Bu yıllarda Crewther ve Lennox *Aspergillus oryzae*'den alkali proteaz, Fukumoto ve Negoro *Bacillus amyloliquefaciens*'den nötral proteaz, Guntelberg ve Ottesen ise *Bacillus subtilis*'den alkali proteaz kristalize etmiştir. Böylece ilk mikrobiyal proteazlar kristalize formda elde edilmiştir. Mikrobiyal proteazlar ile ilgili çalışmaların giderek artmasıyla, mikroorganizmalardan sayısız proteazlar kristalize edilmeye başlanmış ve mikrobiyal proteazlar endüstriyel anlamda en önemli hidrolitik enzimlerden biri haline gelmiştir[1, 2]. Bu araştırmalar sonucunda mikrobiyal proteazların hücre metabolik işlemlerdeki rolünün yanı sıra ticari ve endüstriyel kullanımdaki rolleri de anlaşılmıştır. İlk olarak 1914 yılında deterjan katkı maddesi olarak kullanılmaya başlanan proteazlar, kullanım alanları giderek genişleyerek endüstriyel açıdan önemli bir konuma gelmişlerdir [3, 4].

## 1.1. Proteazların Sınıflandırılması

Proteazlar aktif oldukları pH aralığına (asit, nötr veya alkalın), belirli proteinleri hidrolize etme kabiliyeti (keratinaz, elastaz, kollajenaz, vs.) veya iyi karakterize edilmiş proteinazlara benzerliklerine (pepsin, tripsin, kimotripsin veya memeli katepsinleri) göre sınıflandırılmaktadır. Buna rağmen, sınıflandırılmaları yapı ve işlevlerindeki çeşitliliklerden dolayı enzim terminolojisinde çok fazla uyumlu

değildir. Bilinen enzim sayısının hızla artması ile enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması için sistematik bir yola ihtiyaç duyulmuştur. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği tarafından kurulan bir komisyon, yeni bir sınıflandırma sistemi geliştirmiştir [5, 6].

### **1.1.1. Proteazların Kaynaklarına Göre Sınıflandırılması**

Proteazlar fizyolojik işlevlerde gerekli oldukları için hemen hemen tüm yaşam formlarında bulunurlar. Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi geniş bir kaynak çeşitliliğine sahiptirler [7].

#### **1.1.1.1. Bitkisel Proteazlar**

Bitkisel proteazlar bitkilerin neredeyse tüm bölümlerinde bulunmaktadır; kök, gövde, yaprak, çiçek, meyve, tohum, lateks ve reçine. Bitkilerde genellikle sistein ve serin endoproteazlar bulunmaktadır. Aspartik proteazlar ve aminopeptidazlar nadiren bulunmaktadır [7]. Bitkisel proteazlara örnek olarak papain, bromelain ve keratinaz verilebilir. Yapılan araştırmalar sonucu içlerinde en iyi bilineni papaindir. Papain geleneksel bir bitki proteazdır ve uzun bir kullanım öyküsü vardır. Batı ve Orta Afrika ve Asya'nın (Tanzanya, Uganda, Zaire, Sri Lanka, Tayland ve Hindistan) subtropikal bölgelerinde yetişen *Carica papaya* meyvelerinin lateksinden çıkarılır. Papain, pH 5.0- 9.0 arasında aktiftir ve 80-90 °C'ye kadar dengelidir. Endüstride süt pıhtılaştırıcı ve et yumuşatıcı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca ilaç, deterjan, veterinerlik ve gıda endüstrisinde başka kullanım alanlarına da sahiptir [6, 7]. Bromelain ananas (*Ananas comosus*) kökünden ve suyundan elde edilir. Enzim, sistein proteazı olarak karakterize edilir ve pH 5.0-9.0 arasında aktiftir. İnaktivasyon sıcaklığı 70 °C'dir. Keratinazlar bitkilerin bazı grupları tarafından üretilir. Saç ve yünün sindirimi, lisin gibi esansiyel amino asitlerin üretimi ve atık su sistemlerinin tıkanmasının önlenmesi açısından önemlidir.

Bitkiler her ne kadar yüksek oranda proteaz enzimi üretiyor olsa da endüstriyel olarak çoğunlukla mikroorganizmalardan elde edilen proteazlar tercih edilmektedir. Bunun nedeni; bitkilerden elde edilen enzimlerin aktivitesinin bitkinin kaynağına, büyüme için gerekli iklim koşullarına ve ekstraksiyon ve saflaştırmada kullanılan yöntemlere bağlı olarak değişmesidir. Ayrıca üretimleri zaman alıcı bir süreçtir. Örneğin, bitkinin meyvesi sağlıklı değil ise elde edilen enzimin aktivitesi de düşmektedir.

### **1.1.1.2. Hayvansal Proteazlar**

Hayvansal kökenli proteazlara örnek olarak; pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve rennin verilebilir. Pepsin hemen hemen tüm omurgalıların midelerinde bulunan asidik bir proteazdır. Pepsin, bir aspartik proteazdır ve HIV-1'in olgunlaşmasından sorumlu olan insan immün yetmezlik virüsü tip 1 (HIV-1) proteazını andırır. pH 1.0-2.0 arasında optimum etkinlik gösterir. pH 6.0 üzerinde inaktive edilir. Enzim, iki hidrofobik amino asit arasındaki peptid bağlarının hidrolizini katalize eder. Tripsinbesin proteinlerinin hidrolizinden sorumlu ince bağırsak sindirim enzimidir. Bir serin proteaz olup peptid bağlarını karboksil gruplarındaki lisin ve arginin kalıntılarının hidrolizine katkıda bulunur. Proteaz inhibitörlerinin böcek bağırsağında bulunan enzimi inhibe etme kabiliyetine dayanarak, bu enzim böcek zararlılarının biyolojik kontrolü için bir hedef olarak gösterilmektedir. Tripsinin, gıda endüstrisinde sınırlı uygulamaları vardır, çünkü tripsin ile elde edilen protein hidrolizatlarının tadı acı olmaktadır. Kimotripsin hayvan pankreatik özünde bulunmaktadır. Pankreasta kimotripsinojen formunda depolanır, çok adımlı bir süreçte tripsin ile aktive edilir. Peptid bağlarının karboksil grubundaki üç aromatik amino asidi; fenilalanin, tirozin veya triptofan hidrolizi için spesifiktir. Süt proteini hidrolizatlarının deaerjenleştirilmesinde yaygın olarak kullanılır. Rennin(rennin, kimozin) tüm emziren memelilerinin midelerinde inaktifprorennin olarak üretilen bir pepsin benzeri proteazdır. Pepsin'in etkisiyle veya otokataliz ile aktive edilir. Enzimin özel niteliği, k-kazeinde bulunan tek bir peptid bağını hidrolize etme özgülüğünden kaynaklanmaktadır. Süt endüstrisinde yoğun olarak, iyi aromalı, dengeli bir peynir üretmek için kullanılır. Hayvansal proteazlar toplu miktarlarda saf

bir şekilde hazırlanırlar. Ancak, bu enzimlerin üretimi yaşamı sona ermiş hayvanların kullanılabilirliğine bağlı olduğu için endüstride hayvansal proteazlar yerine mikrobiyal proteazlar tercih edilmektedir [6].

### 1.1.1.3. Mikrobiyal Proteazlar

Endüstriyel üretimde mikroorganizmalardan üretilen proteaz enzimleri tercih edilmektedir. Bunun nedeni; bitki ve hayvansal proteazlarının mevcut dünya taleplerini karşılayamaması, mikroorganizmaların jenerasyon sürelerinin çok kısa olması ve fazla miktarda elde edilebilmeleridir. Ayrıca mikroorganizmaların uygun bir kültür ortamında üretilmelerinin mümkün olması onları daha ucuz kılmaktadır. Mikroorganizmalar genetik manipülasyonlara duyarlı oldukları için ve hemen hemen tüm özellikleri istenen yönde değiştirilebildiği için biyoteknolojik uygulamalara uygundur. Enzimlerinin bitkisel ve hayvansal proteazlara göre daha saf elde edilebilmeleri ve katalitik aktivitelerinin daha yüksek olması tercih edilebilir diğer sebepleridir [7]. Yapılan araştırmalarda, *Bacillus sphaericus* NRC 24 tarafından süt pıhtılaştırma enzimi (MCE) üretilmiştir. MCE, aseton ile fraksiyonel çöktürme, daha sonra DEAE Sephadex A 25 ve son olarak Sephadex G100 kolonu kullanılarak iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Enzim optimum pH 6.5, optimum 55 °C'de aktive olmaktadır [8]. *Bacillus subtilis*'in mutasyona uğramış suşundan proteaz enzimi elde edilmiştir. Bu enzim Kanada cheddar peyniri üretiminde kullanılmaktadır [9]. *Bacillus cereus* kültürünün süpernatantından kısmen saflaştırılarak mikrobiyal rennet enzimi (süt pıhtılaştırma proteaz enzimi) elde edilmiştir [9]. *Bacillus firmus* MTCC 7728'den alkalik proteaz izole edilmiştir. Enzim maksimum aktiviteyi pH 9.0 ve 40°C'de göstermektedir. Maksimum proteolitik aktivite durgunluk fazına ulaşıldığında 48 saatlik büyümeden sonra gözlemlenmiştir [10]. *Bacillus badius* MTCC 7727'nin kültür ortamından termotolerant yeni bir asidik proteaz elde edilmiştir. Bu enzim, pH 5.0 ve 40°C sıcaklıkta optimum aktivite sergilemektedir [11]. *Bacillus subtilis*'ten kısmi saflaştırma ile nötral bir proteaz elde edilmiştir. Proteaz üretimi için optimum büyüme süresi 30 saat, optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 40°C ve 7.0 (nötr) olarak bulunmuştur. Enzim amonyum sülfat çöktürmesi ve Sephadex G 200 ile kısmen saflaştırılmıştır [12].

Balık unundan *Bacillus subtilis* FP-133'ün halotolerant bir suşu izole edilmiştir. Bu suştan hücre içi proteaz üretilmiştir. Enzimin moleküler kütlesi yaklaşık 59 kDa'dır ve enzim (protein), her biri 14 kDa'lık molekül kütlesi olan dört altbirimden oluşmaktadır [13]. Endüstriyel atık ürünleri ve mutfak atıkları (örn: yani hardal yağı pastası, buğday kepeği, pirinç kepeği, muz yaprakları, soyulmuş patates ve çay yaprakları)ndan katı fermantasyon ile *Bacillus subtilis* DM-04'ün termofilik bir suşu izole edilmiştir. Bu suştan üretilen proteaz enzimi, alkali koşullar altında 40°C'de optimum aktivite göstermiştir [14]. *Bacillus sp.* HS 08'den termofilik nötral proteaz edilmiştir. Enzimin optimum pH ve sıcaklık sırasıyla pH 7.5 ve 37 °C'dir. *Bacillus sp.* (SBP-29)' den termofilik bir nötral proteaz üretilmiştir. Bu enzimin moleküler kütlesi 30.9 kDa ve optimum pH ve sıcaklık sırasıyla, pH 7.5 ve 65°C'dir. Enzim aktivitesi için en iyi substrat azokazein bulunmuştur [15]. *Bacillus sp.* (SBP-29) tarafından üretilen proteazın özellikleri incelenmiştir. Substrat olarak soya fasulyesi unu kullanılmasıyla maksimum proteaz etkinliği elde edilmiştir; Enzim 60 °C'de optimum sıcaklığa sahiptir ve pH 9.5 optimum değere sahiptir [16]. *Bacillus sp.* HR-08.den yüzey aktif maddeler, çamaşır deterjanı ve organik solvent dirençli alkalın proteaz elde edilmiştir. Zimogram analizi sonucu 5 hücre dışı proteaz elde edilmiştir. Enzim amonyum sülfat çökeltmesi, DEAE sefaroze iyon değişim kromatografisi ve Sefakril S 200jel filtrasyon ile kısmi saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış proteazın optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 60°C ve pH10.0'dur. Enzimin moleküler kütlesi 29 kDa'dır [17]. *Bacillus circulans* BM 15 suşundan alkalın proteaz elde edilmiştir. Bu enzim, pH 7.0 ve 40°C'de optimum aktivite göstermiştir. Moleküler kütlesi yaklaşık 30 kDa'dır [18]. *Bacillus circulans'tan* elde edilen bir alkalın serin proteaz, deri işleme ve deterjan endüstrilerinde dayanıklılığı ve çevre dostu uygulama potansiyeli açısından detaylandırılmıştır. Saflaştırılmış enzimin moleküler kütlesi yaklaşık 39.5 kDa'dır. Alkali pH ortamında ve 70 °C'de optimum aktivite göstermiştir [19]. *Bacillus licheniformis* MIR 29'dan termostabil alkalın proteaz saflaştırılmıştır [20]. *Bacillus licheniformis* NH1den, deterjan açısından kararlı ve termostabil alkalın serin proteaz elde edilmiştir. Proteaz 68 °C ve pH 10.5'ta optimum aktiviteye sahiptir [21]. Ham yağ kontaminantından izole edilen *Bacillus licheniformis* YP1A 'den yeni bir organik çözücülere stabil alkalın proteaz elde edilmiştir. Bu enzim, DMSO, DMF ve sikloheksan gibi %50 (V / V) organik çözücülerin mevcudiyetinde 1 saat boyunca 40 °C'de ön inkübe edildikten sonra ilk

etkinliğinin % 95'inden fazlasını muhafaza etmiştir [22]. Geleneksel olarak fermente edilmiş Afrika locust fasulyesinden proteaz üretimi için *Bacillus licheniformis* LBBL- 11 izole edilmiştir. Optimum koşulları pH 8.0'dır, ve 60 °C'dir [23]. *Bacillus'un pumilus* MK6-5'den termostabil alkalın proteaz üretilmiştir. Bu enzim amonyum sülfat çökeltme, iyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. PMSF tarafından inhibe edilmesiyle proteazın serin proteaza ait olduğunu ileri sürülmüştür [24]. *Bacillus pumilus* CBS'den düşük molekül ağırlıklı (34.60 kDa) alkalın serin proteaz elde edilmiştir. Enzim amonyum sülfat çökeltmesi ve jel filtrasyon kullanılarak saflaştırılmıştır. PMSF ve DFP tarafından güçlü bir şekilde engellendiğinden, serin proteaz sınıfına ait olduğu gösterilmiştir. Enzimin optimum 65 °C ve pH 10.6'da aktivite göstermiştir [25]. *Bacillus cereus*'tan hücre dışı bir alkalın proteaz üretilmiştir. Enzimin ticari çamaşır deterjanı için kullanıma uygun olduğu tespit edilmiştir. Enzimin optimum koşulları pH 10.5 ve 50 °C'dir. Kazeine karşı maksimum aktivite göstermiştir ve enzimin moleküler kütlesi 28 kDa'dır [26]. Buffalo postundan *Bacillus cereus* MCM B-326 izole edilmiştir. Ürettiği hücre dışı proteaz karakterize edilmiştir. Maksimum proteaz üretimi, nişasta soya fasulyesi unu ortamı kullanılarak, pH 9.0 ve 30 °C'de gerçekleşmiştir. Bu enzim deri işleme ünitesinde dehairing işleminde kullanılmaktadır [27]. *Bacillus mojavensis* A21 deniz suyu örneğinden izole edilmiştir. Üretilen proteaz enziminin ağartıcılara karşı stabil olduğu gösterilmiştir. Alkalın proteaz, aseton çökeltme, Sephadex G-75 jel filtrasyonu ve CM-Sefaroz iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış proteazın molekül ağırlığı 20 kDa'dır. Enzim pH 7.0'dan pH 13.0'a kadar geniş bir pH aralığında son derece aktiftir ve optimum pH değeri 8.5'dir [28]. *Pseudomonas aeruginosa* PD 100'den proteaz enzimi elde edilmiştir. Proteazın saflaştırılması için amonyum sülfat çökeltmesi, Sephadex G50 filtrasyonu ve CM sephadex kromatografisi kullanılmıştır. Bu proteaz yaklaşık 36.00 kDa moleküler kütleye sahiptir. Optimum koşulları 60 °C'de ve pH 8.0'dır. Deterjan ve deri endüstrisinde kullanılan atık arıtımı için potansiyel bir uygulama bulmaktadır [29]. *Pseudomonas sp.* RAJR 044 hücre dışı proteaz üretilmiştir. SDS-PAGE jelinde tek bir homojen bant 14.4 kDa görülmüştür[30]. *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7926'den çözücüye dayanıklı, termostabil ve alkalın metaloproteaz elde edilmiştir. Proteaz 25-65 °C ve pH 6.0-11.0 aktivitesini korumaktadır. Molekül kütlesi 35 kDa'dır. Saflaştırılmış metaloproteaz, anti-



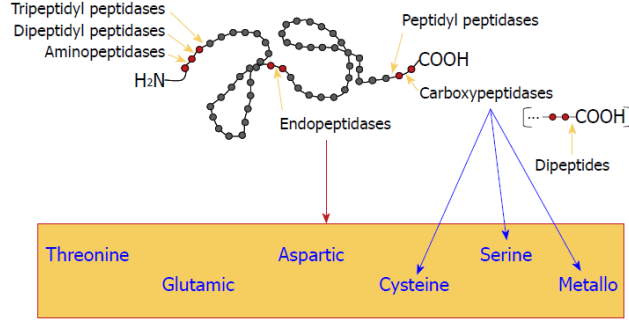
stafilokoksik aktivite ve gümüşün geri kazanımı için X-ışını filminin işlenmesinde endüstriyel ilgi göstermiştir [31]. Tolüen ve sikloheksan ile zenginleştirilen ham petrol ile kirlenmiş örneklerden 43 bakteri türü izole edilmiştir. Bunlardan 10 tanesi yüksek proteaz aktivitesi göstermiştir. *Pseudomonas aeruginosa* PT 121 olarak tanımlanan suş en yüksek enzim aktivitesini göstermiştir. % 50 dimetilsülfoksit varlığında aspartam öncülü Cbz-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> sentezi için bir katalizör görevi görmektedir [32]. *Myxococcus xanthus* DK 1622. 'den elde edilen hücre dışı proteazın yüksek proteolitik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bu enzimin pepstatinin inhibisyonu temelinde aspartik proteaz ailesine ait olduğu saptanmıştır [33]. *Streptomyces gulbergensis*'den alkalen proteaz tanımlanmıştır. Saflaştırılmış enzim, optimum aktiviteyi pH 9.0 ve 45°C sıcaklıkta göstermektedir. Bu enzim cerrahi aletlerin yıkanmasında uygulanmaktadır [34]. *Enterococcus faecalis* TUA 2495'den süt pıhtılaştırma enzimi üretilmiştir. Enziminin moleküler kütlesi 35 kDa'dur [35]. İnek etinden *Listeria monocytogenes* izole edilmiştir. Optimum enzim aktivitesi pH 9.0 ve 30 °C'dir. Kazein, jelatin ve yumurta albüminine karşı proteolitik etkinlik göstermiştir [36]. Deniz bakterisi olan *Teredinobacter turnike*'den yeni bir hücre dışı alkalen proteaz enzimi elde edilmiştir. Bu proteazın maksimum enzim aktivitesi için optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 50°C ve pH9.0 olup molekül kütlesi 40 kDa'dır [37]. *Streptomyces griseus*'dan düşük molekül ağırlıklı (18.4 kDa) bir glutamik asit spesifik proteaz tanımlanmıştır [38]. *Thermus aquaticus* YT-1'in kültür ortamından, aqualysin I olarak adlandırılan yeni termostabil ve deterjan dengeli subtilisin tanımlanmaktadır. Bu enzim, mono-S-kolonlu FPLC sistemi uygulanarak saflaştırılmıştır. Üre ve Tween 20 varlığında stabiliteyi korumaktadır[39]. Arjantin şarapından laktik asit bakterisi (*Oenococcus oeni*) izole edilmiştir. Üretilen aspartik proteaz amonyum sülfat çökeltmesi ve sefadex G-100 filtreleme kullanarak saflaştırılmıştır. Moleküler kütlesi 33.10 ve 17.00 kDa olan iki özdeş altbirimden meydana gelmektedir [40]. Kümes hayvanlarının tüylerinde büyüyen *Chrysobacterium sp.* 'den keratinaz tanımlanmıştır [41]. *Microbacterium sp.* Kr10'dan keratinolitik metalloproteaz elde edilmiştir. Enzim Sephadex G-100 ve Q-Sepharose kolonu kullanılarak saflaştırılmıştır. Enzimin moleküler kütlesi 42 kDa'dır. Enzim, pH 7.5 ve 50 °C'de aktive olmaktadır [42].

## 1.1.2. ProteazlarınKatalizlediği Reaksiyon Tipine Göre Sınıflandırılması

Bütün proteazlar esasında aynı reaksiyonu katalizlemektedir; peptit bağlarının hidrolizi. Fakat proteazlar bu peptit bağlarının substrattaki konumuna, kesilecek olan peptit bağının çevresindeki amino asit kalıntılarına ve substratların bilinmeyen diğer karakteristik özelliklerine göre seçicilik göstermektedir [5, 43, 44]. Proteazların katalizledikleri reaksiyon tiplerine göre sınıflandırılması Çizelge 1.1.'de gösterildi.

**Çizelge 1.1.Reaksiyon Tipine Göre Proteazlar**

Proteazlar	EC Code	Mekanizması	Şekil
Ekzopeptidaz	3.4.11 – 3.4.19	Zincirin amino(- NH <sub>2</sub> ) ya da karboksil(- COOH ) ucundaki peptit bağlarını hidroliz ederler.	
Aminopeptidaz	3.4.11	Zincirin amino ucundaki peptit bağlarını hidroliz ederler.	$\begin{array}{c} \downarrow\downarrow\downarrow \\ \text{NH}_2\text{-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-} \\ \text{o-COOH} \\ \downarrow \end{array}$
Dipeptidaz	3.4.13	Zincirdeki spesifik dipeptitleri hidroliz ederler.	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{NH}_2\text{-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-} \\ \text{o-COOH} \end{array}$
Dipeptidil peptidaz	3.4.14	Zincirin amino ucundaki ikinci peptit bağını hidroliz ederler.	$\begin{array}{c} \downarrow \downarrow \\ \text{NH}_2\text{-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-} \\ \text{o-COOH} \\ \downarrow \end{array}$
Tripeptidil peptidaz	3.4.14	Zincirin amino ucundaki üçüncü peptit bağını hidroliz ederler.	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{NH}_2\text{-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-} \\ \text{o-COOH} \end{array}$
Peptidil dipeptidaz	3.4.15	Zincirin karboksi uçta bulunan son peptit bağından bir önceki peptid bağını hidroliz ederler.	$\begin{array}{c} \text{NH}_2\text{-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-} \\ \downarrow \\ \text{-o-o-COOH} \end{array}$
Karboksipeptidaz	3.4.16 – 3.4.18	Zincirin karboksi ucundaki peptit bağlarını hidroliz ederler.	$\begin{array}{c} \text{NH}_2\text{-o-o-o-o-o-o-o-} \\ \downarrow\downarrow\downarrow \\ \text{o-o-o-o-o-o-COOH} \end{array}$
Omega tip proteaz	3.4.19	Teminal uçların yakınındaki izopeptit bağlarını hidroliz ederler.	$\downarrow$
Endopeptidaz	3.4.21 – 3.4.24	Zincirdeki iç alfa-peptid bağlarını hidrolize ederler.	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{NH}_2\text{-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-} \\ \text{o-COOH} \end{array}$



Şekil 1.1. Proteazların reaksiyon tipine göre sınıflandırılması[43].

### 1.1.2.1.Ekzopeptidazlar

International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) numaralandırmasına göre ekzopeptidazlar (E.C 3.4.11-19) olarak belirlenmiştir. Polipeptit zincirinin amino (- NH<sub>2</sub>) ya da karboksil (- COOH) ucundaki peptit bağlarını hidroliz ederler. Proteinin amino ucundaki peptit bağlarını hidroliz eden ekzopeptidazlar, aminopeptidazlar; karboksil ucundaki peptit bağlarını hidroliz edenler ise karboksipeptidazlar olarak adlandırılırlar. Karboksi proteazlar, katalitik bölgesinde bulunan aminoasit kalıntısına göre, serin, metallo ve sistein karboksi proteazlar olarak 3'e ayrılırlar. Yapılan araştırmalarda; *Saccharomyces* spp. 'den üretilen metallo karboksipeptidazlar ve *Pseudomonas* spp.'dan üretilen metallo karboksipeptidazların aktivite göstermesi için Zn<sup>+2</sup> veya Co<sup>+2</sup> metal iyonunun gerekli olduğu rapor edilmiştir [45].

#### 1.1.2.1.1. Amino Proteazlar

Aminopeptidazlar, polipeptit zincirinin serbest N ucunda hareket ederek bir amino asit kalıntısı, bir dipeptit veya bir tripeptidi serbest bırakır. Yapılan araştırmalarda *Bacillus licheniformis*'den elde edilen aminopeptidaz'ın moleküler ağırlığı 34.00 kDa olarak bulunmuştur. Etkinliği Co<sup>+2</sup> iyonlarıyla artmaktadır. Benzer şekilde, *Bacillus* cinsinin başka bir türü, örneğin *B. Stearothermophilus*'dan, aminopeptidaz üretilmiştir. Molekül kütlesi yaklaşık 80 ila 100 kDa olan iki alt birimden

oluşmaktadır.  $Zn^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  veya  $Co^{+2}$  iyonları ile aktive olmaktadır [46]. Genel olarak, aminopeptidazlar hücre içi enzimlerdir, ancak *Aspergillus oryzae* tarafından üretilen bir hücre dışı aminopeptidaz hakkında rapor bulunmaktadır [47]. Bu sebepten ticari ürün olarak az bulunmaktadır [6, 7].

#### **1.1.2.1.2. Karboksipeptidazlar**

Karboksipeptidazlar polipeptit zincirinin C terminallerinde hareket ederek tek bir amino asidi veya bir dipeptid serbest bırakır. Karboksi proteazlar, katalitik bölgenin yapısına göre, serin karboksiproteazlar, metallo karboksiproteazlar ve sistein karboksiproteazlar olarak ayrılmaktadırlar.

#### **1.1.2.2. Omega peptidazlar**

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nin Adlandırma Komitesi tarafından EC. 3.4.19 altalt sınıfına yerleştirilmişlerdir. Omega peptidaz yapısı, substratta serbest bir N-terminal ya da C-terminal ucuna ihtiyaç duymayan peptidaz ailesidir. Endopeptidazlardan farkı; yüklü bir terminal gruba ihtiyaç duymamalarına rağmen, genellikle terminallerin yakınında aktivite göstermeleridir.

#### **1.1.2.3. Endopeptidazlar**

Endopeptidazlar bir polipeptid zincirindeki iç alfa-peptid bağlarını hidrolize ederler. Amino veya karboksil uçlarda bulunan peptid bağlarının hidrolizinden sorumlu değildirler. Bazı endopeptidazlar yalnızca proteinlerden daha hüçük yapıda olan substratlara etki edebilir. Bunlara oligoproteaz denilmektedir. Örnek olarak timet oligopeptidaz verilebilir. Endopeptidazlar, gıda proteinlerinin sindirimini başlatır ve ekzopeptidazların substratları olan yeni N- ve C-terminusunun oluşumunu sağlarlar [5]. Endopeptidazlar, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (NC-IUBMB) tarafından ikili adlandırmaya göre; EC 3.4.21-26 alt sınıflarına tahsis

edilmiştir. Sırasıyla bu alt sınıflar serin, sistein, aspartik, metallo, ve treonin ve glutamik tip endopeptidazlardır [48]. Glutamik peptidazlar 2005 yılında tanımlanmıştır ve katalitik mekanizmaları hakkında araştırmalar devam edilmekle birlikte aktivitelerinde bir Glu / Gln katalitik kalıntısı kullandığı belirlenmiştir[49].

### **1.1.3. Proteazların Katalizlediği Bölgenin Yapısına Göre Sınıflandırılması**

Hartley, 1960'lı yıllarda tatmin edici bir sınıflandırma sistemi geliştirilerek proteazların kullanışlı bir şekilde katalitik tipine göre ayrılmasını sağlamıştır. Buna göre proteazlar; aktif bölgelerindeki ana katalitik amino asit kalıntısının varlığına göre: serin proteinazlar; sistein proteinazlar, aspartik proteinazlar ve metalloproteazlar olmak üzere 4 ana gruba ayrılmıştır [5].

#### **1.1.3.1. Serin Proteazlar**

Serin proteazlar alkali pH koşullarında aktifleşmeleri ve bu pH koşullarında stabilitelelerini korumaları nedeniyle endüstride en yaygın kullanılan enzimlerdir. Ekzopeptidazlar, endopeptidaz, oligopeptidaz ve omega peptidaz gruplarında serin proteazlar bulunmaktadır. Bu enzimler, karboksil kısmı tirozin, fenilalanin veya lösin kalıntısı içeren bir peptid bağı hidroliz eder. Üç amino asitten oluşan ortak bir katalitik triadtan oluşan bir mekanizmada; serin (nükleofil), aspartat (elektrofil) ve histidin (baz) gibi davranır [7].

Serin proteazlar 3,4-dikloroizokuminal (3,4-DCI), diizopropilflorofosfat (DFP), Fenilmetilsülfonil fluorür (PMSF) ve tosil-L-lisin klorometil keton (TLCK) ile geri döndürülemez bir şekilde inhibe olurlar. Esterolitik ve amidaz aktiviteleri ile geniş substrat özelliklerine sahiptirler.

Serin alkalın proteazlar; serin proteazlarının en büyük alt grubunu temsil ederler. Molekül kütleleri 15-30 kDa aralığındadır. Serin alkali proteazlar *Arthrobacter*, *Streptomyces* ve *Flavobacterium* sp. gibi çeşitli bakteriler tarafından üretilmesine

rağmen, *Bacillus* sp. tarafından üretilen subtilisinler serin proteazların en iyi bilinenler enzimleridir [50]. Subtilisin; *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar tarafından üretilen, serin proteazlarının en büyük ikinci familyasını temsil etmektedir. Subtilisin Carlsberg ve subtilisin Novo olmak üzere iki farklı alkalın proteaz tipi tanımlanmıştır. *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen Subtilisin Carlsberg, 1947'de Linderstrom, Lang ve Ottesen tarafından Carlsberg laboratuvarında keşfedilmiştir [51]. Subtilisin Novo veya BPN9, *Bacillus Amiloliquefaciens* tarafından üretilmektedir. Her iki enzimde deterjanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır [2, 7, 52-54].

### 1.1.3.2.Sistein Proteazlar

Sistein(tiol) proteazlar peptit, amid, ester ve tiol esterlerin hidrolizini katalizlerler. Hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunurlar. Tüm sistein proteazların aktivitesi, sistein ve histidin içeren bir katalitik dyad'a bağlıdır [7, 54]. Nötr pH optimumları vardır, ancak bunlardan birkaçı, örneğin, lizozom proteazları, asidik pH değerinde azami aktiftir. Moleküler ağırlıkları 21-30kDa'dur [5]. PCMB(p-chloromercuribenzoic acid) gibi sulfhidril maddelere karşı duyarlı iken DFP(Diisopropyl fluorophosphate ) ve metal şelat ajanlarından etkilenmezler. Sistein proteazlar hem endopeptidaz (papain, bromelain, fisin, cathepsin) hem ekzopeptidaz (cathepsin X, karboksipeptidaz B) olarak işlev görebilir.

Papain, sistein proteazının bilinen en iyi örneğidir. İlk kristalografik yapısı belirlenen sistein proteazdır. İlk kez 1879 yılında *Carica papaya*'nın meyvesinden izole edilmiştir. 3 disülfid köprüsü içeren 212 aminoasitten oluşmuştur. Moleküler ağırlığı 23,4 kDa'dur. Papainin enzimatik aktivitesi pH 3.5-8.0 arası aktive olan Cys25 and His159 kalıntılarının oluşturduğu katalitik ikili ile meydana gelmektedir. Katalitik aktivite için enzimin tiyol grubu indirgenmiş formda olmak zorundadır. Yani aktivasyon için oldukça indirgeyici ve asidik bir ortam gerekmektedir [5]. Papain dışında, ananasın kökünün ve meyvesinin sularında bulunan bir proteaz karışımı olan bromelain, *Ficus glabrata*'nın kurutulmuş lateksinden izole edilen fisin ve lizozomal proteinazlar olan katepsinler de sistein proteazlara diğer örneklerdir. Lizozomal

katepsinler, hücresel protein yıkımının dahil olduğu bir kaç fizyolojik süreçten sorumlu olan önemli bir grup enzimlerdir. Katepsinler asidik pH ortamında aktifken, bazıları da nötral pH ortamında aktiftirler. Osteoporoz, romatoid artrit, damar sertliği, kanser, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar gibi pek çok hastalık için ilaç hedeflerinde umut vericidir. Kaspazlar ise, programlı hücre ölümünü düzenleyen apoptotik düzeneklerin önemli bir unsurudur [5].

### 1.1.3.3. Aspartik Proteazlar

Asidik proteazlar olarak bilinen aspartik proteazlar, katalitik işlevleri için aspartik asit kalıntılarına bağımlıdır. Aspartik proteazlar genellikle pepstatin tarafından inhibe edilmektedir. Pepstatin genel olarak aspartik proteazlara etkili olsada çeşitli enzimler arasındaki etkileri farklıdır. Örneğin; Pepsin A pepstatin tarafından tamamen inhibe olurken, kimozin ve gastrisin kısmen inhibe olmaktadır. Tam inhibe olması için pepstatinin molaritesi artırılmak zorundadır. Diğer inhibitör ise pepsin A'ya karşı etkili Ascaris'den elde edilen potato cathepsin D inhibitörüdür [55]. Ayrıca, bakır iyonlarının varlığında diazoasetil-DL-norlösin metil ester (DAN) ve 1,2-epoksi-3- (p-nitrofenoksi) propan (EPNP) gibi diazoketon bileşiklerine duyarlıdır [56].

Mikrobiyal aspartik proteazlar, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Neurospora* tarafından üretilen pepsin benzeri enzimler ve *Endothia* ve *Mucor* sp. tarafından üretilen rennin benzeri enzimler olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Birçok fungal asit proteazının, ilginç bir özelliği, sığır tripsinogenini aktive edebilmesidir [57, 58]. Pepsin ve rennin de dahil olmak üzere memeli aspartik proteazları, hepsinin ortak bir atasal genden evrimleştiğini düşündürmektedir [59].

Aspartik proteazlar genel olarak, 32-36 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahip, 320-360 amino asit kalıntısı içeren tek bir peptid zincirinden oluşurlar [5]. Geniş bir yelpazede aktivite ve özgünlük sergilemektedirler. Bunlara örnek olarak; memelilerin sindirim sisteminde görevli pepsin A, patojen ve maya virülansına karşı savunmada görevli candidapepsin, meme kanseri metastazında görevli kathepsin D, polen-pistil etkileşimlerinde görevli kardosin A, kan kontrollerinde görevli rennin, hemoglobin

bozunması ve HIV proteinlerinin olgunlaşmasında görevli retropepsinler verilebilir [5][60]. Diğer aspartik proteazlara örnek olarak kimozen verilebilir. Kimozen, (EC 3.4.23.4) buzağuların abomasumunda bulunan gastrik sindirim aspartik peptidazdır. Doğal fonksiyonu buzağı midesinde bulunan sütün koagülasyonundan sorumlu olmaktır. Böylece süt kolay sindirilebilir hale gelmektedir [61]. Hücre içinde preprokimozen olarak sentezlenmektedir. Pepsin ile, Phe42-Gly43 peptid bağından parçalanarak, pH 5.0'in altında, otokatalik aktivasyon ile, kimozene dönüşür. Optimum sıcaklığı 41°C'dir. 20°C'nin altında ve 50°C'nin üzerinde pıhtılaştırma gücü çok azdır [62, 63].

#### 1.1.3.4. Metalloproteazlar

Metalloproteazlar, katalitik proteazların en çeşitlisidir [64]. Bunlara, yüksek organizmalardan gelen kollajenazlar, yılan zehirlenmelerinden kaynaklanan hemorajik toksinler ve bakterilerden gelen termolizin gibi çeşitli kökenden enzimler dahildir [65, 66]. Metalloproteazlar, faaliyetleri için iki değerlikli bir metal iyonu gerekliliği ile karakterizedir. Metalloproteazlar iki değerlikli metal iyonları ile aktive edilen bir su molekülünün nükleofilik saldırısıyla peptid bağlarını hidrolize eden kapsamlı bir hidrolaz sınıfını temsil etmektedir. Çoğu metalloproteazın karakteristik özelliği katalitik bir çinko(Zn) iyonudur. Bununla birlikte, bazı enzimlerde bu fonksiyon, manganez(Mn), kobalt(Co), nikel(Ni) veya bakır(Cu) iyonlarıyla yapılmaktadır. Bazı metalloproteazlarda iki metal iyonu birlikte katalitik olarak etkimektedir. Metalloproteazların hepsi, EDTA gibi kenetleme maddeleri tarafından inhibe olmaktadır, ancak sülfhidril ajanlar veya DFP tarafından baskılanmazlar. Yapılan çalışmalarda; mantarlardan birkaç metalloproteaz enziminin üretildiği ve bu enzimlerin çinko(Zn) ile aktivite oldukları bildirilmiştir [67].

Endüstriyel uygulamalarda kullanılan tek metalloproteaz termolizindir. Termolizin *Bacillus thermoproteolyticus* tarafından üretilen bir hücre dışı metalloendoproteindir. Üç boyutlu yapısı çözülmüştür (Matthews ve diğerleri, 1972). Disülfid köprülerini içermeyen 34 kDa ağırlığında tek bir peptiddir. Proteinin iki katlı lobu arasında bulunan Zn atomu esansiyeldir ve dört adet Ca atomu proteinin termostabilitesini sağlamaktadır. 80°C'de yarı ömrü 1 saat olan termolizin oldukça



stabil bir proteazdır. Proteazların katalizlediği bölgenin kimyasal yapısına göre sınıflandırılmaları Çizelge 1.2’de özetlendi.

**Çizelge1.2.** Proteazların katalizlediği bölgenin yapısına göre sınıflandırılmaları

Proteaz Sınıfı	Serin	Sistein	Aspartik	Metallo
Eski isim	Serin	Tiol	Karboksil	Metallo
Enzim	EC 3.4.21	EC 3.4.22	EC 3.4.23	EC 3.4.24
Numaralandırılması				
Aktif site bileşeni	serin	sistein	aspartik	Zn <sup>+2</sup>
pH aralığı	7-9	3-7	2-6	5-9
Sıcaklık (°C)	20-80	25-70	40-70	40-60
Moleküler Ağırlık(kDa)	20-135	20-65	30-60	20-60
İnhibitör	PMSF, DCI	E-64, Iodoacetate	Pepstatin	EDTA
Lokasyon	Hücre içi - dışı	Lizozom	Lizozom	Hücre içi -dışı
Örnekler	Elastin, Plasmin	Cathepsins B & L	CathepsinD	Gelatinase

## 1.2. Proteazların Fizyolojik İşlevleri

Proteazlar kompleks fizyolojik fonksiyonları yerine getirirler. Neredeyse tüm canlı organizmalarda bulunmaları onların yaşamsal işlevlerin yerine getirilmesindeki önemlerini göstermektedir. Proteazlar, protein katabolizması, kan pıhtılaşması, hücre büyümesi ve göçü, doku düzenlemesi gibi birçok fizyolojik süreçte ve inflamasyon, tümör büyümesi ve metastazı, zimojenlerin aktivasyonu, hormonların salınması, farmakolojik olarak aktif peptidlerin salgılanması ve membranlardan salgı proteinlerinin taşınması gibi patolojik süreçte de kritik bir rol oynamaktadırlar [6, 7]. Proteazların bu işlevleri yerine getirme mekanizmaları hakkında bilgiler çok sınırlı olmakla birlikte bu konudaki araştırmalar hala devam etmektedir. Proteazların bazı fizyolojik görevleri şunlardır:

### 1.2.1. Protein Sindirimi

Peptid bağlarının hidrolize edilmesi ve amino asitlere kadar ayrılması olayına protein sindirimi denir. Protein sindirimi midede başlamaktadır. Burada HCl ve pepsinin otokataliziyle pepsinojen pepsine aktifleşir. Pepsin bir endopeptidazdır. Proteinler pepsinin etkisi ile az miktar aminoasit ve polipeptitlere ayrılırlar. İnce bağırsakta tripsinojen; enterokinaz ve tripsinin otokatalizi ile, tripsine aktifleşir. Tripsin ise inaktif olan kimotripsinojeni aktifleştirerek kimotripsine dönüştürür. Tripsin ve kimotripsin bir endopeptidazdır. Polipeptidler bir miktar aminoasite ve öncekinden daha küçük polipeptidlere parçalanırlar. Daha sonra aminopeptidaz ve karboksipeptidazların(ekzopeptidaz) etkisi ile serbest amino asitler ile dipeptid ve tripeptid'lerden oluşan bir karışım ortaya çıkar. Son basamakta dipeptidaz ve tripeptidaz'lar aracılığı ile karışım aminoasitlere parçalanır [68].

### 1.2.2. Protein Dönüşümü

Canlı tüm hücreler, protein sentezi ve yıkımı yoluyla, belirli ve dengeli bir protein döngüsünü sürdürürler. Hücre içi proteazların hücre için uygun protein döngüsünü gerçekleştirmeye katkısı bilinmektedir. *E. coli*'de, Lon gen ürünü olan, ATP'ye bağımlı proteaz, anormal proteinlerin hidrolizinden sorumludur [69]. Ökaryotlarda hücre içi proteinlerin döngüsü aynı zamanda ATP'ye bağımlı proteazlar ile gerçekleştirilmektedir [7, 70].

### 1.2.3. Sporulasyon

Bazı bakteri sporlarında, bazı mayaların askosporlarında, bazı fungusların konidial discharge evrelerinde yoğun protein döngüsü bulunmaktadır. Sporulasyon için proteaz enziminin gerekliliği, proteaz inhibitörleri kullanılarak ispatlanmıştır [71]. Proteaz A aktivitesinin artışıyla, maya diploidlerinin askospor oluşturduğu gözlenmiştir [72]. *Conidiobolus coronatus* dan elde edilen alkali proteaz ile güçlü bir etki gözlenmiştir [7, 73].

#### 1.2.4. Çimlenme

Uyku halindeki sporlar çimlenme için gerekli olan amino asitlerden yoksundurlar. Serin endoproteinazlar tarafından uyku halinde bulunan sporlardaki proteinlerin parçalanması ile yeni protein ve nükleotid sentezi için gerekli amino asitler ve azot oluşturulmaktadır. Bu proteazlar sadece depolama proteinleri için spesifiktir ve diğer spor proteinlerini etkilemez. Sporların çimlenmesi ile aktiviteleri hızla kaybolur[74]. Ekstraselüler asit proteazlarının, *Dictyostelium discoideum* sporlarının ve *Polysphondylium pallidum* mikrosistlerinin çimlenmesi sırasında hücre duvarındaki polipeptidlerin kırılmasına yardımcı oldukları gözlemlenmiştir [7, 75, 76].

#### 1.2.5. Enzim Modifikasyonu

Enzimlerin zimojenik öncül formlarının aktivasyonu ve bazı fizyolojik düzenleme-kontrol işlemlerinde proteazlar önem teşkil etmektedir. Spesifik ve sınırlı proteolizlere örnek olarak; hormonların üretimi, kan pıhtılaşması, yumurtanın sperm tarafından fertilizasyonu verilebilir [7]. *Candida albicans*, *Mucor rouxii*, ve *Aspergillus nidulans* 'de kitin sentazın zimojenik formunun aktivasyonu için sınırlı bir proteoliz gerçekleşmektedir. Kex-2 proteazı (kexin; EC 3.4.21.61) aslında mayalarda keşfedilmiş bir enzim iken ökaryotik öncül enzim ailesinin prototipi olarak ifade edilmektedir. Bu proteaz, salgılama yolunda bulunan integral membran proteinlerinin ve prohormonların karboksil zincirindeki bir çift bazik aminoasit kalıntısının (örnek: Lys-Arg or Arg-Arg) koparılmasıyla hidrolizini katalizlemektedir [77]. Furin (EC 3.4.21.5), Kex-2 proteazının rastlantısal olarak keşfedilen memelilerdeki homoloğu olan bir proteazdır. Yapısal salgı yolunda Arg-X-Lys veya Arg-Arg kalıntıları parçalayarak çok çeşitli öncü proteinlerin hidrolizini katalize ettiği gösterilmiştir [77]. Proteolitik inaktivasyonun, in vivo şartlardaki katalitik aktivitesinin geri döndürülemez olması fizyolojik açıdan önemli bir olaydır. Birçok enzimin fizyolojik veya gelişimsel değişikliklere tepki olarak veya metabolik bir değişimden sonra etkisiz hale getirildiği bilinmektedir. Mayalardan alınan proteinaz A ve B formları, proteinlerin kovalent modifikasyonunu içeren süreçteki proteoliz mekanizmasının gösterilmesi için işaretlenmiştir. Proteolitik enzimlerin

modifikasyonunun, değişmiş fizyolojik fonksiyonlara sahip bir protein ile sonuçlandığı bilinmektedir. Örn; E. coli'den elde edilen lösil-L-RNA sentetaz, doğal enzimden küçük bir peptidin çıkartılmasıyla ve pirofosfat değişimiyle elde edilmiştir [6, 7].

### 1.2.6. Beslenme

Proteazlar, büyük polipeptidlerin daha küçük peptidlere ve amino asitlere hidrolize edilmesini katalizler, böylece ürünlerin hücreye emilimini kolaylaştırırlar. Ekstraselüler enzimler, depolimerize edici etkileri nedeniyle beslenmede önemli bir rol oynamaktadır. Mikrobiyal enzimler ve memeli ekstrasellüler enzimler öncelikle hücrelere beslenme olarak gerekli aminoasit havuzunu sağlayarak hücrelerin canlı kalmasına katılırlar [6].

### 1.2.7. Gen İfadesinin Regülasyonu

Gen ifadesinin modülasyonunun proteazlar ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır [78]. Araştırmalara göre; ATP bağımlı proteazın, represörü proteoliz etmesiyle, genin represörünün inaktive olduğu görülmüştür. *Bacillus thuringiensis* RNA polimerase B alt biriminin, transkripsiyonel özgünlüğündeki bir değişim, proteolitik modifikasyon ile ilişkilendirilmiştir [79]. Regülasyon ve translasyonunun düzenlenmesinin, proteazlar tarafından, ribozomal proteinlerin modifiye edilmesiyle gerçekleştiği öne sürülmektedir.

### 1.2.8. Diğer Fizyolojik Görevler

Proteazlar; ısı şoku tepkisini, DNA hasarına karşı SOS yanıtını, bakteriyofajın yaşam döngüsünü ve programlanmış bakteri hücre ölümünü kontrol eden çeşitli düzenleyici proteinlerin parçalanmasına aracılık ederler [80, 81]. Son zamanlarda bakteriler ve ökaryotlar arasında korunan ATP'ye bağlı proteazlara yeni bir fizyolojik işlev

atfedilmiştir. Onların şaperonlar olarak hareket ettikleri ve yalnızca proteoliz işlemlerine öncülük etmedikleri, ayrıca proteinlerin membranlara katılması ve protein komplekslerinin parçalanmasını veya oligomerleşmesini sağladığı düşünülmektedir [82].

### **1.3. Proteazların Endüstriyel Kullanım Alanları**

#### **1.3.1. Biyomühendislik**

Subtilisin protein mühendisliği çalışmaları için bir paradigma haline gelmiştir. Gen klonlamasının 1980'lerin başında ortaya çıkmasından bu yana subtilisinlerin genetik manipülasyonu ile ilgili birçok etkileyici çalışma yapılmıştır. Örneğin, yönlendirilmiş evrimle, *Bacillus subtilis*'ten elde edilen subtilisin E, 5 kuşak boyunca, mutagenез, rekombinasyon ve tarama çalışmalarıyla, termofilik homologue olan termitaza (*Thermoactinomyces vulgaris*'den elde edilen, subtilisinin bir üyesi olan enzim) işlevsel olarak eşdeğer olacak şekilde dönüştürülmüştür. Sonuçta oluşturulan enzimin orijinal haline göre optimum sıcaklığının 17 derece daha yüksek, yarı ömrü 200 kat daha fazla, sentetik substratları hidrolize edebilme aktivitesinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu deney yönlendirilmiş evrimin termal adaptasyon mekanizmalarını açıklamak için güçlü bir araç olduğunu ve enzim aktivitesinden ödün vermeksizin termostabilitenin manipüle edilmesinde etkin ve verimli bir yaklaşım olacağını göstermiştir [83, 84].

#### **1.3.2. Deterjan endüstrisi**

Enzimlerin en büyük endüstriyel uygulamaları deterjanlardadır. Deterjan enzimleri için büyük bir gelişme, Alkalaz'ın (*Bacillus licheniformis*'ten subtilisin Carlsberg'in kullanılmasıyla) başlanmıştır. Deterjanlara dahil edilen enzimler, diğer bileşenlerin varlığında tatmin edici katalitik aktiviteler sergilemelidirler. Bu nedenle, deterjanlarda kullanılmaya potansiyel olarak uygun olan proteolitik enzimler, alkalın pH'da, nispeten yüksek sıcaklıklarda ve kenetleme maddeleri, ağartıcı ve yüzey aktif

cisimcikler varlığında dengeli olmalıdır. Proteazlardan sadece serin proteazlar potansiyel olarak deterjanlara dahil edilmeye uygundur. Bakteriyel subtilisinler erken bir aşamada deterjan uygulamaları için en uygun olarak tanımlanmıştır.

Deterjanlarda kullanılan ilk proteazlardan biri, *B. licheniformis*'ten elde edilen subtilisin Carlsberg'dir. Bu enzim 275 amino asitten oluşan tek bir polipeptid zincirdir. *B. lentus*'tan elde edilen subtilisin, subtilisin Carlsberg'ye kıyasla daha yüksek pH'da (9-12) daha iyi bir aktivite profiline sahip olduğu için sıklıkla kullanılmaktadır. Sadece Avrupa'da yıllık 900 ton saf subtilisin üretilmesi ve kullanılması subtilisinlerin önemini ortaya koymaktadır [4]. Günümüzde, deterjanlarda kullanılan subtilisinlerin çoğunluğu *Bacillus licheniformis*, *B. lentus*, *B. alkalophilus* veya *B. amyloliquefaciens* (Subtilisin BPN ') den izole edilirler [4]. Çizelge 1.3.'de ticari subtilisinlerin deterjanlarda kullanımı gösterilmiştir [5].

**Çizelge 1.3.** Ticari subtilisinlerin deterjanlarda kullanımı

Ürün adı	Orjin	Saf/Protein mühendisliği ile modifiye edilmiş	Mikroorganizma
Alcalase (Novozymes)	<i>B. licheniformis</i>	Saf	<i>B. licheniformis</i>
Savinase (Novozymes)	<i>B. clausii</i>	Saf	<i>B. clausii</i>
Purafect (Genencor)	<i>B. lentus</i>	Saf	<i>B. subtilis</i>
Everlase (Novozymes)	<i>B. clausii</i>	Protein mühendisliği ile modifiye edilmiş	<i>B. clausii</i>
Purafect OXP (Genencor)	<i>B. lentus</i>	Protein mühendisliği ile modifiye edilmiş	<i>B. subtilis</i>
Esperase (Novozymes)	<i>B. halodurans</i>	Saf	<i>B. halodurans</i>
Kannase (Novozymes)	<i>B. lentus</i>	Protein mühendisliği ile modifiye edilmiş	<i>B. clausii</i>
Properase (Genencor)	<i>B. alkalophilus</i>	Protein mühendisliği ile modifiye edilmiş	<i>B. alkalophilus</i>

Subtilisinlerin deterjan endüstrisindeki kullanımındaki bir sınırlandırma ise ağartıcı maddelerin subtilisinlerin aktif bölgesinde bulunan metionin ve sistein kalıntılarını okside etmesidir. Bu engel, yönlendirmeli mutajenez ile metionin yerine serin ve ya alanin gibi katalitik aktiviteyi olumsuz etkilemeyen kalıntılarla yer değiştirilerek önlenmektedir. Oksidasyona dayanıklı mühendislik ürünü subtilisinlere örnek Purafect OXP (Genencor) ve Everlase (Novozymes)dir. Birkaç yıldır piyasada satılmaktadır [4].

### **1.3.3. Bira Endüstrisi**

Bira tüketiciler tarafından berrak ve parlak olarak tercih edilmektedir. Bira imalatı sırasında çözünmez proteinlerden oluşan farklı bileşenler kullanılmaktadır. Bu durum bulanık bir görünüme neden olmaktadır. Özellikle bira soğutulduğunda ise proteinlerin çözünürlükleri düştüğü için bulanıklık daha da artmaktadır. Genellikle kaba papain veya bromelain (sistein proteaz) kullanılarak bu durum çözülmektedir ve daha berrak, parlak biralarda elde edilmektedir [5]. Ek olarak proteazlar maltın matlaştırılmasında da kullanılmaktadır.

### **1.3.4. Fırın Endüstrisi**

Ekmek yapımında yüksek glütenli buğday çeşitleri kullanıldığında, glütenin kısmen hidrolize edilmesi gerekmektedir. Bu durum için çoğunlukla bromelain kullanılmaktadır. Bromelain yüksek tepkime hızına sahip, amilaz, pentosanaz gibi yan aktiviteleri olmayan ve yüksek sıcaklığa dayanabilen bir sistein proteazdır. Böylece hamur daha hızlı hazırlanabilmektedir. Ayrıca bromelain, hamurun gerilmesini engellemekte bisküvi ve pasta hamurlarının hacminin yükselmesini sağlamaktadır [5].

### **1.3.5.Gıda endüstrisi**

Enzimatik hidroliz kimyasal metotlara kıyasla çok tercih edilir. Çünkü iyi tanımlanmış hidrolizatların oluşmasını sağlar. L-amino asitlerin yok edilmesini önler ve zehirli maddelerin oluşumunu engeller.

Sistein proteazları, özellikle papain ve bromelain, mükemmel tat ve lezzete sahip olan protein hidrolizatlarının hazırlanması için yaygın olarak kullanılır. Çünkü bu proteazların tatları acı değildir. Deniz ürünleri, yumurta, sebze (soya, buğday, pirinç, Ayçiçeği, susam ve mısır ) Protein hidrolizatları sadece tat ve lezzetin geliştirilmesini sağlamaz aynı zamanda protein asimilasyonunu da geliştirirler. Kazeinler ve peynir altı suyu doğada bulunan önemli protein substratlarından biridir. Kazein ve Peynir altı suyu proteinlerin köpük oluşumunu artırır ve stabil köpük yapısı proteoliz sürecinde indirgenebilir.

Ayrıca, süt proteini hidrolizatları, süt ürünlerinin alerjik özelliklerini azaltır. Süt proteini hidrolizatları diyetetik yiyeceklerde ve sindirimi kolay bebek gıdalarında bulunmaktadır.

Sistein proteazlar marine yapımı ve yumuşatma prosedürlerinde başarıyla kullanılmaktadır. Yumuşatma etin lifli proteini (kollajen ve elastin) arasındaki çapraz bağların koparılması ya da etin parçalara ayrılması ile gerçekleştirilir. Bu işlem için geleneksel enzim olarak papain, bromealin ve ya fisin kullanılmaktadır [5].

### **1.3.6.Yem endüstrisi**

Bazı karışık yemlere papain(sistein proteaz) ilavesi, yemlerin kullanılabilirliği büyük ölçüde arttırmaktadır. Aynı zamanda maliyetini de düşürmektedir. Evcil hayvan gıda endüstrisindeki önemli bir uygulaması ise hammaddeyi sıvılaştırmak için kullanılmasıdır. Böylece kabul edilebilir bir lezzet oluşturulmaktadır [5].



### **1.3.7. Yan ürün olarak kullanımı**

Örnek olarak kitosan depolimerizasyonu verilebilir. Kitin, selülozdan sonra dünyada en yaygın olarak bulunan ikinci biyopolimerdir. Kitosan ise kitinin kısmi deasetilasyonu ile elde edilen, modifiye, doğal bir karbonhidrat polimeridir. Ticari ham papain, bromelain ve fisin, kitosanın depolimerizasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır. Kitosanın depolimerizasyonu et ürünlerinde kaplama materyali olarak kullanılarak raf ömrünü uzatmak, ekmek ve yumurta gibi ürünlerde koruyucu bir bariyer oluşturarak nem kaybını engellemek, ekmek, meyve ve doymamış yağ asitlerince zengin deniz ve et ürünleri gibi çeşitli gıdalarda antioksidan etki göstererek bu ürünleri oksidasyona karşı korumak, sosis, mayonez gibi ürünler emülgatör görevi görmek ve meyve suyu endüstrisinde gerek durultma yardımcı maddesi gerekse asitliği düzenleyici olarak kullanılmaktadır [85].

### **1.3.8. Protein Geri Kazanımının Arttırılması**

Sistein proteazlar ile geri kazandırılan proteinler hem beslenme hem de işlevsellik açısından fayda sağlamaktadır. Örnek olarak balık atıklarının çözündürülmesi, yem üretimi için kahverengi karideslerden karotenoproteinler çıkarılması verilebilir [5].

### **1.3.9. Deri Endüstrisi**

Deri dövmesi deri ve postlara gerekli yumuşaklık ve dövülebilirliği sağlamak için kullanılan bir tekniktir. Proteazları içeren dolgu malzemesi, deri ve postlarda bulunan proteinimsi yapıları parçalayarak bu amaca hizmet etmektedir. Papain ise bu uygulamada süpürücü bir ajan olarak görev yapmaktadır. Bununla birlikte, bu uygulama ile, proteolitik sürecin, yalnızca belirli bir seviyeye kadar ilerlemesine izin verilmektedir. Böylece derinin temel yapısının tahrip edilmesi önlenmektedir.

Derinin kıllardan arınması işlemi(dehairing) geleneksel bir yöntem olarak sodyum sülfat ve kireç ile sağlanırken son yüzyılda çeşitli enzimatik (proteaz ve amilaz

aktiviteleri dahil) dehairing yöntemleri gelişmiştir. Papainin bu işlemlerde, çözünebilir silikatlar (su camı) ile birlikte deriyi bronzlaştırmak için ürünlerin pürüzsüz ve parlak hale getirilmesi için kullanılabileceği belirlenmiştir [5, 86].

### **1.3.10. Tekstil endüstrisi**

Papain, ipek kozalarının kaynatılması ve ipek işlemeciğinde kullanılmaktadır. İpekböceği (*Bombyx mori*) kendisine yuva yapmak için salgıladığı serisin maddesi tipik bir zamk özelliğindedir. Bu yapışkan özelliği ile ipek telleri birbirine yapışmaktadır. İpeğin çekilebilmesi için serisin maddesinin yumuşatılması gerekmektedir. Papain bu aşamada serisini hidrolize etmektedir, ancak ipek lif proteinini etkilememektedir. Sonuç olarak, oldukça yumuşak ve büzüşmeyen ipek elde edilmektedir [5, 87].

### **1.3.11. Kozmetik Sektörü**

Papain lekeleri ve sivilceleri gidermeye, yüzün pürüzsüz hale getirilmesine yardımcı olmaktadır. Kan dolaşımını teşvik ederek cildi iyileştirmektedir. Papain ve Bromelain, yüz bakım ürünlerinde hafif peeling etkisi sağlamak için kullanılmaktadır[5].

### **1.3.12. Organik Kimya**

Papain, amino asitler sentezinde [5, 88] biyolojik olarak aktif peptitlerin yapımında [5, 89] antikanser ilaçların yapımında [5, 90]ve poliaspartat yapımında [5, 91] kullanılmaktadır.

### 1.3.13. Farmösitik ve tıp

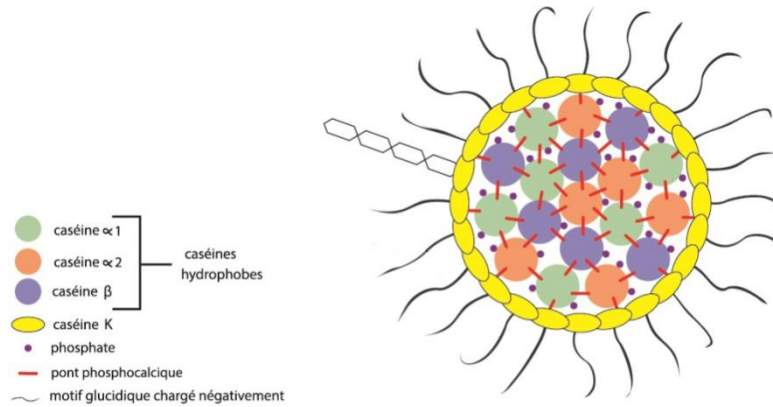
Bitkilerden izole edilen sistein proteazların bu alanlarda özel bir yeri bulunmaktadır. 1957 yılından beri terapötik bir bileşik olarak kullanılan bromelain için geniş bir yelpazede terapötik faydaları olduğu bildirilmiştir. Bromelain'in temel uygulamaları; geri dönüşümlü trombosit agregasyonu [92], anti-inflamatuvar etki [93], sitokin ve bağışıklığın modülasyonu [94], yanık cildin debridmanı [95], anti tümör aktivite [96], mukolitik özellik [97], sindirime yardımcı [98] ve yaraların iyileşmesidir [99]. Tıbbi ve para-medikal uygulamada yaygın olarak kullanılan bir başka enzim papain'dir. Bu enzim yara debridmanı, nekrotik dokunun alınması için kullanılır. Sert dokuların harici tedavisi, siğil ve yara dokusunun giderilmesi, akne tedavisi, depilasyon, cilt temizleme tedavileri ve diş macununun bir bileşeni olarak kullanılmaktadır [100].

Lizozomal sistein proteazları dejeneratif ve otoimmün durumlarda kritik enzimler olarak bilinmektedir. Bu enzim grubunun enzimatik aktivitesinin eksikliği iki hastalıkta ortaya çıkmıştır: psiknodisostoz, katepsin K eksikliğinin sebep olduğu iskelet kemik displazisi ve katepsin C deaktivitesinin neden olduğu bir periodontopati olan Pappilon-Lefevre sendromudur [101]. Bununla birlikte, papain benzeri sistein proteazlarının patolojik hallerdeki başlıca rolü eksiklikleriyle değil, bu tür enzimlerin aşırı ifadesi veya normal faaliyet alanlarının dışındaki aktiviteleri ile ilgilidir. Sistein proteazlarının fizyopatolojik işlevlerinin anlaşılması, yeni seçici terapötik ajanların tasarımına izin verecektir. Tümör hücresi invazyonu ve metastazı, lizozomal proteazlar da dahil olmak üzere çeşitli proteazların proteolitik aktiviteleri ile ilişkilidir. Bu durumlarda bazı katepsinlerin artmış ekspresyonu ve inhibitörlerinin azaltılmış seviyeleri gözlenmiştir. (Meme, gastrik, glioma ve prostat kanserleri dahil olmak üzere birçok insan kanserinde ve özellikle agresif hücrelerde) [101].

### 1.3.14. Peynir yapımı

Sığır kimozi peynir üretiminde süt pıhtılaştırıcı bir madde olarak kullanılmaktadır. Peynir yapımında kimozi enziminin öncelikli görevi, miseli stabilize eden  $\kappa$ -kazeinin fenilalanin (105)-metiyonin (106) tek bir peptid bağıni spesifik olarak hidrolize ederek sütü pıhtılaştırmaktır. Kazein doğada yalnızca sütte bulunan bir proteindir ve süt proteinlerinin yaklaşık % 80'ini oluşturur. Başlıca fraksiyonları:  $\alpha$ -s1 kazein,  $\alpha$ -s2 kazein,  $\beta$ -kazein ve  $\kappa$ -kazeindir. Kazeine kalsiyum-kazeinat-fosfat kompleksinde denilebilir. Bileşiminde % 2,9 kalsiyum, % 0,8 fosfor bulunur. Kazein ısıya karşı oldukça dirençlidir ancak asitliğe karşı duyarlıdır. İzoelektrik noktasında (pH 4,6-4,7) pıhtılaşır[102]. Sütte kazeinin % 90'ı misel adı verilen koloidal parçacıklar halinde bulunur. Misel de alt misellerden oluşmaktadır. Miselin iç kısmında  $Ca^{+2}$  iyonlarına duyarlı olan  $\alpha$ -s1 ve  $\beta$ -kazein fraksiyonları daha fazla bulunurken yüzey kısmında  $\kappa$ -kazeinin hidrofil karakterli karbonhidrat kısmı lokalize olmuştur.  $\kappa$ -kazeinin % 90'ı misellerin yüzeyinde bulunmaktadır [102].

Alt misellerden oluşmuş bir kazein miselinin yapısı Şekil 1.2'de gösterildi.



Şekil 1.2. Kazeini oluşturan alt misellerin yapısı

Taze sütte kazeinler stabil durumda olmaktadır ve net negatif elektriksel yük dağılımına sahiptir. Misellerin yüzeyindeki hidrofilik C-terminal ucu ayrılırsa

(örneğin kimozin ile) miseller çözünürlüğünü kaybederek kümeleşmeye başlamakta ve kazein pıhtısını oluşturmaktadır. Peynir yapımının birinci aşamasında asit proteazlar özellikle rennin (kimozin) k-kazeini fenilalanin (105)-metiyonin (106) arasındaki tek bir peptid bağımlı hidrolize ederek para-k-kazein ve glikomakropeptide dönüştürmektedir. İkinci aşamada agregasyon aşamasında, k-kazeinin proteolizi ile stabilitesi bozulan kazein miselleri birbirleriyle birleşerek misel toplulukları oluşturmaktadır. İkinci safhada, modifiye olan misellerin bir araya gelmesi ile gerçekleşen jel oluşumu, büyük oranda sütün sıcaklığına ve kalsiyum miktarına bağlı olmaktadır. Pıhtılaşma oranı ise, büyük oranda enzim konsantrasyonu ve aktivitesine bağlıdır. Bu etkenlerin her ikisindeki artış, pıhtılaşma süresini azalırken, pıhtı sıklığını arttırmaktadır. Üçüncü aşama ise meydana gelen misel kümelerinin bir ağ gibi birleşerek sıkılaştığı, pıhtının şekillendiği jelleşme aşamasıdır [62, 102].

Sütü pıhtılaştırmak amacıyla rennet yerine kullanılan en yaygın mikrobiyal proteazlar; *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* ve *Cryphonectria parasitica* gibi kaynakların kültürasyonu ile elde edilirler ve şirden enzimine oldukça benzemektedirler. Mikrobiyal rennetler hem ekonomik hem de şirden mayası ile üretilen peynirlere yakın özellikte ürün vermektedirler. Bu nedenle, süt pıhtılaştırıcı olarak buzağı renneti yerine kullanılabilir uygun kaynaklardır [62, 103].

### 1.3.15. Peptit sentezi

Peptidlerin büyük ölçekli sentezi son birkaç on yılda gıda ve ilaç endüstrileri için giderek daha da önem kazanmaktadır. Peptitlerin ana uygulaması, düşük kalorili tatlandırıcılar olarak kullanılmasıdır. Buna ek olarak, birkaç biyolojik olarak aktif peptid hastalıkların tedavisinde ilaç olarak ilgi bulmuştur.

Termolizin enzimatik peptid sentezi potansiyeli üzerinde çalışılan enzimlerin biridir. Bu amaçla ilk kullanımından beri laboratuarda kapsamlı bir şekilde incelenmiştir ve büyük ölçekli N-karbobenzoksi-L-aspartil-L-fenilalanin metil esteri (Z-Asp- Phe-OMe)(aspartamin öncülüdür), yapay tatlandırıcı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [104]. Aspartam, düşük esterolitik aktivitesinden ötürü, peptidin

tatlı tadında esas olan metil ester grubunun korunmasına neden olmaktadır. Enzimatik peptid sentezinin kapsamını genişletmek için yeni enzimler araştırılmıştır. *Vibrio sp.* 'den vimelysin adı verilen bir metaloproteaz düşük sıcaklıklarda ve daha yüksek solvent konsantrasyonlarında aspartam sentezi için termolizinden daha iyi olduğu kanıtlanmıştır [105].

### **1.3.16. Lezzet arttırıcı**

Metaloproteazların (çoğunlukla diğer proteazlarla kombinasyon halinde) çok önemli bir diğer endüstriyel uygulaması, hidrolize gıda proteinleri ve lezzet arttırıcı peptitlerin üretilmesidir. Soya ve buğday hidrolizatları, çorba ve sosların lezzet artırımında kullanılmaktadır ve süt proteini hidrolizatları peynir endüstrisinde tercih edilmektedir. Et hidrolizatları, et ürünlerinin, çorbaların, tadının geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Enzimatik süreçlerin bir avantajı, istenmeyen yan ürünlerin sağlık üzerindeki olumsuz etkilerinin az oluşudur [5].

## **1.4. Yöntemler**

### **1.4.1. DNA İzolasyonu**

DNA izolasyonu bir çok moleküler çalışmaların ilk adımındır. DNA izolasyonunda kullanılan teknikler birkaç faktöre göre değişkenlik göstermektedir. Bu faktörler; hedef DNA, kaynak organizma, DNA'nın izole edileceği materyal, istenen saflık ve araştırılacak bir sonraki uygulama yöntemidir (PZR, klonlama, işaretleme, blotlama, RT-PZR, cDNA sentezi vs.). DNA izolasyonu lizis, pürifikasyon(saflaştırma) ve presipitasyon(çöktürme) olmak üzere 3 temel aşamadan oluşmaktadır. Lizis; hücre membranının parçalanması, DNA'yı hidrolize eden DNAaz'ların inhibe edilmesi ve DNA'nın stabil ve yapısının bozulmadan hücre dışına çıkarılmasını kapsamaktadır. Hücrelerin parçalanması materyale göre değişmekle birlikte mekanik parçalama(havan ile ezme, sonikatör ile parçalama, homogenizatör ile parçalama), kimyasal parçalama(SDS, CTAB gibi detejanlar ile parçalama), enzimatik

parçalama(lizozim)ile olmaktadır. Pürifikasyon selüler ve histon proteinlerinin uzaklaştırılmasını, presipitasyon ise organik fazdan ayrılan DNA'nın çöktürülmesini kapsamaktadır. Lizis aşamasında kullanılan bileşenler ve görevleri şunlardır:

Tampon(Tris): Ortamın pH'sını düzenleyerek DNA'nın stabil kalmasını sağlar.

Deterjan(SDS): Hücre membranındaki lipitleri tutma özelliğine sahiptir. Membranların eritilmesini ve parçalanmasını sağlarlar.

Şelasyon ajanı(EDTA): EDTA (+2) değerlikli metal iyonlarını bağlamaktadır.  $Mg^{+2}$ ; DNA'yı hidrolize edebilen DNAaz enziminin kofaktörü rolündedir. EDTA  $Mg^{+2}$  iyonlarını tutarak DNAazları inhibe etmektedir.

Proteinaz K: Serin tip proteazdır. DNAaz ve proteinlerin peptid bağlarını hidrolize ederek inhibe etmektedir.

Pürifikasyon aşamasında kullanılan bileşenler ve görevleri şunlardır:

Organik çözücüler(Fenol/kloroform/İzoamilalkol): Fenol hidrofobik hücre bileşenlerini (membran lipitleri, hidrofobik polipeptidler,) tutma özelliğine sahiptir. Üst fazda hidrofilik bileşenlerin(nükleik asit, tuz) alt fazda ise fenol ile çözülür durumda olan proteinlerin yer almasını sağlamaktadır. Ancak az bir oranda su ile karışabilme özelliğine sahiptir. DNA'ya zarar vermesini önlemek için kloroform eklenmektedir. Kloroform su ile karışmamakta ve fenolü de alt fazda tutmaya yardımcı olmaktadır. İzoamilalkol ise yüzey gerginliğini azaltarak üst ve alt faz arasında kabarcık oluşmasını önlemekte ve kloroformu stabilize etmektedir.

Pürifikasyon aşamasında kullanılan bileşenler ve görevleri şunlardır:

NaCl: Yüksek konsantrasyonlu tuz (salting out) kullanılarak seçici çöktürme yapılabilmektedir.

%70'lik etanol: DNA'nın konsantre hale gelmesini sağlamaktadır.

İsopropanol: DNA'nın konsantre hale gelmesini sağlamaktadır[106, 107].

#### **1.4.2. PZR ve Temel Aşamaları**

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), DNA dizilerinin *in vitro* koşullar altında çoğaltılması esasına dayanmaktadır. PZR tekniği, temelde üç aşamadan oluşmaktadır.

#### **1.4.2.1 DNA Zincirinin Açılması (Denaturation)**

Kalıp DNA, 92-95 °C'de 1-2 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılıp tek sarmal haline gelmektedir. DNA zincirini ayırmak için, bazı durumlarda 5-10 dakika ön ısıtma yapmak gerekebilir.

#### **1.4.2.2. Primerlerin DNA Zincirlerine Bağlanması (Annealing)**

Reaksiyon sıcaklığının, 37-65 °C'ye düşürülerek oligonükleotid yapıdaki primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye bağlanması işlemidir. Bu işlem, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniyede gerçekleşmektedir [108].

#### **1.4.2.3. Primer Uzaması (Primer Extension)**

Sıcaklığa dayanıklı DNA polimeraz (genellikle Taq DNA Polimeraz) ile ve enzimin kofaktörü olan MgCl<sub>2</sub> varlığında primerler hedef zincir boyunca uzatılır. Taq DNA polimerase 72 °C sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır [109]. Sentezin yönü, 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır.

Üç basamaktan (denaturation, annealing, primer extension) oluşan işlem, bir PZR döngüsünü temsil etmektedir. Bu işlem, genel olarak 25 ile 40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA bölgesi çoğaltılmaktadır. PZR sonucunda elde edilen DNA ürünleri agaroz veya poliakrilamid jellerde yürütüldükten sonra, ethidium bromide (EtBr) veya gümüş nitrat (GN) ile boyanarak gözlemlenmektedir [110].



### 1.4.3. PZR Temel Bileşenleri ve PZR Optimizasyonu

PZR'da kullanılan temel bileşenler hedef DNA veya RNA (templeyt), taq DNA polimeraz enzimi, primerler, deoksinükleotitler, tampon sıvı ve  $Mg^{+2}$  iyonları ve distile sudur.

PZR Optimizasyonunda, reaksiyon yalnızca PZR bileşenlerinden değil optimal olmayan birçok koşuldaki kaynaklanabilir. (PZR çalışması yapılan ortam, DNA zincirinin açılması, primer bağlanması, primer uzaması, döngü sayısı vs). PZR çalışmalarında primerlerin bağlanma sıcaklığı ve  $Mg^{+2}$  konsantrasyonu çalışma verimini önemli ölçüde etkileyen parametrelerdendir [111, 112].

#### 1.4.3.1.DNA/RNA Örneği

İzole edilen DNA/RNA örneğinin saflık kontrolü yapılmalıdır.

#### 1.4.3.2. Taq DNA Polimeraz Enzimi

100 µl reaksiyon için önerilen *Taq* DNA polimeraz enzim konsantrasyonu 1-2.5 ünitedir. Fakat enzim gereksinimi kullanılan kalıp DNA veya primere göre değişebilmektedir. Enzim konsantrasyonunun düşük olması durumunda ürün(DNA) az, yüksek olması durumunda spesifik olmayan bantlar ortaya çıkabilmektedir[113].

#### 1.4.3.3. Primerler

Primer tasarımı yapılırken dört bazın da eşit oranda kullanımına özen gösterilmeli, primerler tekrarlı bölgeler içermemeli ve primer çiftlerinin 3' uçları birbirlerine komplementer yapıda olmamalıdır. Primerlerin yapısında %50-60 kadar G+C bazları bulunması, hedef DNA ile daha kuvvetli bağların kurulmasına yardımcı olmaktadır.

Tipik primer uzunluğu 16-30 baz arasında değişmekte fakat genel olarak 18-24 baza (nükleotid) sahip primerler kullanılmaktadır.

Primer konsantrasyonunun genel olarak 0.1-0.5  $\mu\text{M}$  arasında olması tavsiye edilmektedir. Yüksek primer konsantrasyonları primer-dimer olarak adlandırılan spesifik olmayan bantların oluşumuna yol açmaktadır. Primerlerin bağlanma sıcaklığını hesaplamak için bir formül geliştirilmiştir. Bu formül  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$  şeklinde ifade edilmiştir.

#### **1.4.3.4. dNTP (Deoksinükleotid trifosfat)**

Final konsantrasyonları 20-200  $\mu\text{M}$  arasında olmalı ve 4 nükleotit de aynı oranda bulunmalıdır. Hedef olmayan alanlarda yanlış bağlanmaları azaltmak için uygun olan en düşük dNTP konsantrasyonu kullanılmalıdır.

#### **1.4.3.5. Tampon**

PZR uygulamalarında genel olarak 10-50 mM arasında Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 8.3-8.8) kullanılmaktadır [110].

#### **1.4.3.6. Magnezyum ( $\text{Mg}^{+2}$ )**

$\text{Mg}^{+2}$  iyonları; dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz enzimi aktivitesini uyarırlar, çift iplikli DNA'nın erime derecesini ( $T_m$ ) arttırlar ve primer-templeyt DNA hibridizasyonunu sağlarlar. Bu nedenle  $\text{Mg}^{+2}$ 'un PZR'ın özgünlüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Düşük  $\text{Mg}^{+2}$  konsantrasyonu ürün oluşumunda azalmaya, yüksek  $\text{Mg}^{+2}$  konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün oluşumuna neden olmaktadır. PZR reaksiyon karışımında ortalama 0.5-2.5 mM  $\text{Mg}^{+2}$  olması gereklidir [108, 113].

### 1.4.3.7. Su

Otoklavlanmış ve nükleaz ve ya diğer inhibitör maddeleri içermeyen distile su kullanılmaktadır.

### 1.4.4. ARDRA (Amplifiye edilmiş rDNA Restriksiyon Analizi)

Temeli 16S rDNA bölgesinin çoğaltılması esasına dayanan PZR-RFLP esaslı bir yöntemdir. 16S rDNA bölgesi, evrensel primerler veya tür spesifik primerler kullanılarak çoğaltılmaktadır. Daha sonra yine spesifik restriksiyon enzimlerin kullanımı ile amplifiye edilen bölgeler kesilmektedir [114]. Sonuç olarak farklı DNA dizileri farklı yerlerden kesilmektedir [115].

Restriksiyon enzimlerinin seçimi, çoğaltılmış bölgenin nükleotit kompozisyonuna göre yapılmaktadır, bu seçim ayrıca geniş sayıda türün net bir ayrımı için gerekli olmaktadır. Oluşan fragmentler agaroz jelde görüntülenerek karşılaştırmalı olarak sınıflandırmaya tabi tutulmaktadır. 16S rDNA bölgesi korunmuş ve türler arası değişken dizilere sahip olduğundan dolayı mikroorganizmaların sınıflandırılmasında önemli belirteçler olarak kullanılmaktadır. Bazı yakın türler arasında ayırım elde edebilmek için birden fazla restriksiyon profilinin karşılaştırılması önemlidir [116]. Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimlerinin kesim yerleri Çizelge 1.4.'te gösterildi.

**Çizelge 1.4.** Restriksiyon Enzimlerinin Kesim Yerleri

Enzimlerin Kesim Yerleri		
AluI	HaeIII(BsuRI):	TaqI
5' ...AG↓CT...3'	5'...GG↓CC...3'	5'...T↓CGA...3'
3'...TC↑GA...5'	3'...CC↑GG...5'	3'...AGC↑T...5'

### 1.4.5.Elektroforik Analiz

Elektroforetik analiz; elektriksel bir alanda, ortamda çözülmüş moleküllerin elektrik yüklerine göre göç etmeleri prensibine dayanır.

#### 1.4.5.1.Agaroz Jel Elektroforezi

Elektriksel bir alanda, makromoleküllerin, net yükleri, pH'sı ve moleküler ağırlıklarına göre ayrılma prensibine dayanmaktadır. Birçok önemli biyolojik makromolekül (örn. proteinler, ve nükleik asitler) iyonlaşabilen gruplara sahiptir ve pH'ya bağlı olarak çözeltide katyon(+) ya da anyon(-) biçiminde bulunurlar. Net yükün özelliğine bağlı olarak, yüklü partiküller katoda(-) veya anoda(+) doğru hareket etmektedir. Örneğin, elektrik alanının uygulandığı jel nötral pH'da ise, DNA örnekleri, negatif yüklü fosfat grupları içerdikleri için, anoda doğru hareket etmektedir. Agaroz kırmızı bir alg olan Agar agardan izole edilen doğrusal bir polisakkarittir. Isı ile muamele edildiğinde çözünen, soğutulduğunda jelimsi bir şekil alan bir yapıya sahiptir. Jelin konsantrasyonu değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilmektedir. Tamponlar ise akımı ileten iyonları taşımaktadır ve pH'ı sabit bir değerde tutmaktadır. DNA moleküllerinin elektroforezinde yaygın olarak Tris-Borat-EDTA (TBE) tamponu kullanılmaktadır. Sonuç olarak makromoleküller moleküler ağırlıklarına ve miktarlarına göre (büyük olanlar yavaş, küçük olanlar hızlı ilerler) ayrılırlar. Lineer DNA moleküllerinin ayrımı için tavsiye edilen agaroz jel konsantrasyonu Çizelge 1.5.'te gösterildi [117].

**Çizelge 1.5.**Agaroz jel konsantrasyonları ve ayırım aralıkları

% Agaroz	DNA büyüklük aralığı (bp)
0.75	10.000-15.000
1	500-10.000
1.25	300-5000
1.5	200-4000
2.0	100-2500
2.5	50-1000

#### 1.4.5.2. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi)

SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile bir proteinin moleküler ağırlığı ve altbirimleri belirlenmektedir. Proteinler içerdikleri amino asitlere bağlı olarak net bir yüke sahiptirler. Protein molekülü içeren bir çözeltiye elektrik alan uygulandığında; protein net yüküne, büyüklüğüne ve biçimine bağlı olarak belirli bir hızla hareket etmektedir. SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yönteminde proteinlerin hareket ettiği ortamda çok sayıda çapraz bağ içeren poliakrilamid jel kullanılmaktadır. Jel sentetik bir madde olan akrilamid ile akrilamid türevi olan N-N'-metilen bisakrilamidin polimerleşmesiyle oluşmaktadır. Polimerleşme reaksiyonunda akrilamid molekülleri yan yana bağlanarak düz zincirler oluşturmaktadır. Bisakrilamid molekülleri ise iki akrilamid zinciri arasında çapraz bağlanmalar oluşturmaktadır. Böylece ağimsı bir yapı meydana gelmektedir. Polimerleşme derecesi sıcaklık, pH, amonyum persülfat (APS) ve N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED) miktarına göre farklılık göstermektedir. Polimerleşme için; serbest radikal oluşumuna sebep olan APS reaksiyon başlatıcı, TEMED ise katalizör olarak rol oynamaktadır. Proteinler güçlü bir eksi yük taşıyan bir deterjan, sodyum dodesilsülfat ya da SDS içeren bir çözelti içinde bulunmaktadır. Böylece proteinlerin doğal yapıları SDS ile bozulduğu için hepsi aynı konformasyonda, aynı oranda SDS bağladıkları için hepsi aynı eksi yüke sahiptir. Ayrıca, proteinlerdeki S-S bağlarını kırmak amacıyla betamerkaptoetanol gibi bir indirgeyici ajan da kullanılmaktadır. Sonuç olarak protein karışım örnekleri elektriksel alanda anoda(+) doğru hareket ederler ve moleküler ağırlıklarına göre (büyük olanlar yavaş, küçük olanlar hızlı hareket etmektedir) ayrılırlar. Düşük derişimde hazırlanan ayırma jellerinin gözenekleri daha büyük olduğu için daha büyük moleküler ağırlıklı biyomoleküllerin ayrılmasında kullanılır. Ayırma jellerinin derişimleri ve ayırabildiği moleküler ağırlık aralıkları Çizelge 1.6.'da gösterildi [118-120].

**Çizelge 1.6.** Jel derişimi konsantrasyonları ve ayırımları

Jel Derişimi(%)	Moleküler Ağırlık Aralığı (kDa)
5	60-212 kDa
10	18-78 kDa
15	15-45 kDa

#### **1.4.6. Kromatografik Yöntemler**

Kromatografi bir karışımındaki bileşiklerin birbiriyle karışmayan farklı iki faz arasındaki dağılımlarıyla ayrılmalarını sağlayan fiziksel bir ayırma yöntemidir. Bu fazlardan bir tanesi genellikle hareketsiz olan sabit bir faz iken; diğeri sabit faz boyunca bu fazın üzerinden akan hareketli fazdır. Spesifik bir proteinin bir karışımından izole edilebilmesi için bu proteinin kendine özgü fiziksel ve/veya kimyasal özelliklerinin bilinmesi ve bu bilgiler doğrultusunda uygun saflaştırma yönteminin seçilmesi gereklidir. Farklı yüke sahip proteinler iyon değişim kromatografisi, polar ve polar olmayan proteinler hidrofobik kromatografi, belirli bir bileşik ile birleşme eğilimi gösteren proteinler afinite kromatografisi ve farklı boyuttaki proteinler de jel filtrasyon kromatografisi ile etkili bir şekilde ayrılabilir [121].

##### **1.4.6.1. İyon Değişim Kromatografisi**

Bütün proteinler yapılarında yer alan amino asitlerin yan zincirlerinin yüzeylerinde çözücüler ile etkileşimi arttıran ve böylece çözünürlüklerini etkileyen yüklü gruplar bulunmaktadır. Fizyolojik pH değerlerinde bazı gruplar katyonik (pozitif yüklü, örneğin lizin) iken diğeri anyoniktir (negatif yüklü, örneğin aspartat). Belirli bir proteinin net yükü; onun yapısından kaynaklanan bu gruplar arasındaki dengeye ve pH'sına bağlı olarak değişmektedir. Bu durum proteinlerin izoelektrik nokta (pI) değerlerini de temsil etmektedir. Proteinlerin ayırma işlemlerinde de bu yük farklılığından yararlanılmaktadır [122]. İyonik yük ayrımı iyon değişim

kromatografisi ile gerçekleşmektedir. İyon değişim kromatografisi; yüksek kapasitesi, nispeten düşük maliyeti ve titiz temizleme sisteminden dolayı proteinlerin saflaştırılmasında yaygın ve ideal bir yöntemdir [123]. Bu yöntem ile küçük ve orta boyuttaki proteinleri (70 kDa kadar) etkili bir şekilde ayrılmaktadır. Ayrıca bu yöntem immunoglobulin, plasmid DNAsı ve virus gibi oldukça büyük biyomoleküllerin ayrılmasında da kullanılmaktadır [124]. İyon değişim kromatografisinde ayırma işlemi, hareketli fazda bulunan yüklü moleküller(tampon+örnek) ve sabit fazda (kolon dolgu maddesi) yer alan zıt yüklü moleküller ile arasındaki tersinir adsorpsiyona bağlı olarak gerçekleşmektedir.

#### **1.4.6.1.1. İyon Değişimi Kromatografi ile Ayırma işlemi**

Ayırma işleminin ilk aşamasında sabit fazın pH ve iyonik güç açısından dengelenmesi için kolon, tampon çözelti ile yıkanmaktadır. Örnek kolona yüklenmektedir. Genellikle örnek ve matriks arasındaki etkileşimi arttırmak için örnek düşük iyonik güçte verilmektedir. ( $I < 0.05M$ ). Bu işlemin ardından kolon sabit tampon çözelti ile yıkanarak reçineye spesifik ilgisi olmayan proteinler kolondan uzaklaştırılmaktadır. Ancak örnek içerisinde sabit faz ile farklı düzeyde etkileşim gösteren birçok protein bulunabilmektedir. Yıkama çözeltisinin iyonik gücünün yavaş yavaş artırıldığı kademeli yıkama aşaması ile sabit faza zayıf düzeyde bağlanan proteinler kolondan ayrılmaktadır. Ayırma işleminin sonuna doğru artan iyonik güce sahip çözelti ile de reçineye sıkı bir şekilde bağlanan proteinler kolondan ayrılmaktadır. Düzenli aralıklarla toplanan protein fraksiyonlarının absorbans veya floresans değerleri kaydedilerek bir elüsyon profili oluşturulmakta ve ilgili proteinin yerinin tespiti sağlanmaktadır [125, 126].

#### **1.4.6.1.2. İyon Değişimi Kromatografisinde Saflaştırmayı Etkileyen Faktörler**

##### **1.4.6.1.2.1. Kullanılan Matriks ve Özellikleri**

Matriksler (Sabit faz) genellikle selüloz, dekstran ve reçine gibi polimerlerden oluşmaktadır. Katyon değişim ve anyon değişim olmak üzere iki temel gruba ayrılmaktadırlar. Katyon değişim reçinelerinin yüzeylerinde negatif yüklü gruplar bulunmaktadır. Proteinler pI değerinin altındaki pH değerinde pozitif yüke sahip olduğu için katyon değişim kromatografisi pozitif yüklü proteinleri bağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Anyon değişim reçinelerinin yüzeylerinde ise pozitif yüklü gruplar bulunmaktadır. Proteinler pI değerinin üzerindeki pH değerinde negatif yüke sahip olduğu için anyon değişim kromatografisi de negatif yüklü proteinleri bağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Bu iyon değişim matriksleri ayrıca güçlü veya zayıf iyon değiştiricileri olarak da iki gruba ayrılmaktadır. Güçlü iyon değişim ligandları geniş pH aralığında yük özelliklerini ve buna bağlı olarak iyon değişim kapasitelerini koruyabilirken; zayıf iyon değişim ligandları değişen pH'ya bağlı olarak kapasitelerinde belirgin bir değişim göstermektedir [127]. İyon değişim reçinelerinden bazıları ve özellikleri Çizelge 1.7'de gösterildi.

**Çizelge 1.7.** İyon değişimi reçineleri ve özellikleri

İyon Değiştirici	Türü	Fonksiyonel Grubu
<b>Katyon</b>		
Sülfopropil (SP)	Güçlü	-O-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>
Metil sülfonat (S)	Güçlü	-O-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>
Karboksimetil (CM)	Zayıf	-O-CH <sub>2</sub> -COOAnyon
<b>Anyon</b>		
Dördüncül amonyum (Q)	Güçlü	-O-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Dördüncül aminoetil (QAE)	Güçlü	-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>3</sub>
Dietilaminoetil (DEAE)	Zayıf	-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> H(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

#### 1.4.6.1.2.2. Tampon Tuzları ve pH aralıkları

Hareketli fazın pH değeri proteinlerin iyonik yüklerini ve çözünürlüklerini etkilediği için saflaştırılmak istenen proteine uygun tampon tuzları seçilmelidir.



#### **1.4.6.1.2.3. Tuz konsantrasyonu**

Hareketli fazın pH değerinin yanı sıra tuz konsantrasyonunun da saflaştırma üzerine önemli bir etkisi bulunmaktadır. Genellikle 0 M'dan 1 M'a artan konsantrasyondaki gradient tampon çözeltiler ve bu çözeltilere uygun pH değerinde bileşikleri etkili bir şekilde ayırmaktadır.

#### **1.4.6.1.2.4. Kolon Akış Hızı**

Akış hızının olması gereken değerden fazla olması durumunda ayrılması istenen molekülün kolon dolgu materyalindeki yük ile etkileşime girme şansı azalmaktadır. Böylece bileşiğin hacmi de az olmaktadır.

#### **1.4.6.1.2.5. Sıcaklık**

Kullanılan iyon değişim materyalinin çeşidine bağlı olarak değişen bir etkiye sahip olmaktadır. Artan sıcaklık değeri, bileşiğin iyon değişim matriksindeki sabit iyonlarla etkileşimini arttırarak bileşiğin matrikse difüzyon hızını arttırmaktadır. Böylece ayrılan hacim fazla olmaktadır [121].

### **1.5. Tezin Amacı**

Bu tezin amacı; Kırıkkale'den proteaz üreticisi mikroorganizmaların izole edilmesi, tanımlanması ve proteaz enzimlerinin biyoteknolojik uygulanabilirliğinin belirlenmesidir. Bu amaçla Kırıkkale Üniversitesi'nin atıklarının depolandığı bölgeden toprak örneği alındı. Toprak örnekleri skimmilk agar besiyerine yayma ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda koloni etrafında zon oluşturan izolatlar proteaz üreticisi olarak kabul edildi. İzolatların tanımlanması amacıyla; makroskobik, mikroskobik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler özellikleri belirlendi. Üreme eğrileri saptandı. Daha ileri tanımlama için DNA

izolasyonu, PZR ile 16S rRNA analizi, PZR optimizasyonu ve ARDRA analizleri yapıldı. Sonuçlar agaroz jel elektroforezinde görüntüledi. Tanımlanan izolatlar; optimum üreme koşullarında enzim üretim besiyerine ekildi. İnkübasyon sonunda +4°C'de 5.000 rpm'de, 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant ham homojenat olarak kullanıldı. Ham homojenatın proteaz aktivitesi (U/mL) hesaplandı. En yüksek proteaz aktivitesi gösteren izolatın optimum proteaz üretiminin gerçekleştiği koşullar belirlendi. Enzimin biyoteknolojik uygulanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla; enzimin çeşitli parametrelerdeki (sıcaklık, pH, metal iyonları, kimyasallar, organik çözücüler, inhibitörler, substrat özgüllüğü) proteaz aktivitesi hesaplandı. Enzim santrifügasyon, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve DEAE Sefaroz İyon Değişimi Kromatografisi ile saflaştırıldı. Her saflaştırma basamağının proteaz aktivitesi (U/mL) ve protein miktarı ( $\mu\text{g/mL}$ ) hesaplandı.

## 2.MATERYAL VE METOT

### 2.1. MATERYAL

#### 2.1.1. Referans Suşlar

Proteaz aktivitelerinin izole edilen izolatlarla karşılaştırılması ve ARDRA yönteminde kontrol suş olarak kullanılmak üzere; *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Bacillus cereus* ATCC 10876 referans suşları çalışmalara dahil edildi.

#### 2.1.2. Proteaz Üreticisi İzolatlar

Proteaz üreticisi izolatlar Kırıkkale Üniversitesi Kampüs yakınlarında, organik atıklarca zengin toprak örneğinden izole edildi.

#### 2.1.3. Kullanılan Besiyerleri

##### 2.1.3.1. Nutrient Agar besiyeri

Mikroorganizmaların tanımlanması çalışmalarında genel üretim besiyeri olarak kullanıldı. Besiyeri içeriği; pepton (5 g/L), et özütü (3g/L), agar (12g/L), distile su (1000 mL)'dir. Gerekli miktarda besiyeri hazırlandıktan sonra, otoklavda 121 °C, 1.5 atm basınçta sterilize edildi.

##### 2.1.3.2. Nutrient Broth besiyeri

Mikroorganizmaların tanımlanması çalışmalarında genel üretim besiyeri olarak kullanıldı. Besiyeri içeriği; Pepton (5 g/L), et özütü (3g/L), distile su (1000 mL)'dir.

Gerekli miktarda besiyeri hazırlandıktan sonra, otoklavda 121 °C, 1.5 atm basınçta sterilize edildi.

#### **2.1.3.3. Skimmilk Agar Besiyeri**

Proteaz üreticisi mikroorganizmaların izolasyonu amacıyla ayırt edici besiyeri olarak kullanıldı. Sing ve ark'nın uygulamış olduğu besiyeri modifiye edilerek hazırlandı [128].Besiyeri içeriği; pepton (10g/L), et özütü (3 g/L), maya özütü ( 3 g/L), NaCl (5 g/L), agar (15 g/L), skimmilk (20 g/L), distile su (1000 mL)'dir. Gerekli miktarda besiyerihazırlandıktan sonra, otoklavda 121 °C, 1.5 atm basınçta sterilize edildi. Skimmilk U.V altında steril edildikten sonra besiyeri içeriğine eklendi.

#### **2.1.3.4. N1 Agar Besiyeri**

Stok kültürünün saklanması amacıyla zenginleştirici besiyeri olarak kullanıldı[129]. Besiyeri içeriği; pepton (10 g/L), et özütü (10 g/L), maya özütü (5 g/L), glikoz (1 g/L), agar (15 g/L), distile su (1000 mL)'dir. Gerekli miktarda besiyeri hazırlandıktan sonra, otoklavda 121 °C, 1.5 atm basınçta sterilize edildi.

#### **2.1.3.5. Gliserollü Besiyeri**

Proteaz üreticisi mikroorganizmaların uzun süreli saklanması amacıyla hazırlandı. Besiyeri içeriği: %20 gliserol bulunan Nutrient Broth besiyeridir. Gerekli miktarda besiyeri hazırlandıktan sonra, otoklavda 121 °C, 1.5 atm basınçta sterilize edildi.

#### **2.1.3.6. Enzim Üretim Besiyeri**

Gessesse ve ark. (1997) tarafından belirlenen sıvı besiyeri modifiye edilerek kullanıldı[130].Besiyeri içeriği; kazein ( 5 g/L), pepton ( 5 g/L), maya özütü (2 g/L),

NaCl (5 g/L), MgSO<sub>4</sub> (0.2 g/L), CaCl<sub>2</sub> (0.1 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1g/L), distile su (1000 mL)'dir. Gerekli miktarda besiyeri hazırlandıktan sonra, otoklavda 121 °C, 1.5 atm basınçta sterilize edildi.

#### **2.1.4. Kullanılan Çözelti ve Reaktifler**

##### **2.1.4.1. 2N NaOH Tampon Çözeltisi**

Besiyeri pH'larının ayarlanması için hazırlandı. 8 gr NaOH tartılıp 100 mL distile suda çözdürüldü.

##### **2.1.4.2. 1N HCl Tampon Çözeltisi**

Besiyeri pH'larının ayarlanması için hazırlandı. 8.31 mL %37'lik HCl alınıp son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

##### **2.1.4.3. 50 mM Fosfat Tamponu (pH 7.3)**

Diyaliz işlemlerinde kullanıldı. 6.8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartıldı, 8.7 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tartıldı, 1000 mL distile suda çözüldü.

##### **2.1.4.4. 10 mM NaCl içeren 50 mM Fosfat Tamponu (pH 7.3)**

Kromatografi işlemlerinde kullanıldı. 0.292 gr NaCl tartıldı, 500 m M 50 mM fosfat Tamponu (pH 7.3) içerisinde çözüldü.

#### **2.1.4.5. 100 mM NaCl içeren 50 mM Fosfat Tamponu (pH 7.3)**

Kromatografi işlemlerinde kullanıldı. 2.92 gr NaCl tartıldı, 500 m M 50 mM fosfat Tamponu (pH 7.3) içerisinde çözüldü.

#### **2.1.4.6. 1M NaCl içeren 50 mM Fosfat Tamponu (pH 7.3)**

Kromatografi işlemlerinde kullanıldı. 29.22 gr NaCl tartıldı, 500 m M 50 mM fosfat Tamponu (pH 7.3) içerisinde çözüldü.

#### **2.1.4.7. Metil Red Reaktifinin Hazırlanması**

0.1 g metil kırmızısı maddesi tartıldı. 300ml %95'lik etanol içerisinde çözüldü. 200ml distile su eklenerek son hacim 500mL'ye tamamlandı.

#### **2.1.4.8. Voges-Proskauer Reaktifinin Hazırlanması**

%5'lik a-naftol çözeltisi; (5 g)  $\alpha$ -Naftol bir miktar (10-15 mL) saf etil alkol içinde çözüldü. Saf etil alkol ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı. %40'lık KOH çözeltisi; 40g KOH tartıldı. 100mL distile su içerisinde çözüldü.

#### **2.1.4.9. %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Hazırlanması**

Katalaz testi için hazırlandı. %30'luk hidrojen peroksitten (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 1 mL alınıp 10 mL'ye distile su ile tamamlandı.

#### **2.1.4.10. %5'lik Malaşit Yeşili Çözeltisinin Hazırlanması**

Spor boyama için hazırlandı. 5 g malaşit yeşili oksalat, 100 mL distile su ile yavaşca eklenerek çözüldü, filtreden geçirilerek kullanıldı.

#### **2.1.4.11. Bradford Reaktifinin Hazırlanması**

Toplam protein miktarının tayininde kullanıldı. 100 mg Coomassie Blue G-250 tartıldı. 50 mL%95'lik etanol ve 100 mL%85'lik fosforik asit eklendi. Son hacim 1000 mL'ye tamamlandı.

### **2.1.5. DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler**

#### **2.1.5.1. 50 mM Tris-EDTA tamponu (pH 8.0)**

0,3 g Tris ve 0,008g EDTA tartıldı, 250 mL distile suda çözüldü.

#### **2.1.5.2. %10'luk SDS**

1 g SDS tartılarak 10 mL distile suda çözüldü.

#### **2.1.5.3. 5M NaCl çözeltisi**

2 g NaCl tartılarak 10 mL distile suda çözüldü.

#### **2.1.5.4. CTAB / NaCl çözeltisi**

0,41 g NaCl 9 mL distile suda çözüldü. Üzerine 1 g CTAB yavaşça eklendi. Toplam hacim distile su ile 10 mL ye tamamlandı.

#### **2.1.5.5. Kloroform/İzoamilalkol Çözeltisi**

9,6 mL kloroform ile 0,4 mL izoamilalkol karıştırıldı.

#### **2.1.5.6. Kloroform / İzoamilalkol / Fenol Çözeltisi**

10 g fenol 10 mL 1M Tris-HCl (pH 8.0) tamponunda çözüldü. 2 saat beklendi. Süre sonunda oluşan üst faz uzaklaştırıldı. Alt faza yeniden 10 mL 1M Tris-HCl (pH 8.0) tamponu eklendi. 5-6 dakika beklendi. Üst faz uzaklaştırıldı. Bu işlem 3-4 kez tekrarlandı.

#### **2.1.5.7. %70'lik etanol**

7 mL %100 etanol ile 3 mL distile karıştırıldı.

### **2.1.6. Agaroz Jel Elektoroforezinde Kullanılan Çözeltiler**

#### **2.1.6.1. 10X TBE tamponu**

108 g Trisma Base, 55 g Borik asit ve 40 mL 0,5M EDTA ddH<sub>2</sub>O ile 1000mL'ye tamamlandı. Agaroz jel elektroforezi için 1X konsantrasyonda seyreltilerek kullanıldı.



### **2.1.6.2. Agaroz Çözeltisi Hazırlanması**

%1'lik agaroz çözeltisi 30 mL hacim alan elektroforez tablası için; 0.3 g agaroz tartılıp 30 mL 1X TBE ile karıştırılarak mikrodalgada çözüldü. %1.5'luk agaroz çözeltisi için; 30 mL hacim alan elektroforez tablası için; 0.45 g agaroz tartılıp 30 mL 1X TBE ile karıştırılarak mikrodalgada çözüldü. %2.5'luk agaroz çözeltisi için; 30 mL hacim alan elektroforez tablası için; 0.75 g agaroz tartılıp 30 mL 1X TBE ile karıştırılarak mikrodalgada çözüldü.

### **2.1.6.3. Etidium Bromide Çözeltisi**

0,05mg EtBr tartılıp 100 mL distile suda çözüldü.

### **2.1.6.4. 6x Yükleme Tamponu (10 mL)**

4 g sukroz, 0,25 g brom fenol mavisi 4 mL distile suda çözüldü. Üzerine 6 mL 10X TBE tamponundan eklendi.

## **2.1.7. Proteaz Aktivitesi Hesaplanmasında Kullanılan Çözelti ve Tamponlar**

### **2.1.7.1. TCA Çözeltisi**

1,633g TCA ve 1,8g sodyum asetat 98mL distile suda çözüldü. 1,88ml asetik asit 100mL distile suyun içerisinde çözümlenerek bu çözeltiden TCA ve sodyum asetat çözeltisine 2 mL eklendi ve son hacim 100mL'ye tamamlandı.

#### **2.1.7.2. 50mM Glisin-NaOH Tamponu (pH 9.0)**

0,375 g glisin 90 mL distile suda çözüldü. 2N NaOH çözeltisi ile pH9.0'a çıkarılarak son hacim 100mL'ye tamamlandı.

#### **2.1.7.3. 2N NaOH Çözeltisi (pH 9.0)**

8 g NaOH 100 mL distile suda çözdürüldü.

#### **2.1.7.4. %0.6'lık kazein çözeltisi**

0,6 g kazein 100mL 50mM glisin-NaOH tamponuna (pH 9.0) eklendi.

#### **2.1.7.5. 0,5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Çözeltisi**

3g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mL distile suda çözüldü.

#### **2.1.7.6. 1N Folin-Ciocalteu Çözeltisi**

2N Folin-ciocalteu reaktifi 1:1 oranında distile su ile karıştırıldı.

#### **2.1.8. SDS PAGE Analizinde Kullanılan Çözeltiler**

##### **2.1.8.1. (%30'luk)Akrilamid Bisakrilamid Karışımı**

29,2 g akrilamid ve 0.8 g bisakrilamid tartıldı, 100 mL distile suda çözüldü.

#### **2.1.8.2. 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)**

9,085 g Tris tartılıp 40 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl solüsyonu ile pH8.8'e getirildi. Toplam hacim 50 mL 'ye tamamlandı.

#### **2.1.8.3. APS (%10)**

1 g amonyum persülfat tartılıp 10 mL distile suda çözüldü.

#### **2.1.8.4. SDS(%10)**

2 g SDS tartılıp 20 mL distile suda çözüldü.

#### **2.1.8.5. 0.5 M Tris-HCl (pH6.8)**

3 g Tris tartılıp 40 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl solüsyonu ile (pH 6.8)'e getirildi. Toplam hacim 50 mL 'ye tamamlandı.

#### **2.1.8.6. Gliserol(%50)**

5 mL gliserol 5 mL distile suda çözüldü.

#### **2.1.8.7. Brom fenol mavisi(%1)**

1 g brom fenol mavisi 100 mL distile suda çözüldü.

#### **2.1.8.8. Tespit Çözeltisi**

500 mL %95 etanol, 100 mL asetik asit, 400 mL distile ile su karıştırıldı.

#### **2.1.8.9. Tespit Yıkama Çözeltisi**

500 mL metanol, 100 mL asetik asit, 400 mL distile su ile karıştırıldı.

#### **2.1.8.10. Coomassie Brilliant Blue boya Çözeltisi**

0.5 gCoomassie Brilliant Blue tartıldı, 100 mL metanol, 50 mL asetik asit, 350 mL distile su ile karıştırıldı.

#### **2.1.8.11.Boya Giderimi Çözeltisi**

500 mL metanol, 100 mL asetik asit, 400 mL distile su ile karıştırıldı.

## **2.2. METOT**

### **2.2.1. Proteaz Üreticisi Mikroorganizmaların İzolasyonu**

#### **2.2.1.1. Örnek Alımı**

Kırıkkale Üniversitesi Kampüsü yakınlarında, organik atıkların bulunduğu bölgeden (39.8768315 – 33.4404054), toprak yüzeyinin 2 cm derinliğinde, toprak örneği alındı.

Toprak örneği, steril bir falkon tüpünün içerisine, steril spatula yardımıyla konuldu. Stabilitésinin korunması için 1g toprak örneğine 1mL steril serum fizyolojik (%0.9 NaCl) eklendi. Bu oran ana stok olarak hazırlandı. Ana stok +4°C’de muhafaza edilerek saklandı.

#### **2.2.1.2. Proteaz Üreticisi Mikroorganizmaların İzolasyonu**

Proteaz üreticisi mikroorganizmaların izolasyonu amacıyla, ana stoktan steril serum fizyolojik (%0.9 NaCl) ile 1/10 seri seyreltmeler yapıldı. Her bir seyreltilmiş tüpten 100 µL alınarak bölüm 2.1.3.3.’de anlatılan Skimmilk Agar Besiyeri’ne yayma ekim yapıldı ve 37°C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda, etrafında proteolitik zon oluşturan koloniler, proteaz üreticisi olarak kabul edildi. İzolatlar, içerisinde %10 skimmilk bulunan Nutrient Agar’a tek koloni yöntemiyle ekilerek saflaştırıldı.

#### **2.2.1.3. Stok Kültürün Saklanması**

Stok kültürler için bölüm 2.1.3.4.’de anlatılan N1 agar besiyeri hazırlandı. Saflaştırılan izolatlar N1 agar besiyerine ekilerek 37°C’de 24 saat inkübasyon sonucunda etüvden alınarak +4°C ‘de saklandı. Uzun süreli saklama için bölüm 2.1.3.5.’de anlatılan gliserollü besiyeri kullanıldı. Nutrient Brothbesiyerinde 18 saat

(logaritmik faz) inkübe edilen izolatlar, gliserollü besiyerine ekilerek -20°C’de saklandı.

## **2.2.2. Proteaz Üreticisi Mikroorganizmaların İdentifikasyonu**

### **2.2.2.1. Mikroorganizmaların Makroskobik Özelliklerinin Belirlenmesi**

İzole edilen ve saflaştırılan proteaz üreticisi izolatların identifikasyonu için, ilk olarak makroskobik özellikleri incelendi. Bunun için; N1 agar besiyerinde 37°C ‘de 24 saat inkübe edilen mikroorganizmaların oluşturdukları koloni morfolojileri incelendi. Koloni morfolojileri için; koloni tipi, koloni yüzey dokusu, koloni şekli, koloni kenarlarının şekli, koloni yüksekliği, koloni rengi gibi özellikler araştırıldı.

### **2.2.2.2. Mikroorganizmaların Mikroskobik Özelliklerinin Belirlenmesi**

Makroskobik özellikler belirlendikten sonra mikroskobik özellikleri incelendi. Mikroskobik özellikler için; gram boyama ve spor boyama yapıldı.

#### **2.2.2.2.1. Gram Boyama**

Sıvı bakteri kültüründen bir damla lamın üzerine alındı, yayıldı ve bunzen bekinin üzerinde kurutularak tespit edildi. Fiksasyon işleminin tamamlanmasıyla hazırlanan preparatın üzerine kristal viyole damlatılarak 1 dakika beklendi. Süre sonunda preparat yıkandı. Lugol damlatıldı ve 1 dakikabekletildi. Süre sonunda preparat yıkandı. %96’lık etil alkol damlatıldı ve 15 saniye bekletilerek yıkandı. Son olarak bazik fuksin damlatılarak 30 saniye bekletildi ve yıkandı. Preparat mikroskopta (100X) immersiyon yağı damlatılarak incelendi. Gram negatif bakteri hücreleri pembe, gram pozitif bakteri hücreleri mor olarak gözlemlendi.

Gram boyama ile birlikte, izolatların gram özelliği, hücrelerin şekli(kok, basil, spiral vs) ve dolaylı olarak spor varlığına bakıldı (sporlar boyaya dirençli oldukları için boyayı hücre içine almazlar ve şeffaf görünürler.)

#### **2.2.2.2.2. Spor Boyama**

Spor boyama için Schaffer fulton yöntemi kullanıldı [131]. Sıvı ortamda üretilen bakteri kültüründen bir damla lamın üzerine alındı, yayıldı ve bunzen bekinin üzerinde kurutularak tespit edilidi. Fiksasyon işleminin tamamlanmasıyla hazırlanan preparatın üzerine bölüm 2.1.4.10'da anlatılan %5'lik malaşit yeşili boya çözeltisindendamlatıldıve kısık ateşte 5 dakika ısıtıldı. İşlem sonunda preparat yıkandı. Bazik fuksin damlatıldı ve 30 saniye beklendi. Süre sonunda preparat yıkandı ve immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta (100X) incelendi. Endosporlar yeşil renk, vejetatif kısım ise pembe renkte gözlemlendi.

Spor boyama ile birlikte; spor varlığı, spor şekli, spor pozisyonu (sentral, subterminal, terminal vs.) gibi özelliklere bakıldı.

#### **2.2.2.3. Mikroorganizmaların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi**

Mikroorganizmaların fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi için gelişim gösterdikleri sıcaklık ve pH aralığı ve optimal gelişim gösterdikleri sıcaklık ve pH koşulları belirlendi. Üreme eğrileri çizildi.

##### **2.2.2.3.1. Sıcaklık ve pH'ın Mikroorganizma Üremesine Etkisinin Belirlenmesi**

17°C, 27°C, 37°C ve 50°C olmak üzere 4 farklı sıcaklık değeri araştırıldı ve her bir sıcaklık değerinde farklı pH koşullarında (pH 5.0, pH 7.0, pH 9.0 ve pH 12.0) besiyerleri hazırlandı. Besiyeri pH'ları 2N NaOH ve 1N HCl tampon çözeltileri ile ayarlandı. Mikroorganizmalar %5 inokulum ile Nutrient Broth besiyerinde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonları tamamlandığında; bulanıklık oluşturup

oluşturmamalarına göre kalitatif olarak gelişimleri gözlemlendi. Kontrol olarak saf Nutrient Broth besiyeri kullanıldı.

Optimal gelişim gösterdikleri sıcaklık ve pH koşulunun belirlenmesi için; her bir üreme ortamından mikropalakalara 200 µL alınarak, 620 nm'deki absorbans değerleri plak okuyucuda (Biotek, PowerWave XS2) okundu. En yüksek değer elde edildiği ortam koşulu optimum olarak kabul edildi.

#### **2.2.2.3.2. Üreme Eğrisinin Belirlenmesi**

Bir gece canlandırılan taze kültürler 25 mL'lik erlenlere %5 inokulum ile ekildi. İnkübasyon 37°C'de gerçekleşti. Belirli saatlerde (6. saat, 12. saat, 16. saat, 18. saat, 19. saat, 24. saat) kültürden 300 µL örnek alınarak mikropalakaya aktarıldı ve 620 nm'de absorbansları okundu. Elde edilen OD değerleri ile üreme eğrisi grafiği oluşturuldu.

#### **2.2.2.4. Mikroorganizmaların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi**

Mikroorganizmaların biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için indol testi, metil kırmızısı testi, Voges Proskauer testi ve sitrat testi (IMViC), katalaz testi, nişasta hidroliz testi ve jelatin hidroliz testi yapıldı.

##### **2.2.2.4.1. İndol Testi**

İncelenecek bakteri kolonisinden 1 öze alındı, 5 mL Dev Triptofan Broth besiyerine ekim yapıldı. 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüplere 0.5 mL Kovacs ayırıcından damlatıldı. Kırmızı renk halka oluşumu pozitif, ayırıcının kendi rengi olan sarı renk oluşumu ise negatif olarak kabul edildi.



#### **2.2.2.4.2. Metil Red Testi**

İncelenek bakteri kolonisinden 1 öze alındı, 5 mL steril MR –VP Broth (Merck 105712) besiyeri içeren tüplere ekim yapıldı. 37°C’de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüplere 1 mL bölüm 2.1.4.7’de anlatılan metil kırmızısı reaktifinden damlatıldı. Kırmızı renk oluşumu pozitif, sarı renk oluşumu negatif olarak değerlendirildi.

#### **2.2.2.4.3. Voges-Proskauer Testi**

İncelenek bakteri kolonisinden 1 öze alındı, 5 mL steril MR –VP Broth (Merck 105712) besiyeri içeren tüplere ekim yapıldı. 37°C’de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüplere 3mL bölüm 2.1.4.8.’de anlatılan %5’lik  $\alpha$ -naftol çözeltisi ardından 1mL %40’lık KOH çözeltisi damlatıldı. Kırmızı renk oluşumu pozitif, sarı renk oluşumu negatif olarak değerlendirildi.

#### **2.2.2.4.4. Sitrat Testi**

5mL SIMMONS citrate agar (Merck 102501) besiyeri içeren tüpler otoklavlandı. Yatık agar olacak şekilde soğumaya bırakıldı. Soğuyan tüplere incelenecek bakteri kültüründen bir öze alınarak besiyeri yüzeyine ekim yapıldı. 37°C’de 5 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda besiyerinin mavi olması pozitif, yeşil olması negatif olarak değerlendirildi.

#### **2.2.2.4.5. Nişasta Hidrolizasyon Testi**

Mikroorganizmalar %10 nişasta içeren Nutrient Agar’a ekildi. 37 °C’de 2 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonucubirkaç damla Lugol ayırıcı damlatıldı. Mavi-mor renk oluşumuAmilaz(-) negatif, lugolün kendi rengi olan sarı renk oluşumu ise Amilaz (+) pozitif olarak değerlendirildi.

#### **2.2.2.4.6. Jelatin Hidrolizasyon Testi**

5mL %10 jelatin içeren Nutrient Broth içeren tüplere iğne uçlu öze iledik olarak ekim yapıldı. 37°C'de 7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kültürler buzdolabına kaldırıldı ve 1-2 saat soğuması için bekletildi. Süre sonunda sıvı ortam jelatin hidrolizi (+), katı ortam jelatin hidrolizi (-) olarak değerlendirildi.

#### **2.2.2.4.7. Katalaz Testi**

Nutrient Agar besiyerinde 37°C'de 1 gün inkübe edilen kültürden bir öze alındı ve lam üzerine aktarıldı. Üzerine bölüm 2.1.4.9.'da anlatılan %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisinden 3 damla eklendi. 10 saniye içerisinde gaz kabarcıklarının görülmesi katalaz (+), görülmemesi (-) olarak değerlendirildi.

#### **2.2.2.5. Mikroorganizmaların Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi**

##### **2.2.2.5.1. DNA İzolasyonu**

Genomik DNA izolasyonu Cutting ve Horn (1990) protokolüne göre yapıldı [107]. Protokole göre; 25 mL Nutrient Broth sıvı besiyerine tek koloniden ekim yapıp 37°C'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1,5 mL bakteri kültürleri santrifüj tüplerine konuldu ve 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Bakteri kültürü eklenmesi ve santrifügasyon işlemi 2-3 kez tekrarlandı. Santrifüj sonrası pelete 400 µL 50 mM Tris-EDTA tamponu (pH 8.0) eklenerek vortekslendi. 30 µL SDS ve 3 µL proteinaz K konuldu ve 37°C'de 1 saat bekletildi. Süre sonunda 100 µL 5M NaCl çözeltisi eklendi ve tüpler birkaç kez alt-üst edildi. 80 µL CTAB / NaCl çözeltisi eklenerek 65°C'de 10 dakika inkübe edildi. Tüpte meydana gelen toplam hacim kadar kloroform/izoamilalokol çözeltisi konuldu. 10,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 2-3 kez tekrarlandı. Süpernatant temiz tüpe aktarıldı. Süpernatantın toplam hacminin 0.6 katı kadar izopropanol eklendi. Tüpler alt-üst edildi. 15,000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Pelete 50 µL %70'lik etanol

konularak kurutuldu. Üzerine 50 µL 50 mM Tris-EDTA tamponu (pH 8.0) eklenerek izole edilen DNA, +4 °C’de saklandı.

İzole edilen DNA moleküllerinin saflığı ve bütünlüğü agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Bunun için 4µL boya çözeltisi 2µLDNA örneği ile karıştırılarak kuyucuklara yükleme yapıldı. DNA örnekleri 1kb Ladder (ThermoFisher Scientific Cat NO: M7508) kullanılarak %1’lik agaroz jelde, 80 voltta, 1 saat olacak şekilde agaroz jel elektroforezinde yürütüldü.

#### 2.2.2.5.2.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

İzole edilen DNA örneklerinin 16S rRNA gen bölgesi, PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile amplifiye edildi. Primer olarak 16S rRNA gen sekansına (GenBank) göre sentezlenmiş olan iki evrensel oligonükleotid primer çifti, 27 F primer: 5' CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ve 1492 R primer: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' kullanıldı [132, 133]. Primerlerin Tm özellikleri ve literatür verileri baz alınarak bir PZR karışımı ve PZR programı oluşturuldu. PZR karışımının hazırlanması Çizelge 2.1.’de, termal döngü programı Çizelge 2.2.’de gösterildi.

#### Çizelge 2.1.PZR programı

PZR Reaktifleri	Miktar (µL)
10X PZR Buffer	1,5 µL
dNTP (2.5mM)	0,7 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM )	1,2 µL
Taq DNA Polimeraz (5U/µL)	0,1 µL
Primer F (10 pmol/µL)	0,5 µL
Primer R (10 pmol/µL)	0,5 µL
dH <sub>2</sub> O	8,5 µL
DNA	2,0 µL
Toplam	15 µL

**Çizelge 2.2.** PZR termal döngü programı

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön Isıtma	95 °C	5 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	45 saniye	
Primerlerin Bağlanması	50 °C	45 saniye	28
Uzama	72 °C	1 dakika	
Zincir Sentezi ve Soğutma	72 °C	5 dakika	1

PZR sonucunda elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. 4µL boya çözeltilisi 3 µL PZR ürünü ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. 1kb'lık (ThermoFisher Scientific Cat NO: M7508) DNA markeri kullanıldı. Yürütme % 1.5'luk agaroz jelde, 80 Volt'ta, 1 saat gerçekleşti. Süre sonunda jel, jel dökümantasyon sisteminde görüntülenerek, bantların varlığı ve büyüklükleri belirlendi. Elde edilen PZR ürünleri -20°C'de saklandı.

### 2.2.2.5.3. PZR Optimizasyonu

PZR optimizasyonu için farklı bağlanma sıcaklıkları ve farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları araştırıldı. Bağlanma sıcaklıkları; 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C ve 55°C; MgCl<sub>2</sub> final konsantrasyonları ise 1.0 mM, 1.33 mM, 1.67 mM, 2 mM ve 2.33 mM olarak belirlendi.

PZR optimizasyonu sonucunda elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. 4µL boya çözeltilisi 3 µL PZR ürünü ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. 1kb'lık (ThermoFisher Scientific Cat NO: M7508) DNA markeri kullanıldı. Yürütme % 1.5'luk agaroz jelde, 80 Volt'ta 1 saat gerçekleştirildi. Süre sonunda jel, jel dökümantasyon sisteminde görüntülenerek, bantların varlığı ve büyüklükleri belirlendi. Elde edilen PZR ürünleri sekans analizi yapılana kadar -20°C'de saklandı.

#### **2.2.2.5.4. 16S rRNA geni dizi analizi ve Filogenetik Analiz**

PZR ürünlerinin 16S rRNA gen bölgelerine yönelik sekans analizi, Medsantek firmasından hizmet alımı ile şekilde yapıldı. Sekans analizi sonucunda elde edilen DNA dizilerinin, daha önce çalışılmış mevcut referans suşlarla homolojilerinin araştırılması için, National Center of Biotechnology Information (NCBI) internet sitesindeki BLAST programı kullanıldı. 16S rRNA veritabanındaki sonuçlar ile kıyaslandı. Filogenetik analiz için GenBank veritabanından ilk 14 farklı tür seçildi. İzolat ve standart suşların 16S rRNA gen dizileri MEGA 7.0 programında Muscle seçeneği kullanılarak hizalandı. Filogenetik ağaç, MEGA 7.0 programı kullanılarak neighbour-joining metodu ile oluşturuldu ve izolatların birbirleriyle yakınlık dereceleri ortaya konuldu[134]. Uzaklık matrisi Jukes ve Cantor 'un (1969) algoritması temel alınarak hesaplandı[135]. Sonuçlar istatistiksel güvenilirlik için Bootstrap numunelemesi (1000 replicates) ile değerlendirildi.

#### **2.2.2.5.5. ARDRA(Amplifiye edilmiş Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi)**

Amplifiye edilmiş Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi'de AluI, HaeIII ve TaqI, restriksiyon enzimleri (ThermoFisher Cat. NO:ER0011, ER0151, ER0671) kullanıldı. Kalıp DNA olarak ise 16S rRNA geninin 27F-1492R primerleriyle çoğaltılmasıyla elde edilen PZR ürünleri incelendi. PZR ürünleri restriksiyon enzimleriyle ayrı ayrı kesim reaksiyonuna tabi tutuldu.

AluI (10U/μL) enziminin kesim reaksiyonunda firma tarafından temin edilen 10X Tango Buffer kullanıldı. İnkübasyon 37°C'de 3 saat gerçekleştirildi. HaeIII (10U/μL) enziminin kesim reaksiyonunda firma tarafından temin edilen 10X Buffer R kullanıldı. İnkübasyon 37°C'de 3 saat gerçekleştirildi. TaqI (10U/μL) enziminin kesim reaksiyonunda firma tarafından temin edilen 10X Buffer TaqI kullanıldı. İnkübasyon 65°C'de 3 saat gerçekleştirildi. Restriksiyon enzimlerinin kesim protokolü Çizelge 2.3'de gösterildi.

**Çizelge 2.3.** Restriksiyon enzimlerinin kesim protokolü

Restriksiyon Enzimi	Miktar( $\mu$ L)
AluI (10U/ $\mu$ L)	
HaeIII (10U/ $\mu$ L)	2 $\mu$ L
TaqI (10U/ $\mu$ L)	
Reaksiyon Tamponu	
10X Tango Buffer	
10X Buffer R	2 $\mu$ L
10X Buffer TaqI	
PZR ürünü	10 $\mu$ L
dH <sub>2</sub> O	18 $\mu$ L

Amplifiye edilmiş Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi sonucunda elde edilen ürünlerin 7 $\mu$ L'si ile 5  $\mu$ L boya çözeltisi karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. 100 bp Ladder BIOMATİK (Cat NO: M7213) kullanıldı. Yürütme % 2.5'luk agaroz jelde, 100 Volt'ta, 1 saat gerçekleştirildi. Süre sonunda jel, jel dökümantasyon sisteminde görüntülenerek, bant sayıları ve büyüklükleri belirlendi. Enzim kesim bantlarının sayısı ve büyüklüğüne göre izolatlar, standart bakteriler ile karşılaştırıldı ve belirli taksonomik gruplara ayrıldı [136].

#### 2.2.2.5.6. Agaroz jel elektroforezi

DNA izolasyonu, PZR ve PZR optimizasyonu ve ARDRA yönteminden sonra elde edilen örnekler agaroz jel elektroforezine yüklendi. DNA izolasyonu için %1'lik, PZR ve PZR optimizasyonu için %1.5'luk, ARDRA yöntemi için %2,5'luk agaroz kullanıldı. Hazırlanan agaroz çözeltileri mikrodalgada çözdürüldü. Soğumaya başlayınca 7  $\mu$ L EtBr çözeltisi eklendi. Elektroforez tablasına kenarından yavaşça akıtıldı. Hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi. Taraklar yerleştirildi. Polimerizasyon için 30 dakika beklendi. Süre sonunda taraklar çıkarıldı. Elektroforez tankına uygun miktar 1X TBE konuldu. Yükleme kuyucuklarına yapıldı. Voltaj ve saat ayarları düzenlenip cihaz çalıştırıldı.

### **2.2.3. Proteaz Enzimi Üretimi**

Mikroorganizmalar Nutrient Broth besiyerinde 37°C’de 18 saat(logaritmik faz) inkübe edildi. Mikroplaka okuyucada 620 nm’de absorbansları 0.1-0.3 OD aralığında eşitlendi. %5 inokulum ile bölüm 2.2.3.6’de anlatılan enzim üretimi besiyerine ekildi. 27°C, pH7.0’de, 160 rpm’de, 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kültürler +4°C’de 5000 rpm’de, 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ham homojenat olarak adlandırıldı. Ham homojenat proteaz kaynağı olarak kullanıldı.

#### **2.2.3.1. Proteaz Aktivitesinin Kalitatif Hesaplanması**

Proteaz üretiminin kalitatif analizi için bölüm 2.2.3.6’de anlatılan besiyeri kullanıldı. İzolatlar, zon çaplarının iyi belirlenebilmesi için besiyerinin ortasına ekildi. İnkübasyon 27°C’de, pH7.0, 72 saat gerçekleşti. İnkübasyon sonunda oluşan proteolitik zon çapları mm cinsinden ölçülerek karşılaştırıldı.

#### **2.2.3.2. Proteaz Aktivitesinin Kantitatif Hesaplanması**

Proteaz aktivitesinin belirlenmesinde Takami ve ark. (1989) uygulamış olduğu yöntem kullanıldı. Kazein %0.6 oranında 50 mM glisin-NaOH(pH9.0) tamponu içerisine eklendi. Proteaz kaynağı içeren ham homojenatın 0.1 mL’si, oluşturulan kazeinli glisin-NaOH çözeltisinin 0.5 mL’si ile bir tüpe eklenerek 20 dakika 37°C’de inkübe edildi. Süre sonunda hidroliz reaksiyonunun durdurulması için 0.5mL TCA çözeltisi eklendi ve 20 dakika oda koşullarında inkübe edildi. Süre sonunda +4°C’de 12.000 rpm’de 7 dakika santrifüj edildi. Oluşan süpernatantın 25 µL’si mikropalakaya alındı. Üzerine sırasıyla 125 µL 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 25 µL 1N Folin-Ciocalteu’s Phenol reaktifi eklendi. 30 dakika oda koşullarında inkübe edildi. Mikroplaka okuyucudaabsorbans değerleri 660 nm’de okundu. Kör tüp olarak içerisinde ham

homojenat bulunmayan çözelti kullanıldı. Her ölçüm 3 kez tekrar edilerek ortalama değeri alındı. Bulunan değerler proteaz aktivitesinin hesaplanması için kullanılan formülde OD(optik yoğunluk) kısmına yazıldı.

#### **2.2.3.2.1. Enzim Ünitesi Tanımı**

Bir ünite proteaz aktivitesi (U/mL); 37 °C'de, pH9.0'da gerçekleşen hidroliz reaksiyonunda %0.6 kazeinden 1 dakikada 1 µg tirozinin açığa çıkması için gerekli enzim miktarı olarak tanımlandı. Aktivitenin hesaplanması için

$$\text{Proteaz Aktivitesi (U/mL)} = \frac{[(\text{OD}_{660}/\text{eğim}) \times \text{Toplam Hacim (mL)}]}{[\text{Enzim Hacmi(mL)} \times \text{İnkübasyon Süresi(dak)}]} \quad (1)$$

formülü uygulandı.

#### **2.2.3.2.2. Tirozin Standart Grafiği**

Proteaz aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan tirozinin mikromolar ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi amacıyla tirozin standart grafiği oluşturuldu. Ana stok 10mg/mL hazırlandı. Tirozin, 50 mM glisin-NaOH(pH 9.0) tamponunda çözüldü. Stok çözeltilerden 5, 10, 20, 50,100, 150 ve 200 µg/mL olacak şekilde seyreltmeler yapıldı. Seyreltmelerden 25µL alınarak mikropalakaya aktarıldı. Üzerine sırasıyla 125 µL 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile 25 µL 1N Folin-Ciocalteu's Phenol (Sigma F9252) çözeltisi eklendi. Oda sıcaklığında 30dakika bekletildi. Kör tüp olarak 50 mM pH9.0 glisin-NaOH tamponu kullanıldı. Süre sonunda absorbans değerleri mikropalak okuyucuda 660 nm'de ölçüldü. Her ölçüm 3 kez tekrar edilerek ortalama değerleri alındı.Tirozinin mikromolar ekstinksiyon katsayısı, okutulan absorbansa karşı µM tirozin konsantrasyon eğrisinin eğiminden hesaplandı.Bu değer proteaz aktivitesi hesabında kullanıldı.



#### **2.2.4. Optimum Proteaz Üretiminde Gerçekleştiği Koşulların Belirlenmesi**

Proteaz üreticisi mikroorganizmaların tanımlanmasıyla, bu mikroorganizmalardan optimum proteaz enziminin üretildiği koşullar araştırıldı. Araştırılan koşullar; optimum sıcaklık ve pH koşulları, optimum inkübasyon süresi, optimum inokulum oranı ve optimum besiyeri ortamıdır.

##### **2.2.4.1. Proteaz Üretiminde Optimum Sıcaklık ve pH Koşullarının Belirlenmesi**

Mikroorganizmalar Nutrient Broth besiyerinde 37°C'de 18 saat (logaritmik faz) inkübe edildi. Mikroplaka okuyucada 620 nm'de absorbansları 0.1-0.3 OD aralığında eşitlendi. % 5 inokulum ile bölüm 2.1.3.6'de anlatılan enzim üretimi besiyerine ekildi. 17°C, 27°C, 37°C ve 50°C olmak üzere 4 farklı sıcaklık koşulu belirlendi, her bir sıcaklık değerinde farklı pH koşullarında (pH 7.0, pH 9.0, pH 12.0) besiyerleri hazırlandı. Mikroorganizmalar bu koşullarda, 24 saat, 48 saat ve 72 saat olmak üzere, 160 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda proteaz aktiviteleri bölüm 2.2.3.2'de anlatılan formül kullanılarak hesaplandı ve proteaz enziminin optimum üretildiği sıcaklık ve pH koşulları belirlendi.

##### **2.2.4.2. Proteaz Üretiminde Optimum İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi**

Mikroorganizmalar Nutrient Broth besiyerinde 37°C'de 18 saat (logaritmik faz) inkübe edildi. Mikroplaka okuyucada 620 nm'de absorbansları 0.1-0.3 OD aralığında eşitlendi. % 5 inokulum ile bölüm 2.1.3.6'de anlatılan enzim üretimi besiyerine ekildi ve optimum sıcaklık ve pH koşulu olan 27°C, pH 7.0 ve 160 rpm'de 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon süreleri sonunda proteaz aktiviteleri bölüm 2.2.3.2'de anlatılan formül kullanılarak hesaplandı ve proteaz enziminin optimum üretildiği inkübasyon süresi belirlendi.

#### **2.2.4.3. Proteaz Üretiminde Optimum İnokulum Miktarının(%) Belirlenmesi**

Mikroorganizmalar Nutrient Broth besiyerinde 37°C'de 18 saat(logaritmik faz) inkübe edildi. Mikroplaka okuyucada 620 nm'de absorbansları 0.1-0.3 OD aralığında eşitlendi. %1, %5, %10 ve %20inokulum ile bölüm 2.1.3.6'de anlatılan enzim üretimi besiyerine ekildi ve optimum sıcaklık, pH ve inkübasyon süresi koşulları olan 27°C, pH7.0, 160rpm ve 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda proteaz aktiviteleri bölüm 2.2.3.2'de anlatılan formül kullanılarak hesaplandıve proteaz enziminin optimum üretildiği inokulum oranı belirlendi.

#### **2.2.4.4. Proteaz Üretiminde Optimum Besiyeri Ortamının Belirlenmesi**

Mikroorganizmalar Nutrient Broth besiyerinde 37°C'de 18 saat (logaritmik faz) inkübe edildi. Mikroplaka okuyucada 620 nm'de absorbansları 0.1-0.3 OD aralığında eşitlendi. Absorbansları eşitlenen kültürler%5 inokulum ile hazırlanan farklı besiyerlerine ekildi ve optimum sıcaklık, pH ve inkübasyon süresi koşulları olan27°C, pH7.0, 160 rpm ve 72 saat inkübe edildi.Kontrol besiyeri olarak enzim üretim besiyeri seçildi.İnkübasyon sonunda proteaz aktiviteleri bölüm 2.2.3.2'de anlatılan formül kullanılarak hesaplandı.İlk olarak literatür taraması sonucu belirlenen enzim üretimi besiyerinin proteaz üretimini teşvik edici özelliği belirlendi. Bu amaçla enzim üretimi besiyeri Nutrient Broth besiyeri ile proteaz aktiviteleri açısından karşılaştırıldı. Optimum besiyeri ortamının belirlenmesi için farklı besiyerleri hazırlandı. Bu besiyerleri; optimize edilmiş enzim üretim besiyeri, tek azot kaynağı bulunan modifiye enzim üretim besiyeri, karbon kaynağı bulunan modifiye enzim üretimi besiyeridir.

##### **2.2.4.4.1. Optimize Enzim Üretim Besiyeri**

Enzim üretim besiyerinin optimizasyonu için; diğer bileşen konsantrasyonları sabit kalmak şartıyla, her bir bileşenin, besiyeri içerisindeki konsantrasyonları değiştirildi. Konsantrasyonlar; o bileşenin besiyerinde hiç bulunmaması, enzim üretim

besiyerindeki konsantrasyonunun 2 katı ve 5 katı konsantrasyonunda bulunması olmak üzere toplamda 3 farklı konsantrasyon oranı araştırıldı. Kontrol besiyeri olarak enzim üretim besiyeri seçildi. İnkübasyon sonunda proteaz aktiviteleri bölüm 2.2.3.2’de anlatılan formül kullanılarak hesaplandı.

#### **2.2.4.4.2. Tek Azot Kaynağı Bulunan Modifiye Enzim Üretim Besiyeri**

Enzim üretimi besiyerindeki inorganik bileşenler sabit kalmak şartıyla, organik kaynakların yerine tek azot kaynaklarının eklenmesiyle modifiye enzim üretim besiyeri oluşturuldu. Organik azot kaynakları (pepton, maya, et özütü, jelatin, kazein, skimmilk, üre, tripton ve soya unu) 5 g/L ve 12g/L olmak üzere 2 farklı konsantrasyonda incelendi. Kontrol olarak enzim üretim besiyeri kullanıldı. İnkübasyon sonunda proteaz aktiviteleri bölüm 2.2.3.2’de anlatılan formül kullanılarak hesaplandı.

#### **2.2.4.4.3. Karbon Kaynağı Bulunan Modifiye Enzim Üretim Besiyeri**

Enzim üretimi besiyerindeki tüm bileşenler sabit kalmak şartıyla, besiyerine karbon kaynaklarının ilavesiyle modifiye enzim üretim besiyeri oluşturuldu. Karbon kaynakları (glikoz, nişasta, laktoz, fruktoz, sükroz ve galaktoz) 1 g/L ve 5 g/L olmak üzere 2 farklı konsantrasyonda eklendi. Kontrol olarak enzim üretim besiyeri kullanıldı. İnkübasyon sonunda proteaz aktiviteleri bölüm 2.2.3.2’de anlatılan formül kullanılarak hesaplandı.

#### **2.2.4.5. RFLK03 Kodlu İzolatın Proteaz Aktivitesinin Referans Suşlar ile Karşılaştırılması**

*Bacillus cereus* ATCC 10876 ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633 izolatlarının aynı inkübasyon koşullarındaki proteaz aktiviteleri bölüm 2.2.3.2.'de anlatılan formül kullanılarak hesaplandı ve RFLK03 kodlu izolat ile karşılaştırıldı.

#### **2.2.5. Enzim Özelliklerinin Belirlenmesi**

##### **2.2.5.1.Enzimin Aktif Olduğu Sıcaklık Aralığının Belirlenmesi**

Enzimin aktif olduğu sıcaklık aralığının belirlenmesi amacıyla, üretilen proteaz enzimi 17°C, 27°C, 37°C, 50°C, 60°C, 70°C ve 80°C sıcaklık değerlerinde 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda proteaz aktivitesi bölüm 2.2.3.2'de anlatılan formül kullanılarak hesaplandı. Kontrol olarak, 50 mM glisin-NaOH (pH 9.0) tamponu kullanıldı. Tüm ölçümler 3 kez tekrarlanarak ortalama değerler alındı.

##### **2.2.5.2.Enzimin Aktif Olduğu pH Aralığının Belirlenmesi**

Enzimin aktif olduğu pH aralığının belirlenmesi amacıyla, üretilen proteaz enzimi pH 7.0, pH 8.0, pH 9.0, pH 10.0, pH 11.0 ve pH 12.0 koşullarında 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda proteaz aktivitesi bölüm 2.2.3.2'de anlatılan formül kullanılarak hesaplandı. Kontrol olarak, 50 mM glisin-NaOH (pH 9.0) tamponu kullanıldı. Tüm ölçümler 3 kez tekrarlanarak ortalama değerler alındı.

### **2.2.5.3.Metal iyonlarının Enzimin Çalışmasına Etkisinin Belirlenmesi**

Proteaz kaynağı içeren ham homojenatın 0.1 mL'si, %0.6 kazein içeren glisin-NaOH çözeltisinin(pH9.0)0.5 mL'si ile bir tüpe eklendi. Bu çözeltiliye son konsantrasyon 2 mM ve 10 mM olacak şekilde çeşitli metal iyonları (tek iyon değerlikli; Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> ve K<sup>+</sup>iki değerlikli; Co<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup>, Sr<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>, Pb<sup>+2</sup>,Ni<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup> ve Mg<sup>+2</sup>üç değerlikli; Al<sup>+3</sup>, Cr<sup>+3</sup> ve Fe<sup>+3</sup>) ilave edildi. 37°C'de, 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda proteaz aktivitesi bölüm 2.2.3.2'de anlatılan formül kullanılarak hesaplandı. Kontrol olarak, metal iyonu olmayan ortamkullanıldı. Tüm ölçümler 3 kez tekrarlanarak ortalama değerler alındı.

### **2.2.5.4. Organik Çözücülerin Enzimin Çalışmasına Etkisinin Belirlenmesi**

Proteaz kaynağı içeren ham homojenatın 0.1 mL'si, %0.6 kazein içeren glisin-NaOH çözeltisinin(pH 9.0)0.5 mL'si ile bir tüpe eklendi. Bu çözeltiliye son konsantrasyon %10 ve %25 olacak şekilde çeşitli organik çözücüler (Toluen, Heptan, Metanol, Aseton, DMSO, Etanol, 2-propanol, Hekzan, Asetonitril ve Benzen) ilave edildi. 37°C'de, 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda proteaz aktivitesi bölüm 2.2.3.2'de anlatılan formül kullanılarak hesaplandı. Kontrol olarak,içerisinde organik çözücü bulundurmeyen tüp kullanıldı.Tüm ölçümler 3 kez tekrarlanarak ortalama değerler alındı.

### **2.2.5.5.Çeşitli Kimyasalların Enzimin Çalışmasına Etkisinin Belirlenmesi**

Proteaz kaynağı içeren ham homojenatın 0.1 mL'si, %0.6 kazein içeren glisin-NaOH çözeltisinin(pH 9.0)0.5 mL'si ile bir tüpe eklendi. Bu çözeltiliye son konsantrasyon %1 ve %5 olacak şekilde çeşitli kimyasallar (Oksitleyici ajan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, deterjan olarak ise SDS) ilave edildi.37°C'de, 20 dakika inkübe edildi.İnkübasyon süresi sonunda proteaz aktivitesi bölüm 2.2.3.2'de anlatılan formül kullanılarak hesaplandı. Kontrol

olarak, içerisinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SDS bulunmayan tüp kullanıldı. Tüm ölçümler 3 kez tekrarlanarak ortalama değerler alındı.

#### **2.2.5.6. İnhibitörlerin Enzimin Çalışmasına Etkisinin Belirlenmesi**

Proteaz kaynağı içeren ham homojenatın 0.1 mL'si, %0.6 kazein içeren glisin-NaOH çözeltisinin (pH 9.0) 0.5 mL'si ile bir tüpe eklendi. Bu çözeltiye son konsantrasyon 2mM ve 5mM olacak şekilde çeşitli inhibitörler (PMSF, DPPH ve EDTA) ilave edildi. 37°C'de, 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda proteaz aktivitesi bölüm 2.2.3.2'de anlatılan formül kullanılarak hesaplandı. Kontrol olarak, içerisinde inhibitör bulunmayan tüp kullanıldı. Tüm ölçümler 3 kez tekrarlanarak ortalama değerler alındı.

#### **2.2.5.7. Substrat Özgüllüğü**

Proteaz kaynağı içeren ham homojenatın 0.1 mL'si, %0.6 substrat içeren glisin-NaOH çözeltisinin (pH 9.0) 0.5 mL'si ile bir tüpe eklendi. 37°C'de, 20 dakika inkübe edildi. Substrat olarak kazein, jelatin, BSA, ovalbumin ve soya unu kullanıldı. İnkübasyon süresi sonunda proteaz aktivitesi bölüm 2.2.3.2'de anlatılan formül kullanılarak hesaplandı. Kontrol olarak, kazeinin kullanıldığı tüp kabul edildi. Tüm ölçümler 3 kez tekrarlanarak ortalama değerler alındı.

#### **2.2.6. Enzimin Kısmi Saflaştırılması**

Enzimin kısmi saflaştırılması için sırasıyla; Santrifügasyon, Çöktürme, Diyaliz ve İyon Değişimi Kromatografisi işlemleri uygulandı. Her bir basamak sonunda, saflaştırılan enzimin proteaz aktivitesi hesaplanarak saflaştırmanın proteaz aktivitesine etkisi araştırıldı.

### 2.2.6.1. Santrifüjasyon

Mikroorganizmalar Nutrient Broth besiyerinde 37°C’de 18 saat(logaritmik faz) inkübe edildi. Mikroplaka okuyucada 620 nm’de absorbansları 0.1-0.3 OD aralığında eşitlendi. Absorbansları eşitlenen mikroorganizmalar, %5 inokulum ile enzim üretimi besiyerine ekildi. 27°C, pH7.0’de, 160 rpm’de, 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kültürler +4°C’de 5.000 rpm’de, 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ham homojenat olarak adlandırıldı ve saflaştırma işlemlerine ham homojenat üzerinden devam edildi.

### 2.2.6.2. Çöktürme

Proteaz enziminin saflaştırılması ve konsantre edilmesi; ham homojenat üzerine gradient (%30-80) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (amonyum sülfat) eklenmesi ile gerçekleştirildi[137]. Eklenmesi gereken amonyum sülfat(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> miktarı şu formüle göre hesaplandı:

$$(NH_4)_2SO_4 \text{ Miktarı (g / 100 mL)} = [ 50,6 \times (S_2 - S_1) ] / [( 1 - 0,3 \times S_2)] \quad (2)$$

S<sub>2</sub>: Son Konsantrasyon

S<sub>1</sub>: İlk konsantrasyon

100 mL ham homojenat için 16.68 gr amonyum sülfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tartıldı ve yavaş yavaş eklenerek çözüldü. İşlem +4 °C ‘de yaklaşık 4 saatte gerçekleşti. Süre sonunda 11.000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatandan proteaz aktivitesi ve protein miktarı hesaplamaları için 2 mL örnek santrifüj tüplerine alındı. Pelet ise en az miktarda 50 mM fosfat tamponuyla (pH 7.3) çözülerek buzdolabında saklandı. Süpernatant sıvısına (98 mL) %80 çöktürme için gerekli olan amonyum sülfat miktarı eklendi. İşlem +4 °C ‘de bir gece boyunca gerçekleşti. Süre sonunda 11.000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatandan proteaz aktivitesi ve protein miktarı hesaplamaları için 2 mL örnek santrifüj tüplerine alındı. Pelet ise en az miktarda 50 mM fosfat tamponuyla (pH 7.3) çözdürülerek buzdolabında saklandı. Tüm peletler birleştirilerek diyaliz işlemine geçildi.

### 2.2.6.3. Diyaliz

Çalışmada kullanılan diyaliz torbası, (SIGMA Cat NO:D9527) molekül ağırlığı >12.000 Da proteini muhafaza edecek özelliğe sahiptir. Kullanımdan önce hazır hale getirilmesi için ürün bilgilerinde yer alan prosedüre göre işlemler yapıldı. Kullanılacak uzunluktaki diyaliz torbası kesildi ve gliserolün uzaklaşması 4 saat akan su ile yıkandı. Kükürt bileşiklerinin uzaklaşması için 80 °C'de 1 dakika %0.3'lük sodyum sülfat solüsyonunda kaynatıldı. 60 °C'deki sıcak su ile 2 dakika yıkandı. Asitlendirilme % 0.2'lik (v / v) sülfürik asit ile gerçekleştirildi. Asidin uzaklaştırılması için sıcak su ile durulandı. Diyaliz torbası kullanılmaya hazır hale getirildi.

Diyaliz işlemi için; diyaliz torbasına %30'luk ve %80'lik amonyum sülfat çöktürmesi işlemlerinde elde edilen toplam pelet konuldu. Yükleme yapılırken diyaliz torbasının tamponun üzerinde durabilmesi ve manyetik balıktan zarar görmemesi için biraz hava boşluğu bırakılmasına dikkat edildi. 500 mL'lik bir behere diyaliz torbasına yüklenen örnek hacminin 100 katı 50 mM fosfat tamponu (pH 7.3) eklendi. Diyaliz işlemi +4 °C'de, diyalizin ilk 12 saatinde her 6 saatte bir, 12 saatin sonunda gece boyu diyalize bırakıldı. Diyaliz süresinde manyetik karıştırıcının devir hızının yüksek olmamasına ve diyaliz torbasının tampon içerisinde olmasına dikkat edildi.

### 2.2.6.4. İyon Değişimi Kromatografisi

Diyaliz işlemi sonucu kısmi saflaştırılmış olan enzim çözeltisi DEAE-Sefaroz iyon değiştiriciden geçirildi. Bunun için 20mm çapında ve 400mm yüksekliğinde filtreli kolon kullanıldı. İlk olarak kolon 50 mM fosfat tamponu (pH 7.3) ile yıkandı. 50 mL kolon dolgu maddesine (DCL6B100 SİGMA) 10 katı hacminde 50 mM fosfat tamponu (pH 7.3) eklendi. Karışımdan 50 mL alınarak filtreli kolona kenarından, hava kabarcığı oluşmayacak şekilde, yavaşça boşaltıldı. Üzerine konulan dolgu maddesinin 5 katı olacak şekilde, 50 mM fosfat tamponu (pH 7.3) eklendi. Üst fazın oluşması beklendi. Üst faz dolgu maddesini kurutmayacak şekilde çok az bırakılarak



boşaltıldı. Üzerine diyaliz enzim çözeltisi yavaşça ortasına yüklendi. Üzerine 10 mL 50 mM fosfat tamponu (pH 7.3) eklendi. Bu tampon aynı zamanda NaCl içermeyen tampon çözeltisi olarak kabul edildi. Kolon vanası açılarak santrifüj tüplerine 1 mL/dakika akıtıldı. Her santrifüj tüpünün üzerine suş kodu, NaCl konsantrasyonu ve fraksiyon numarası yazıldı. Boşaltıldıktan sonra üzerine 10 mL 10 mM NaCl çözeltisi içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 7.3)eklendi. Kolon vanası açılarak santrifüj tüplerine 1 mL/dakika akıtıldı. Boşaltıldıktan sonra üzerine 10 mL 100 mM NaCl çözeltisi içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 7.3) eklendi. Kolon vanası açılarak santrifüj tüplerine 1 mL/dakika akıtıldı. Boşaltıldıktan sonra üzerine 10mL 1 M NaCl çözeltisi içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 7.3) eklendi. Kolon vanası açılarak santrifüj tüplerine 1 mL/dakika akıtıldı.En son kolon 50 mM fosfat tamponu pH 7.3 ile yıkanarak fraksiyonlar aktivite ve protein miktarı hesaplanması üzerine buzdolabında saklandı.

#### **2.2.6.5.Toplam Protein Miktarının Hesaplanması**

Toplam protein miktarı Bradford yöntemine göre hesaplandı [138].

Saflaştırma adımları sonrasında elde edilen protein örneklerinden 50 µL alınarak mikropalakaya aktarıldı. Üzerine 250 µL bölüm 2.1.4.11’de anlatılan Bradfordf reaktifi eklendi. 3 dakika bekletildikten sonra 595 nm’de absorbansları okutuldu. Elde edilen absorbanslar protein miktarı hesaplanması için yararlanılan formülde yerine yazılarak protein miktarları hesaplandı. Protein miktarının hesaplanmasında

$$\text{Protein Miktarı } (\mu\text{g/mL}) = [(A_{595} / \text{Eğim})] / 1000 \quad (3)$$

formülü kullanıldı.

##### **2.2.6.5.1. BSA Standart Grafiği**

BSA(Bovin Serum Albumin) mikromolar ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi amacıyla BSA standart grafiği oluşturuldu. Ana stok 1mg/mLhazırlandı. BSA, distile

suda çözdürüldü. Stok çözeltiden 10, 25, 50, 75, 100, 150,200 µg/mL olacak şekilde seyreltmeler yapıldı. Hazırlanan seyreltmelerden 50µL alınarak mikroplakaya aktarıldı. Üzerine 250µL Bradford reaktifi eklendi. 3 dakika bekletildikten sonra 595 nm’de absorbansı ölçüldü. Kör tüp olarak distile su kullanıldı. Her ölçüm 3 kez tekrar edilerek ortalama değerleri alındı.BSA mikromolar ekstinksiyon katsayısı, okutulan absorbansa karşı µM BSA konsantrasyon eğrisinin eğiminden hesaplandı.Bu değer protein miktarı hesabında kullanıldı.

### 2.2.6.6. SDS-PAGE

Saflaştırılan enzimin molekül kütlesi ve saflık kontrolünün tespiti için ham ekstrakt, diyaliz sonrası örnek ve DEAE selüloz kolonundan elüe edilen örnekler sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde yürütüldü (Çizelge 2.4.).

**Çizelge 2.4.**SDS PAGE analizi

Jeller ve Tamponlar	Bileşenler	Miktar (mL)
	Akrilamid Bisakrilamid Karışımı (%30'luk)	3,3 mL
Ayrırma Jeli (%10'luk)	1.5 M Tris-HCl (pH:8.8)	2,5 mL
	APS (%10'luk)	0,1 mL
	TEMED	0,005 mL
	SDS(%10'luk)	0,1 mL
	Su	4 mL
Örnek Yükleme Jeli (%4'lük)	Akrilamid Bisakrilamid Karışımı (%30'luk)	1,35 mL
	0.5 M Tris-HCl (pH: 6.8)	2,5 mL
	APS (%10'luk)	0,1 mL
	TEMED	0,005 mL
	SDS(%10'luk)	0,1 mL
	Su	6 mL
Yürütme Tamponu (5x)	Glisin: 48,3 gr SDS: 3 gr Tris: 9 gr Su: 600 mL	-
Örnek Yükleme Tamponu	0.5 M Tris-HCl (pH: 6.8)	0,6 mL
	Gliserol(%50)	2,5 mL
	SDS(%10'luk)	2 mL
	Brom fenol mavisi(%1)	1 mL
	Su	3,9 mL

SDS-PAGE analizi için ilk olarak tüm SDS-PAGE aparatları alkol ile yıkanıp durulandı. %10'luk ayırma jelinin hazırlanmasında en son TEMED eklendi. Ayırma jeli(%10'luk) hızlı bir şekilde 1 mm aralığındaki iki cam arasındaki boşluktan pipet yardımıyla camların  $\frac{3}{4}$ 'üne kadar döküldü. Bütanol ile üzeri düzleştirilirdive oksijen teması engellendi. 1 saat ayırma jelinin polimerleşmesi beklendi. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra bütanol kurutma kâğıdıyla uzaklaştırıldı. Örnek yükleme jeli (%4'lük) hazırlandı. Bileşenlerinden TEMED en son eklendi ve hızlı bir şekilde döküldü. Taraklar yerleştirildi. Polimerizasyon için 30 dakika beklendi. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra camlar elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankına yeterli miktarda yürütme tamponu(1x) konuldu. 10 µL örnek aynı miktardaki örnek yükleme tamponu çözeltisi ile birleştirilerek5 dakika kaynatıldı. Denatüre olan proteinler taraklar çıkarıldıktan sonra kuyucuklara yüklendi. Marker olarak protein standartı(ThermoFisher (Cat. NO:LC6801) kullanıldı. Yürütme 150Volt'ta 1 saat gerçekleştirildi.

Süre sonunda jeller iki cam arasından çıkarılıp tespit çözeltisine konuldu. 1 saat tespit edilen jel tespit yıkama çözeltisine alındı. Bir süre yıkandıktan sonra Coomassie Brilliant Blue boya çözeltisine aktarıldı. Hafifçe karıştırılarak 4 saat boyunca Coomassie Brilliant Blue boya çözeltisi içerisinde jeller boyandı. Süre sonunda jeller boya giderme çözeltisine alındı. Jellerin rengi açılana ve bantlar belli olana kadar yaklaşık 1 saat boya giderimi sağlandı. Jeller bantların sayı ve büyüklüklerinin belirlenmesi için karanlık alandaki beyaz ışığın üzerine alınarak fotoğraflandı.

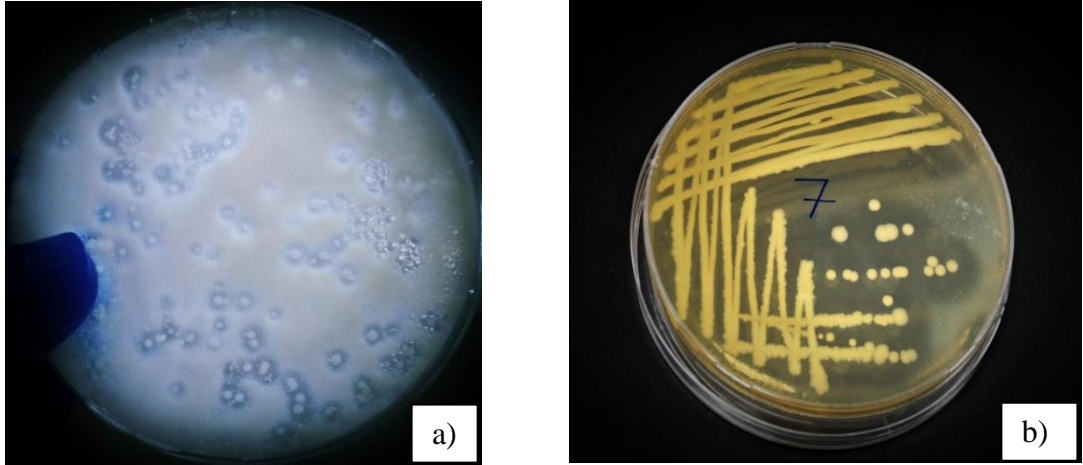
### 3. BULGULAR

#### 3.1. Proteaz Üreticisi Mikroorganizmaların İzolasyonu

##### 3.1.1. Örnek Alımı

Proteaz üreticisi mikroorganizmaların izolasyonu amacıyla, toprak örneğinin ana stoğundan steril serum fizyolojik ile 1/10 seri seyreltmeler yapıldı. Her bir seyreltilmiş örnekten 100 µL alınarak ayırt edici besiyeri olarak kullanılan skimmilk agar besiyerine yayma ekim yapıldı.

37°C’de 24 saat inkübasyon sonucunda, etrafında proteolitik zon oluşturan koloniler, proteaz üreticisi olarak belirlendi. Çalışmada  $10^{-4}$  seyreltilmiş toprak örneğinin yayma ekimi başarılı bir sonuç verdi. Koloni etrafındaki zonlar karışmamış, koloniler saflaştırılmaya uygun birbirinden uzak ve sık oluştu. Koloni etrafındaki zonların büyüklüklerine göre 6 farklı koloni seçildi. 6 izolat RFLK01, RFLK03, RFLK06, RFLK07, RFLK08 ve RFLK12 olarak kodlandı. İzolatlar skimmilk agar besiyerine tek koloni yöntemiyle ekilerek saflaştırıldı.



Şekil 3.1. a) İzolatların izolasyonu b) RFLK07'nin saflaştırılması

## 3.2. Proteaz Üreticisi İzolatların İdentifikasyonu

### 3.2.1. İzolatların Makroskobik Özelliklerinin Belirlenmesi

Saflaştırılan proteaz üreticisi izolatların identifikasyonu için, ilk olarak makroskobik özellikleri incelendi. N1 agar besiyerinde, 37°C’de 24 saat inkübe edilen izolatların oluşturdukları koloni morfolojileri incelendi (Çizelge 3.1).

**Çizelge3.1.** İzolatların koloni morfolojileri

K.MORFOLOJİSİ	RFLK01	RFLK03	RFLK06	RFLK07	RFLK08	RFLK12
Koloni tipi	R tip	R tip	R tip	S tip	R tip	R tip
K.yüzey dokusu	Kırışik	Kırışik	Kırışik	Düz	Kırışik	Kırışik
K. şekli	Filamentöz	Filamentöz	Filamentöz	Yuvarlak	Filamentöz	Filamentöz
K. kenar şekli	Pürüzlü	Pürüzlü	Pürüzlü	Düz	Pürüzlü	Pürüzlü
K.yüksekliği	Kabarık	Kabarık	Kabarık	Konveks	Kabarık	Kabarık
K. rengi	Açık sarı	Açık sarı	Açık sarı	Sarı	Açık sarı	Açık sarı

RFLK01, RFLK03, RFLK06, RFLK08 ve RFLK12 izolatları birbirlerine benzer koloni yapıları oluşturdu. RFLK07 ise diğerlerinden farklı yapıda koloni morfolojisi meydana getirdi.

### 3.2.2. İzolatların Mikroskobik Özelliklerinin Belirlenmesi

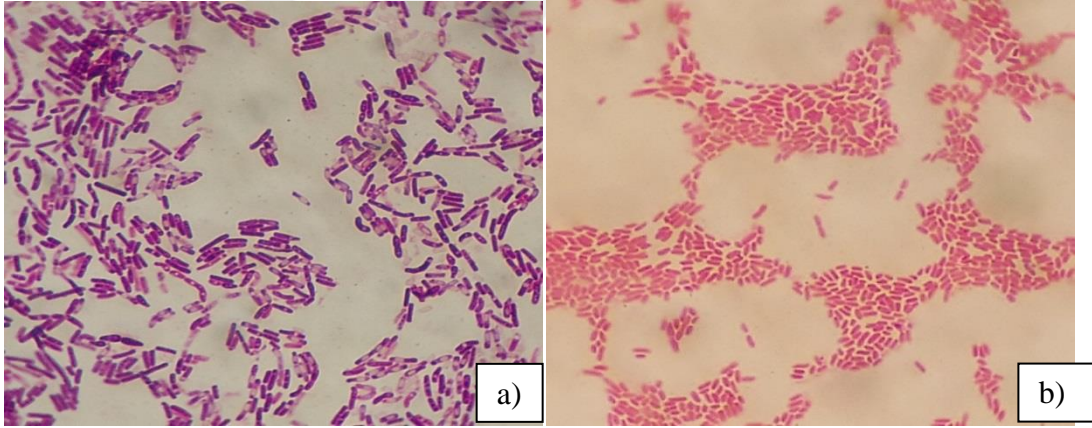
Saflaştırılan izolatların identifikasyonu için, makroskobik özellikler belirlendikten sonra mikroskobik özellikleri incelendi. Gram boyama ve sporboyama yapıldı.

### 3.2.2.1. Gram Boyama

Saflaştırılan bütün izolatlar basil hücre şekline sahipti. RFLK01, RFLK03, RFLK06, RFLK08 ve RFLK12 izolatları gram (+) özelliğinde iken gram boyama sonuçlarında dolaylı olarak spor yapıları da gözlemlendi. RFLK07 kodlu izolat gram (-) özelliğindedi ve spor yapısı gözlenmedi (Çizelge 3.2, Şekil 3.2.).

**Çizelge3.2.** Gram boyama sonuçları

GRAM BOYAMA	RFLK01	RFLK03	RFLK06	RFLK07	RFLK08	RFLK12
Gram özelliği	+	+	+	-	+	+
Hücre şekli	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil
Spor varlığı(dolaylı)	+	+	+	-	+	+



**Şekil 3.2.** a) RFLK08 izolatının gram (+) boyaması b) RFLK07 izolatının gram (-) boyaması

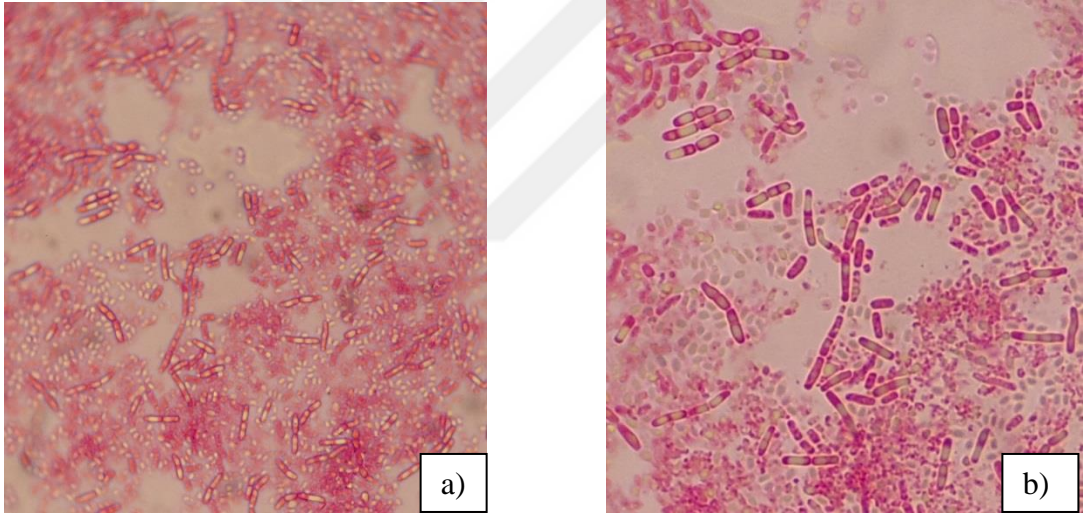
### 3.2.2.2. Spor Boyama

RFLK01, RFLK03, RFLK06, RFLK08 ve RFLK izolatlarında spor yapısı gözlemlendi. Tüm izolatlarda sporlar elipsoidal şekle sahipti. Sporlar çoğunlukla subterminal

konumundaydı. RFLK06 kodlu izolat için spor konumu merkezdeydi. RFLK07 kodlu izolatta spor yapısı gözlenmedi. Spor boyama ile ilgili sonuçlar Çizelge3.3. ve Şekil 3.3’de gösterildi.

**Çizelge3.3. İzolatların spor boyama sonuçları**

SPOR BOYAMA	RFLK01	RFLK03	RFLK06	RFLK07	RFLK08	RFLK12
Spor varlığı	+	+	+	-	+	+
Spor şekli	elipsoidal	elipsoidal	elipsoidal	-	elipsoidal	elipsoidal
Spor pozisyonu	subterminal	subterminal	sentral	-	subterminal	subterminal



**Şekil 3.3.**RFLK01 (a) ve RFLK03 (b) izolatlarının spor boyaması

### 3.2.3. İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolatların gelişim gösterdiği sıcaklık ve pH aralığı belirlendi. Ek olarak optimum gelişim gösterdiği sıcaklık ve pH koşulları 620nm’de verdikleri absorbansa göre bulundu. En yüksek üremenin olduğu koşul optimum olarak kabul edildi.

RFLK01 kodlu izolat 17°C'de hiçbir pH koşulunda üremedi, 50°C'de pH 7.0'de üredi. Optimal üreme sıcaklığı ve pH koşulu ise 37°C' ve pH 7.0 olarak saptandı (Şekil 3.4) Mezofilik özellik gösterdiği bulundu.

RFLK03 kodlu izolat 17°C'de pH 7.0 ve pH 9.0 da üredi, 50°C'de hiçbir pH koşulunda üremedi. Optimal üreme sıcaklığı ve pH koşulu ise 37°C' ve pH 7.0 olarak saptandı (Şekil 3.5). Mezofilik özellik gösterdiği bulundu.

RFLK06 kodlu izolat 17°C'de hiçbir pH koşulunda üremedi, 50°C'de pH 7.0'de üredi. Optimal üreme sıcaklığı ve pH koşulu ise 37°C' ve pH 7.0 olarak saptandı (Şekil 3.6). Mezofilik özellik gösterdiği bulundu.

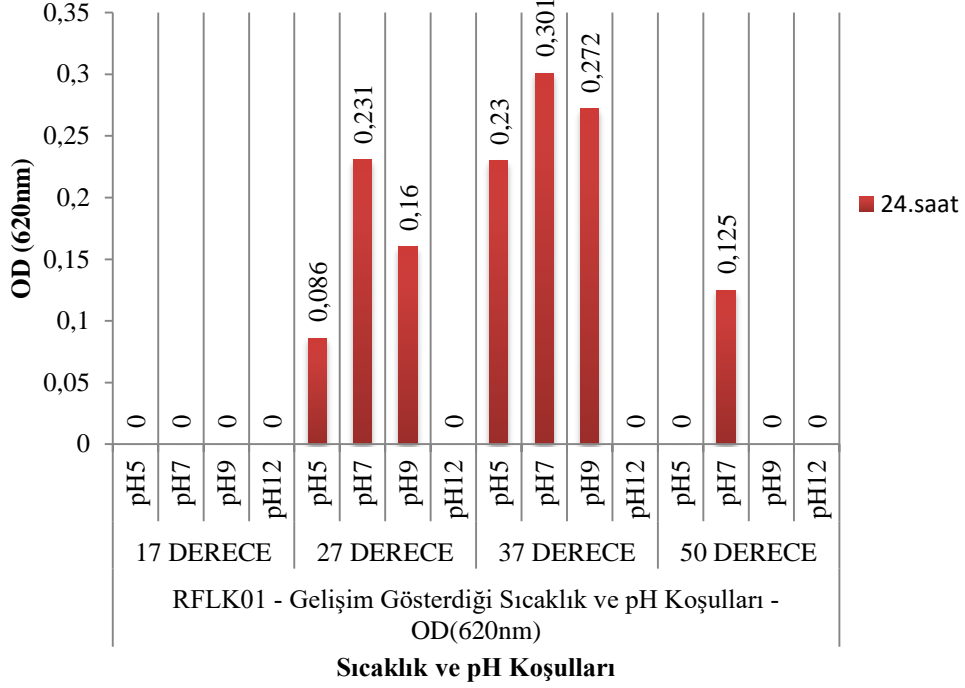
RFLK07 kodlu izolat 17°C'de pH 7.0 ve pH 9.0 da, 50°C'de pH 7.0'de üredi. Optimal üreme sıcaklığı pH koşulu ise 37°C' ve pH 5.0 olarak saptandı (Şekil 3.7). Mezofilik özellik gösterdiği bulundu.

RFLK08 kodlu izolat 17°C'de pH 7.0 ve pH 9.0 da üredi, 50°C'de hiçbir pH koşulunda üremedi. Optimal üreme sıcaklığı ve pH koşulu ise 37°C' ve pH 7.0 olarak saptandı (Şekil 3.8). Mezofilik özellik gösterdiği bulundu.

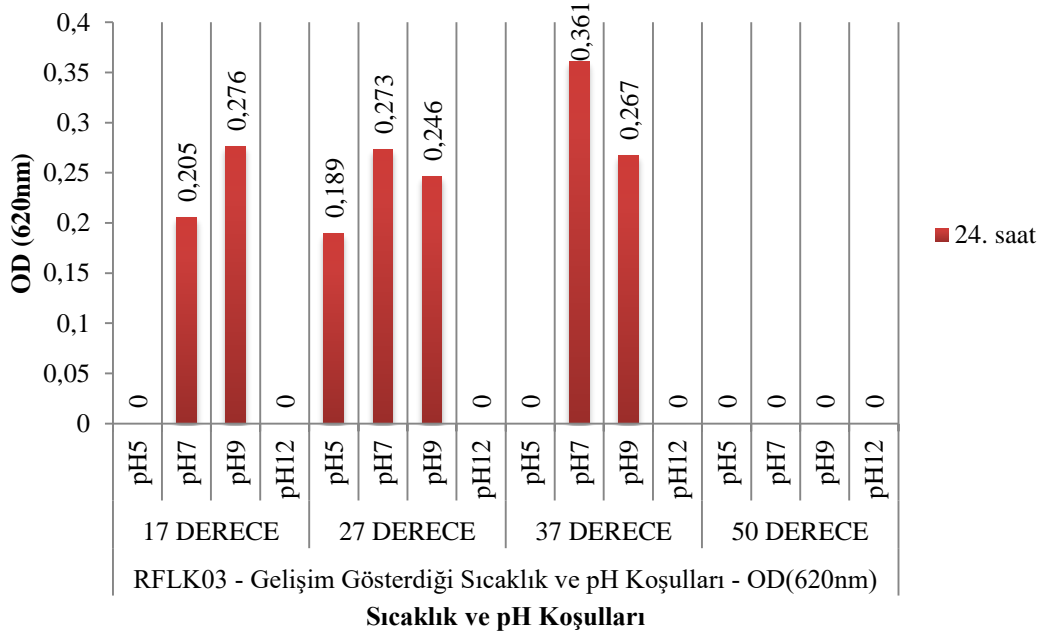
RFLK12 kodlu izolat ise 17°C'de pH 5.0 ve 50°C'de ise pH 7.0 ve pH9.0'da üredi. Optimal üreme sıcaklığı ve pH koşulu ise 27°C ve pH5.0 olarak saptandı (Şekil 3.9). Mezofilik özellik gösterdiği bulundu.

Sonuç olarak; RFLK01 ve RFLK06 izolatlarının, RFLK03 ile RFLK08 izolatlarının benzer fizyolojik özellikler gösterdiği, RFLK07 ve RFLK12 izolatlarının ise diğerlerinden farklı fizyolojik özellikler gösterdiği görüldü.

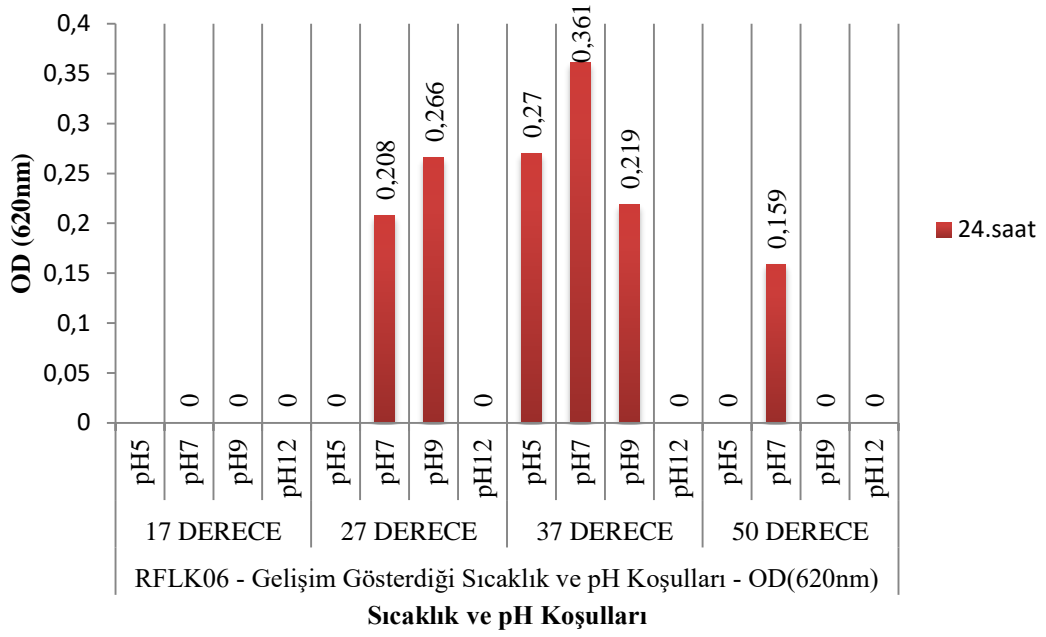




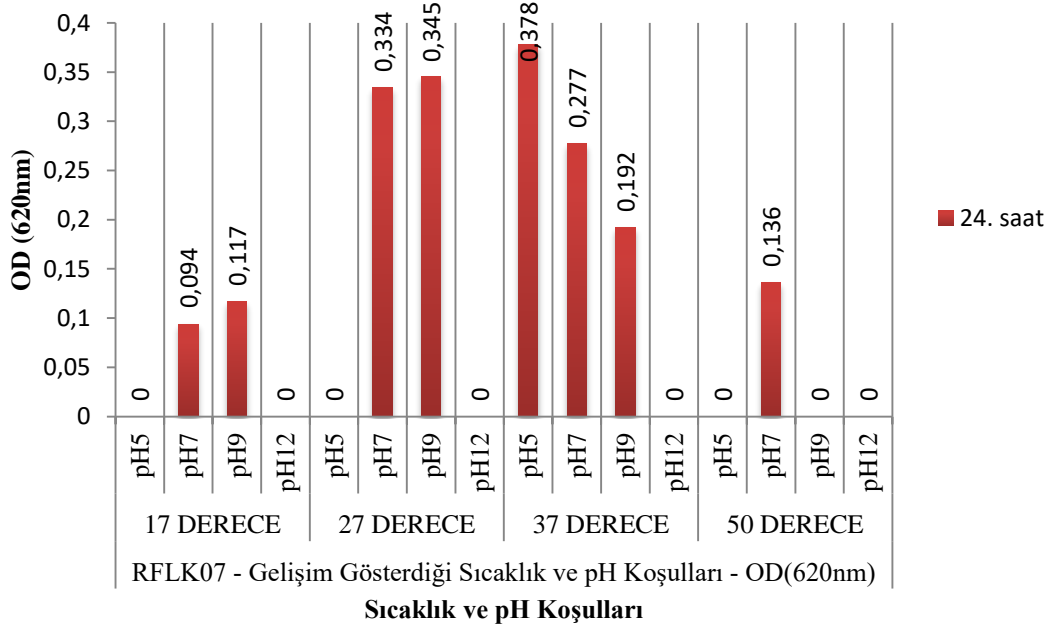
**Şekil 3.4.** RFLK01 kodlu izolatin gelişim gösterdiği sıcaklık ve pH koşullarının belirlenmesi



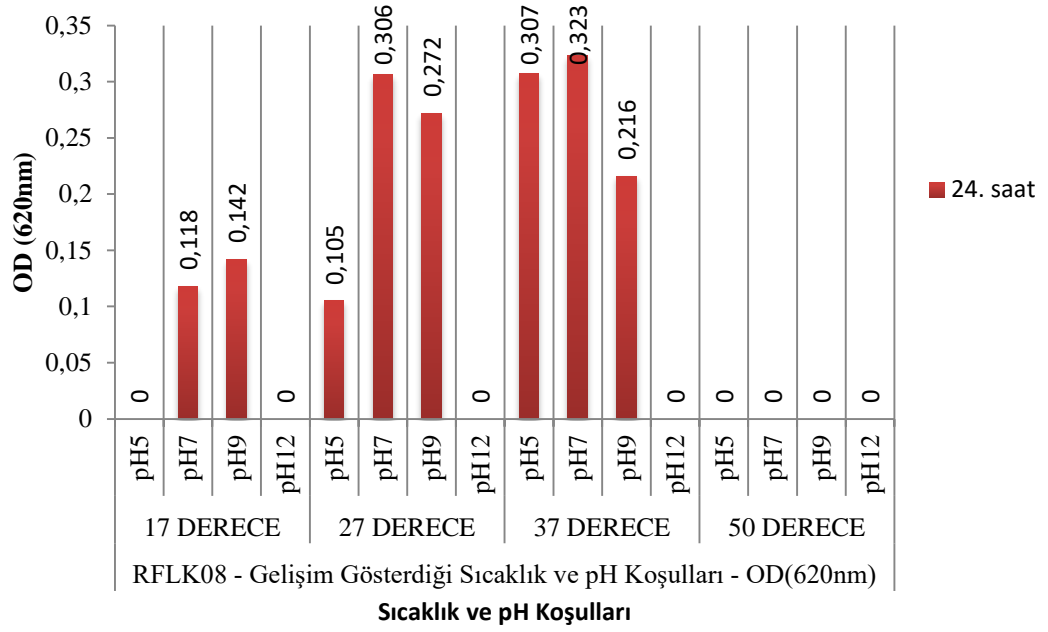
**Şekil 3.5.** RFLK03 kodlu izolatin gelişim gösterdiği sıcaklık ve pH koşullarının belirlenmesi



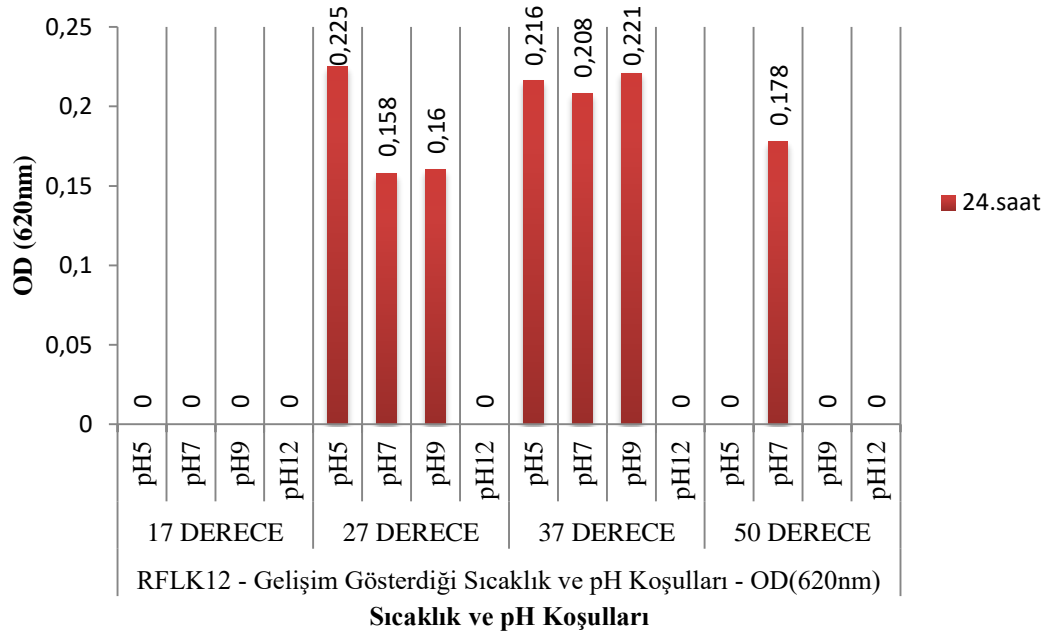
**Şekil 3.6.** RFLK06 kodlu izolatin gelişim gösterdiği sıcaklık ve pH koşullarının belirlenmesi



**Şekil 3.7.** RFLK07 kodlu izolatin gelişim gösterdiği sıcaklık ve pH koşullarının belirlenmesi



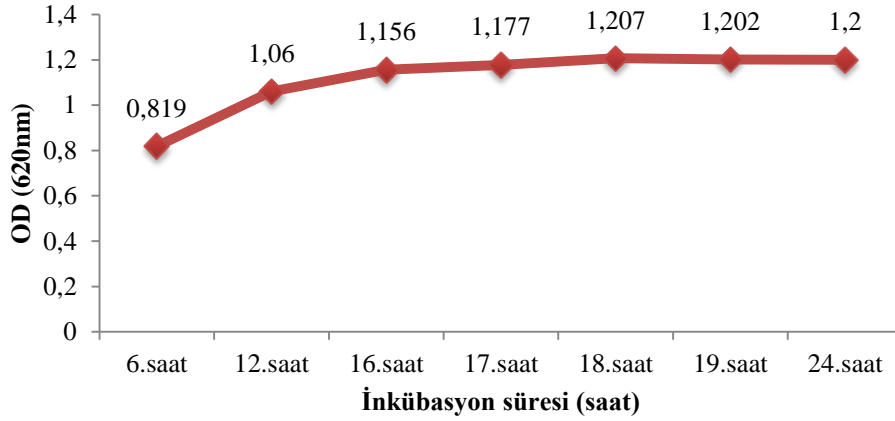
Şekil 3.8. RFLK08 kodlu izolatin gelişim gösterdiği sıcaklık ve pH koşullarının belirlenmesi



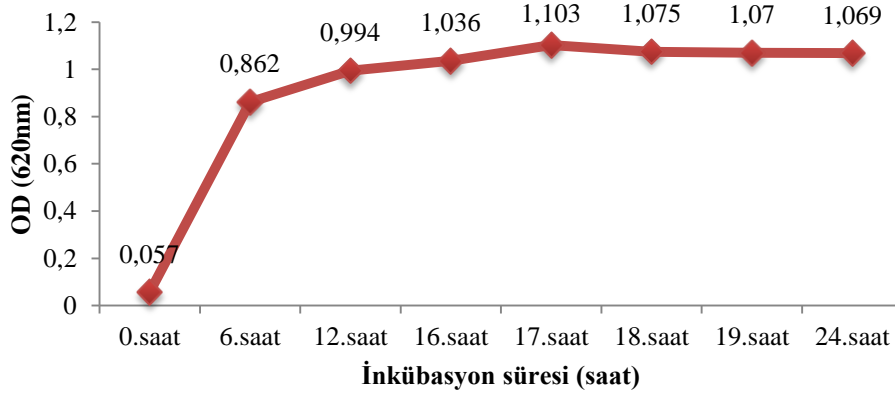
Şekil 3.9. RFLK12 kodlu izolatin gelişim gösterdiği sıcaklık ve pH koşullarının belirlenmesi

### 3.2.3.1. Üreme Eğrisinin Belirlenmesi

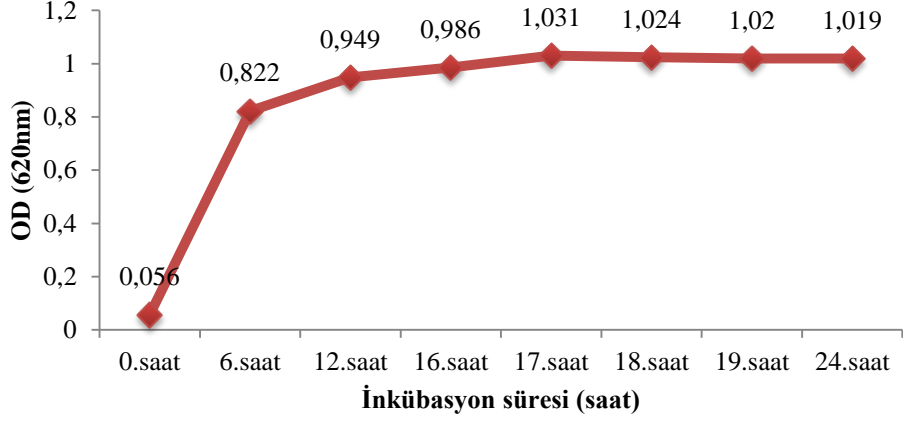
RFLK01, RFLK03, RFLK06, RFLK08 ve RFLK12 izolatları ilk 16 saat logaritmik fazda üredi, 16. saatten sonra ise durgunluk fazına girdi. RFLK07 kodlu izolat ise optimal üreme sıcaklığından (pH 7.0'da 27°C) daha yüksek bir sıcaklıkta inkübe edildiği için ilk 16 saat adaptasyon fazı, 24. saate kadar logaritmik faz, 24. saatten sonra ise durgunluk fazına girdiği görüldü. (Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13, Şekil 3.14 ve Şekil 3.15)



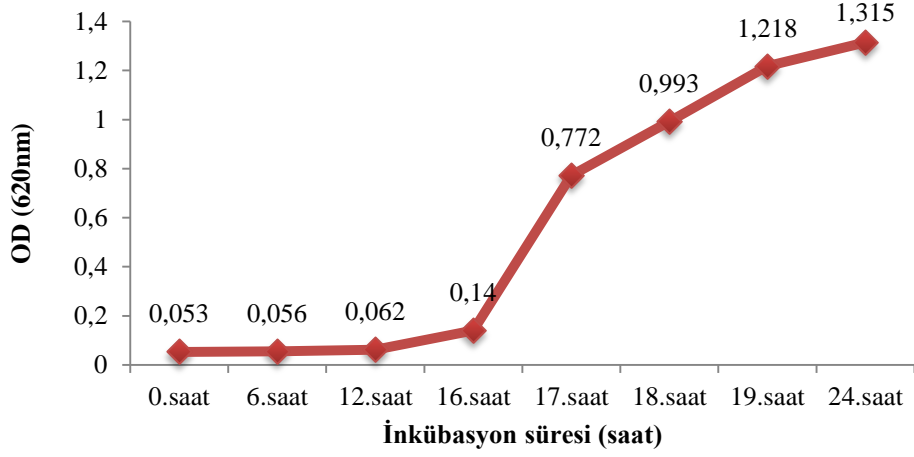
Şekil 3.10. RFLK01 kodlu izolatın üreme eğrisi



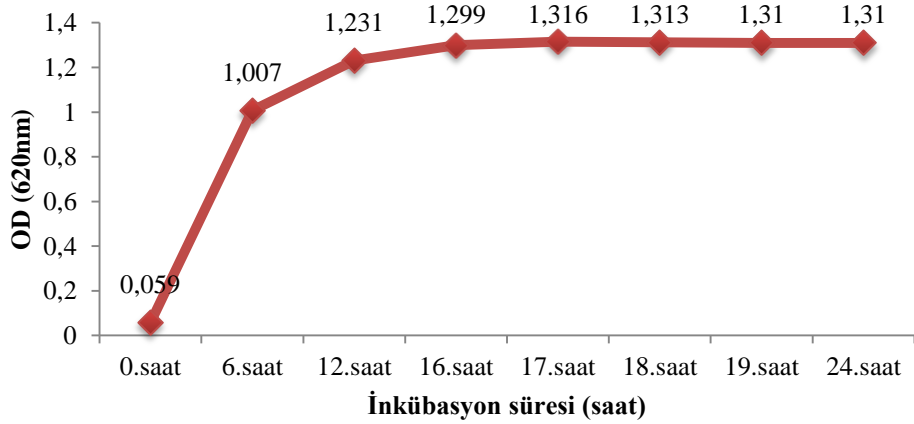
Şekil 3.11. RFLK03 kodlu izolatın üreme eğrisi



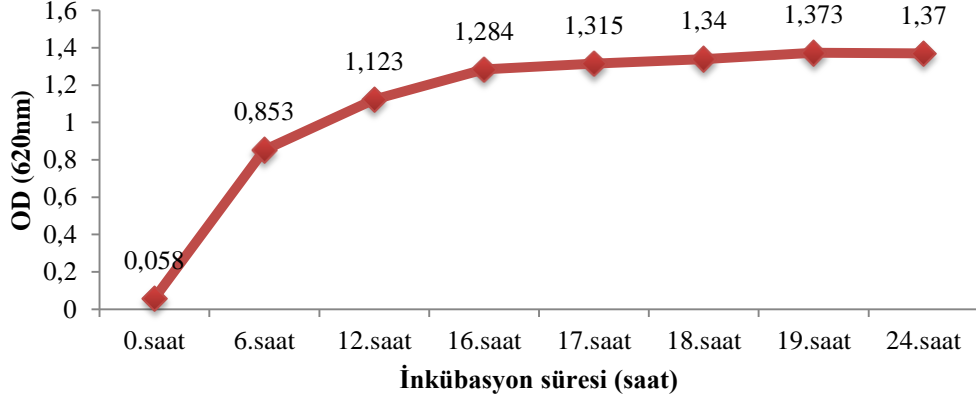
Şekil 3.12. RFLK06 kodlu izolatın üreme eğrisi



Şekil 3.13. RFLK07 kodlu izolatın üreme eğrisi



Şekil 3.14. RFLK08 kodlu izolatın üreme eğrisi



Şekil 3.15.RFLK12 kodlu izolatın üreme eğrisi

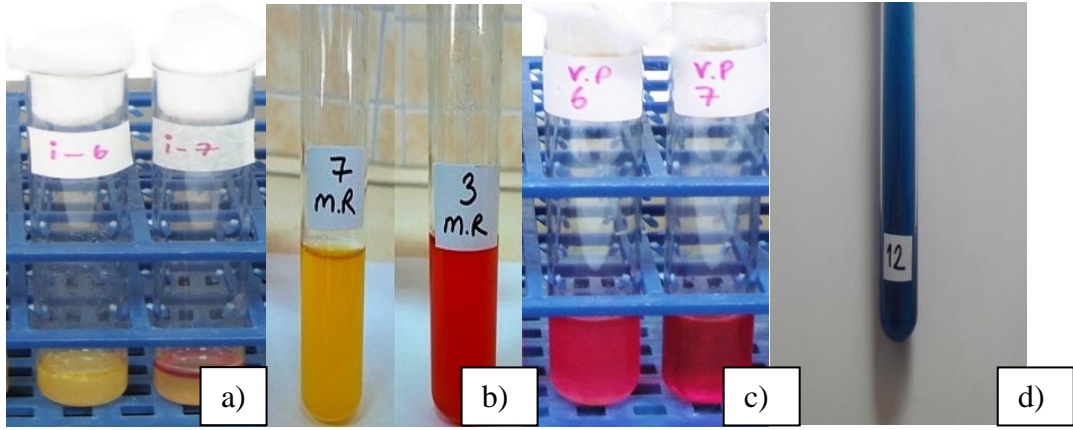
### 3.2.4. İzolatların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolatların biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için; indol testi, metil kırmızısı testi, voges proskauer testi ve sitrat testi (IMVIC testi), katalaz testi, nişasta hidroliz testi ve jelatin hidroliz testi yapıldı. Sonuçlar Çizelge 3.4’de verildi.

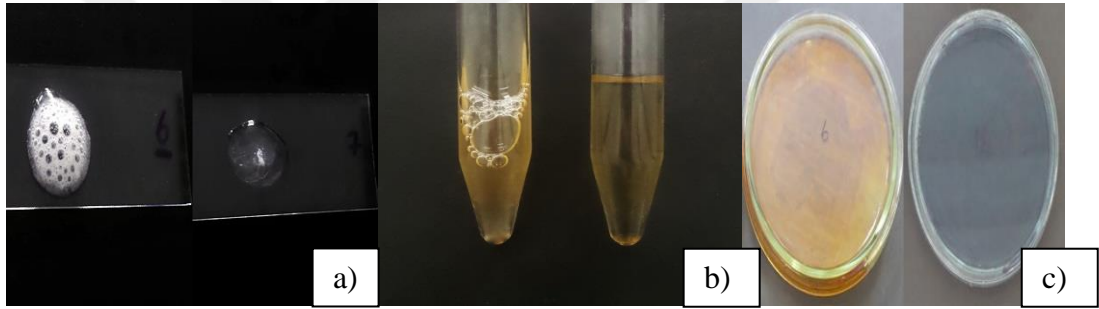
RFLK01, RFLK03, RFLK06, RFLK8 ve RFLK12’nin indol, voges proskauer, sitrat, katalaz ve jelatin hidroliz testi aynı sonucu verdi. Metil Red testinde RFLK03 kodlu izolat diğerleri negatif çıkmışken, pozitif çıktı. Nişasta hidroliz test sonucu RFLK01, RFLK03 ve RFLK06 kodlu izolatlarında pozitif (+); RFLK07, RFLK08 ve RFLK12 kodlu izolatlarında ise negatif (-) olarak gözlemlendi. RFLK07 kodlu izolat ise çoğunlukla diğer izolatlarla zıt sonuçlar verdi. Sonuçlara ait bazı görüntüler Şekil 3.16 ve Şekil 3.17’de verildi.

Çizelge 3.4.İzolatların biyokimyasal test sonuçları

BİYOKİMYASAL TESTLER	RFLK01	RFLK03	RFLK06	RFLK07	RFLK08	RFLK12
İndol testi	-	-	-	+	-	-
Metil kırmızısı testi	-	+	-	-	-	-
Voges proskauer testi	+	+	+	+	+	+
Sitrat testi	+	+	+	+	+	+
Katalaz testi	+	+	+	-	+	+
Nişasta hidroliz testi	+	+	+	-	-	-
Jelatin hidroliz testi	+	+	+	-	+	+



Şekil 3.16. a) İndol, b) Metil-Red, c) Voges-Proskauer d) Sitrat testi sonuçları

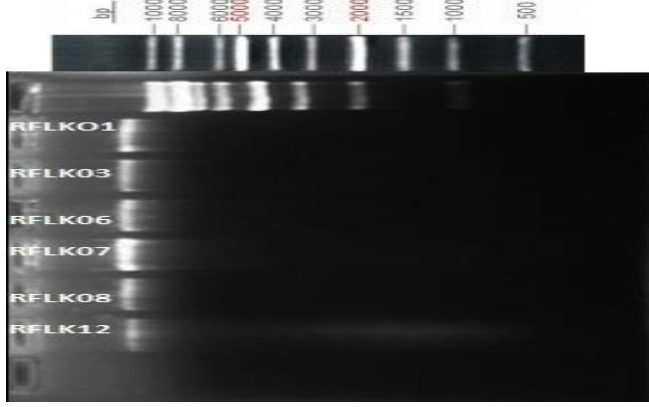


Şekil 3.17. a) Katalaz testi, b) Jelatin hidrolizasyonu ve c) Nişasta hidrolizasyonu testi sonuçları

### 3.2.5. Mikroorganizmaların Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi

#### 3.2.5.1. DNA İzolasyonu

1kb DNA Ladder (BİOMATİK (Cat. NO:M7508) kullanılarak yapılan DNA yürütmesinde tüm izolatlarda DNA bantı görüldü. DNA bantları 10.000bp'den daha yüksek bir baz çiftine sahipti (Şekil 3.18.).



**Şekil 3.18.**Kromozomal DNA jel görüntüsü

### 3.2.5.2.PZR ve PZR Optimizasyonu

6 izolatın, 16S rRNA gen dizilerine spesifik 27F forward primeri ve 1492R reverse primeri ile gerçekleştirilen PZR reaksiyonları sonucunda, yaklaşık 1500bp'lik bir 16S ribozomal RNA gen bölgesini çoğaltıldı. Gen bölgesinin yaklaşık baz çifti uzunlukları Çizelge 3.5.'de gösterildi.

**Çizelge 3.5.**16S rRNA gen bölgesinin baz çifti uzunlukları (bp)

İzolatlar	Baz çifti Uzunluğu (bp)
RFLK01	1326
RFLK03	1280
RFLK06	1311
RFLK07	1335
RFLK08	1306
RFLK12	1318

PZR optimizasyonu için farklı bağlanma sıcaklıkları ve farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları araştırıldı. Bağlanma sıcaklıkları; 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C



ve 55°C, final MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları ise 1.0 mM, 1.33 mM, 1.67 mM, 2 mM ve 2.33 mM'dır.

RFLK01,RFLK06,RFLK07,RFLK12 kodlu izolatların optimum bağlanma sıcaklıkları 54°C, RFLK03 50°C, RFLK12 52°C olarak belirlendi. MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları ise RFLK12 (1.67 mM) hariç, 1.33 mM bulundu. PZR optimizasyonu sonucu belirlenen optimum bağlanma sıcaklığı ve optimum MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu Çizelge 3.6.'da verildi. Sonuçlara ait jel görüntüleri ise Şekil 3.19, Şekil 3.20, Şekil 3.21., Şekil 3.22., Şekil 3.23. ve Şekil 3.24'te gösterildi.

**Çizelge 3.6.**Optimum bağlanma sıcaklığı ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları

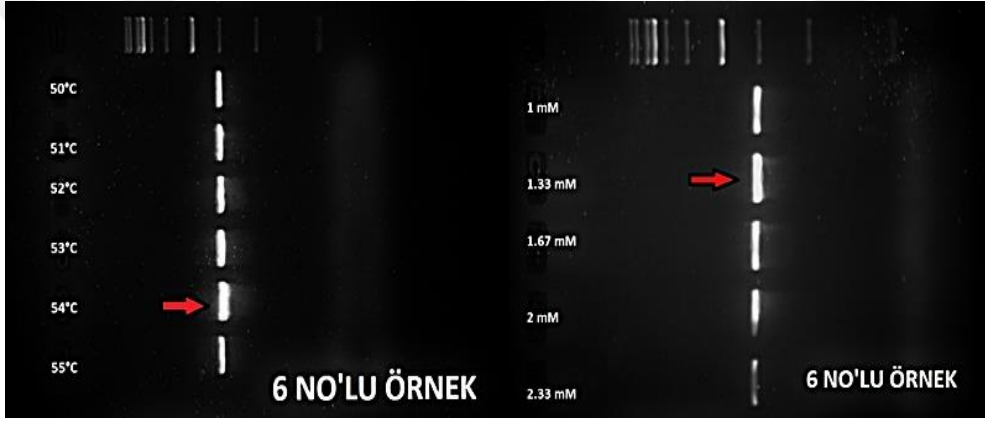
İzolatlar	Optimum Bağlanma Sıcaklığı	Optimum MgCl <sub>2</sub> Konsantrasyonu
RFLK01	54°C	1.33 mM
RFLK03	50°C	1.33 mM
RFLK06	54°C	1.33 mM
RFLK07	54°C	1.33 mM
RFLK08	52°C	1.33 mM
RFLK12	54°C	1.67 mM



**Şekil 3.19.**RFLK01 kodlu izolatın PZR Optimizasyonu



Şekil 3.20.RFLK03 kodlu izolatın PZR Optimizasyonu



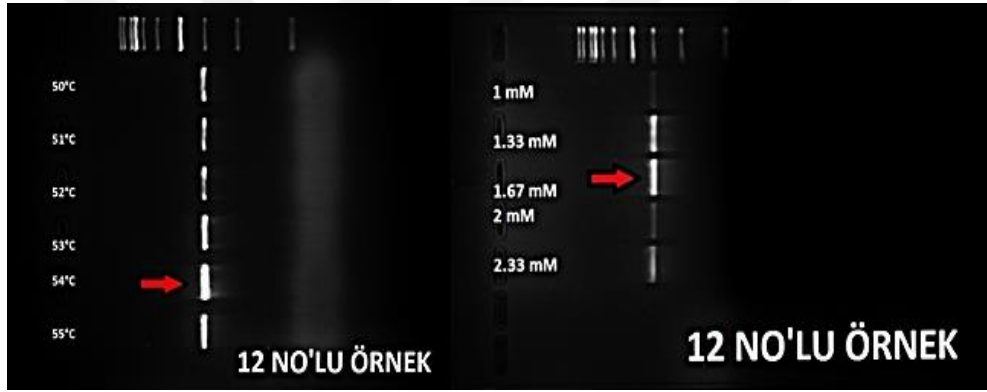
Şekil 3.21.RFLK06 kodlu izolatın PZR Optimizasyonu



Şekil 3.22. RFLK07 kodlu izolatın PZR Optimizasyonu



Şekil 3.23.RFLK08 kodlu izolatın PZR Optimizasyonu



Şekil 3.24.RFLK12 kodlu izolatın PZR Optimizasyonu

### 3.2.5.3. Filogenetik Analiz

İzolatların 16S rRNA gen sekans analizi ve filogenetik sekans analizine göre;

RFLK01 soy ağacına göre en yakın tür olarak *Bacillus mojavensis* olarak tanımlandı. Uzaklık matrisine göre en küçük tür yakınlık değeri 0.0088'dir (Şekil 3.25. ve 3.26.).

RFLK03 soy ağacına göre en yakın tür olarak *Bacillus thuringiensis* olarak tanımlandı. Uzaklık matrisine göre en küçük tür yakınlık değeri 0.06992'dir. *Bacillus tonoyensis* ile aynı değere sahiptir (Şekil 3.27. ve 3.28.) .

RFLK06 soy ağacına göre en yakın tür olarak *Bacillus mojavenis* olarak tanımlandı. Uzaklık matrisine göre en küçük tür yakınlık değeri 0.00804'tür (Şekil 3.29. ve 3.30.).

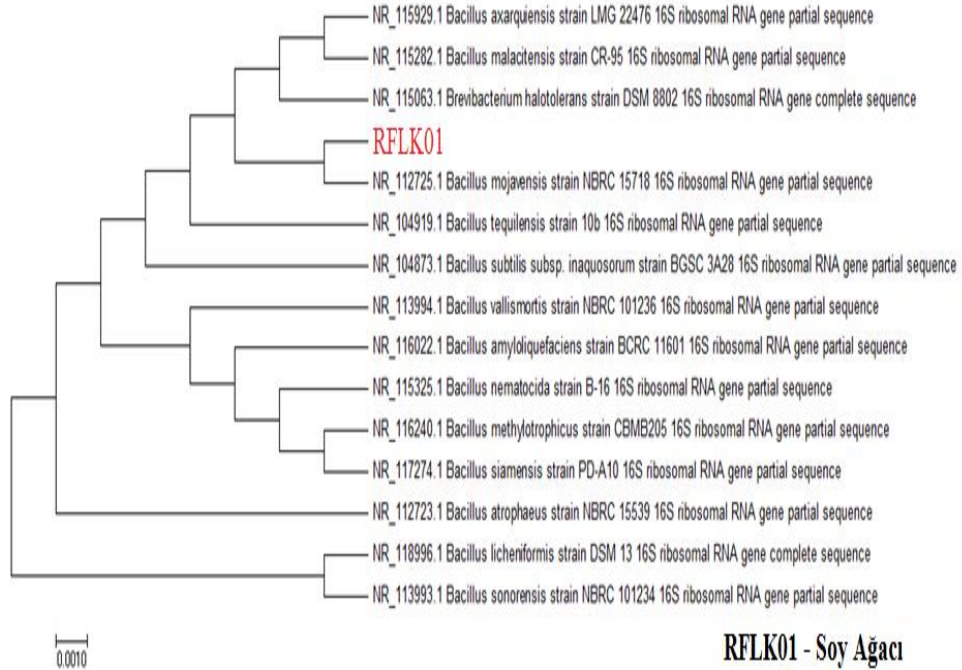
RFLK07 soy ağacına göre en yakın tür olarak *Aeromonas salmonicida* olarak tanımlandı. Uzaklık matrisine göre en küçük tür yakınlık değeri 0.02076'dır (Şekil 3.31. ve 3.32.).

RFLK08 soy ağacına göre en yakın tür olarak *Bacillus anthracis* olarak tanımlandı. Uzaklık matrisine göre en küçük tür yakınlık değeri 0.00885'tir (Şekil 3.33. ve 3.34.).

RFLK12 soy ağacına göre en yakın tür olarak *Bacillus stratosphericus* olarak tanımlandı. Uzaklık matrisine göre en küçük tür yakınlık değeri 0.0624'tür. *Bacillus aerius* ve *Bacillus altitudinis* ile aynı değere sahiptir (Şekil 3.35. ve 3.36.).

RFLK01 - Uzakhk Matriksi														
NR_112725.1 <i>Bacillus mojavensis</i>	0,00880													
NR_104873.1 <i>Bacillus subtilis</i>	0,00935	0,00054												
NR_115063.1 <i>Brevibacterium halotolerans</i>	0,00935	0,00054	0,00108											
NR_115929.1 <i>Bacillus axarquiensis</i>	0,00935	0,00054	0,00108	0,00000										
NR_115282.1 <i>Bacillus malacitensis</i>	0,00935	0,00054	0,00108	0,00000	0,00000									
NR_104919.1 <i>Bacillus tequilensis</i>	0,01047	0,00162	0,00108	0,00108	0,00108	0,00108								
NR_113994.1 <i>Bacillus vallismortis</i>	0,01103	0,00216	0,00162	0,00162	0,00162	0,00162	0,00162							
NR_116022.1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,01104	0,00216	0,00162	0,00270	0,00270	0,00270	0,00271	0,00108						
NR_116240.1 <i>Bacillus methylophilus</i>	0,01216	0,00435	0,00380	0,00489	0,00489	0,00489	0,00380	0,00325	0,00216					
NR_112723.1 <i>Bacillus atrophaeus</i>	0,01217	0,00325	0,00271	0,00379	0,00379	0,00379	0,00380	0,00216	0,00216	0,00435				
NR_115325.1 <i>Bacillus nematocida</i>	0,01218	0,00325	0,00271	0,00380	0,00380	0,00380	0,00380	0,00216	0,00217	0,00326	0,00326			
NR_117274.1 <i>Bacillus siamensis</i>	0,01390	0,00490	0,00435	0,00545	0,00545	0,00545	0,00435	0,00380	0,00271	0,00271	0,00490	0,00381		
NR_118996.1 <i>Bacillus licheniformis</i>	0,02148	0,01218	0,01162	0,01274	0,01274	0,01274	0,01276	0,01332	0,01218	0,01448	0,01105	0,01449	0,01506	
NR_113993.1 <i>Bacillus sonorensis</i>	0,02265	0,01332	0,01276	0,01388	0,01388	0,01388	0,01390	0,01445	0,01332	0,01562	0,01218	0,01563	0,01621	0,00216

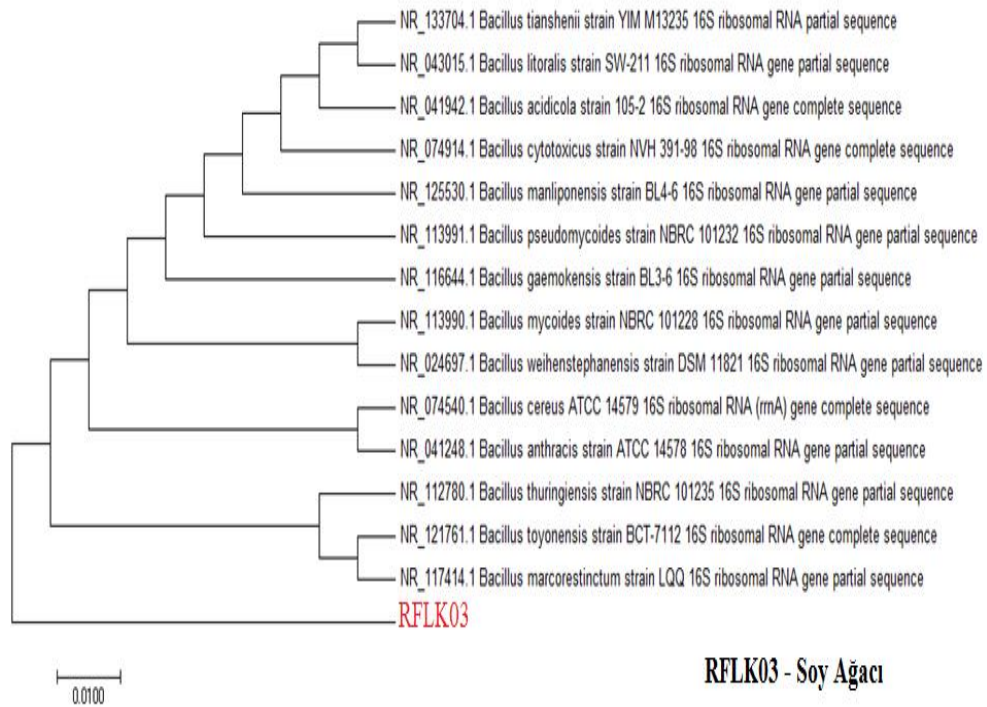
Şekil 3.25. RFLK01 izolatının uzaklık matriksi



Şekil 3.26. RFLK01 izolatının soy ağacı görüntüsü

RFLK03 - Uzakhk Matrisi																			
NR_112780.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	0,06992																		
NR_121761.1 <i>Bacillus toyonensis</i>	0,06992	0,00000																	
NR_074540.1 <i>Bacillus cereus</i>	0,07099	0,00099	0,00099																
NR_117414.1 <i>Bacillus marcorestinctum</i>	0,07105	0,00099	0,00099	0,00197															
NR_041248.1 <i>Bacillus anthracis</i>	0,07212	0,00197	0,00197	0,00099	0,00296														
NR_113990.1 <i>Bacillus mycooides</i>	0,07428	0,00395	0,00395	0,00494	0,00494	0,00594													
NR_024697.1 <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	0,07428	0,00395	0,00395	0,00494	0,00494	0,00594	0,00000												
NR_113991.1 <i>Bacillus pseudomycooides</i>	0,07664	0,00694	0,00694	0,00595	0,00794	0,00495	0,01093	0,01093											
NR_116644.1 <i>Bacillus gaemokensis</i>	0,07882	0,01094	0,01094	0,01194	0,01195	0,01295	0,01094	0,01094	0,00994										
NR_125530.1 <i>Bacillus manliponensis</i>	0,09094	0,01996	0,01996	0,01895	0,02098	0,01794	0,02198	0,02198	0,01898	0,02509									
NR_074914.1 <i>Bacillus cytotoxicus</i>	0,09224	0,02505	0,02505	0,02404	0,02608	0,02301	0,02913	0,02913	0,01996	0,02813	0,02502								
NR_133704.1 <i>Bacillus tianshenii</i>	0,11552	0,04593	0,04593	0,04489	0,04701	0,04382	0,04802	0,04802	0,04495	0,04917	0,04375	0,05216							
NR_041942.1 <i>Bacillus acidicola</i>	0,11867	0,04896	0,04896	0,04792	0,05004	0,04684	0,05317	0,05317	0,04369	0,04672	0,05217	0,04583	0,05766						
NR_043015.1 <i>Bacillus litoralis</i>	0,12336	0,05432	0,05432	0,05327	0,05541	0,05219	0,05434	0,05434	0,05334	0,05974	0,04493	0,05872	0,04908	0,05231					

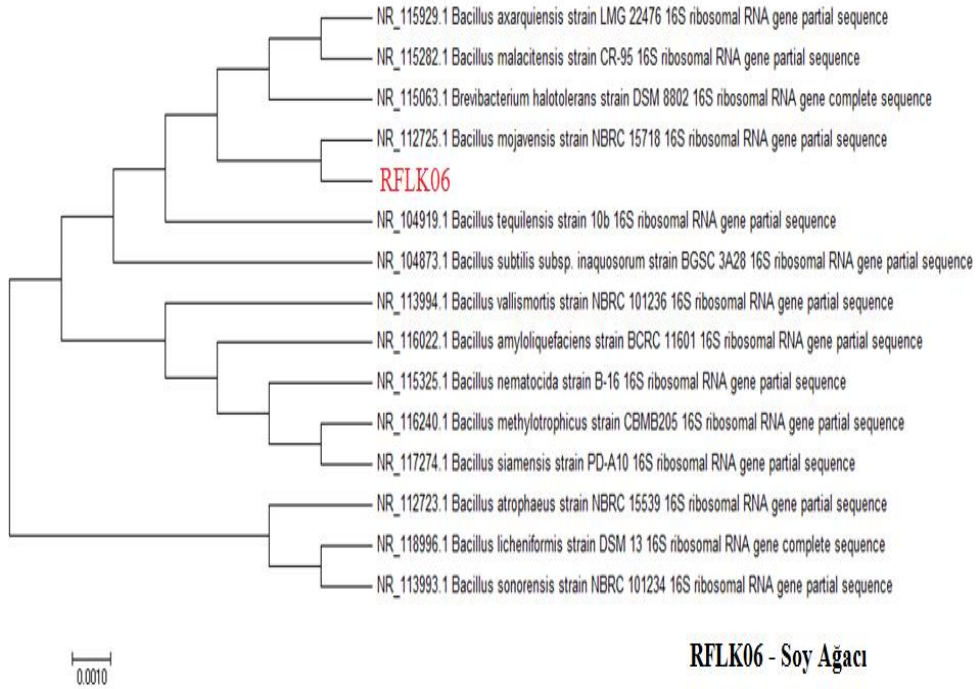
Şekil 3.27.RFLK03 izolatının uzaklık matrisi



Şekil 3.28. RFLK03 izolatının soy ağacı görüntüsü

RFLK06 - Uzaklık Matrisi																			
NR_112725.1 <i>Bacillus mojavensis</i>	0,00804																		
NR_104873.1 <i>Bacillus subtilis</i>	0,00849	0,00044																	
NR_115063.1 <i>Brevibacterium halotolerans</i>	0,00849	0,00044	0,00087																
NR_115929.1 <i>Bacillus axarquiensis</i>	0,00849	0,00044	0,00087	0,00000															
NR_115282.1 <i>Bacillus malacitensis</i>	0,00849	0,00044	0,00087	0,00000	0,00000														
NR_104919.1 <i>Bacillus tequilensis</i>	0,00940	0,00131	0,00087	0,00087	0,00087	0,00087													
NR_113994.1 <i>Bacillus vallismortis</i>	0,00985	0,00175	0,00131	0,00131	0,00131	0,00131	0,00131												
NR_116022.1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,00986	0,00175	0,00131	0,00219	0,00219	0,00219	0,00219	0,00087											
NR_112723.1 <i>Bacillus atrophaeus</i>	0,01078	0,00263	0,00219	0,00307	0,00307	0,00307	0,00307	0,00175	0,00175										
NR_115325.1 <i>Bacillus nematocida</i>	0,01079	0,00263	0,00219	0,00307	0,00307	0,00307	0,00307	0,00175	0,00175	0,00263									
NR_116240.1 <i>Bacillus methylotrophicus</i>	0,01125	0,00307	0,00263	0,00351	0,00351	0,00351	0,00263	0,00219	0,00131	0,00307	0,00219								
NR_117274.1 <i>Bacillus siamensis</i>	0,01219	0,00396	0,00352	0,00440	0,00440	0,00440	0,00351	0,00307	0,00219	0,00397	0,00308	0,00175							
NR_118996.1 <i>Bacillus licheniformis</i>	0,01789	0,00940	0,00894	0,00985	0,00985	0,00985	0,00986	0,01031	0,00940	0,00848	0,01125	0,01078	0,01172						
NR_113993.1 <i>Bacillus sonorensis</i>	0,01885	0,01031	0,00986	0,01076	0,01076	0,01076	0,01078	0,01123	0,01031	0,00939	0,01218	0,01170	0,01264	0,00175					

Şekil 3.29.RFLK06 izolatının uzaklık matrisi

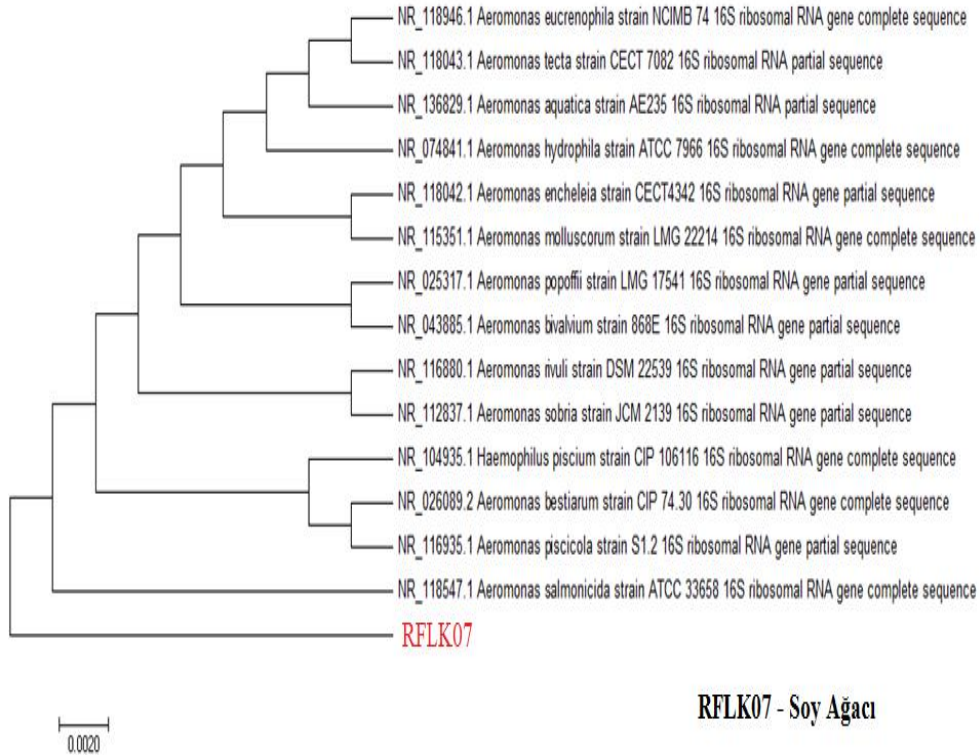


Şekil 3.30.RFLK06 izolatının soğ ağacı görüntüsü



RFLK07 - Uzaklık Matrisi														
NR_118547.1 <i>Aeromonas salmonicida</i>	0,02076													
NR_104935.1 <i>Haemophilus piscium</i>	0,02259	0,00178												
NR_116935.1 <i>Aeromonas piscicola</i>	0,02259	0,00178	0,00000											
NR_026089.2 <i>Aeromonas bestiarum</i>	0,02259	0,00178	0,00000	0,00000										
NR_118042.1 <i>Aeromonas encheleia</i>	0,02350	0,00267	0,00445	0,00445	0,00445									
NR_115351.1 <i>Aeromonas molluscorum</i>	0,02350	0,00267	0,00445	0,00445	0,00445	0,00000								
NR_116880.1 <i>Aeromonas rivulii</i> strain	0,02444	0,00356	0,00535	0,00535	0,00535	0,00624	0,00624							
NR_112837.1 <i>Aeromonas sobria</i>	0,02628	0,00535	0,00714	0,00714	0,00714	0,00804	0,00804	0,00178						
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					
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				
NR_025317.1 <i>Aeromonas popoffii</i>	0,02907	0,00804	0,00625	0,00625	0,00625	0,00625	0,00803	0,00983	0,00446	0,00986				
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		
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	
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

Şekil 3.31. RFLK07 izolatının uzaklık matrisi

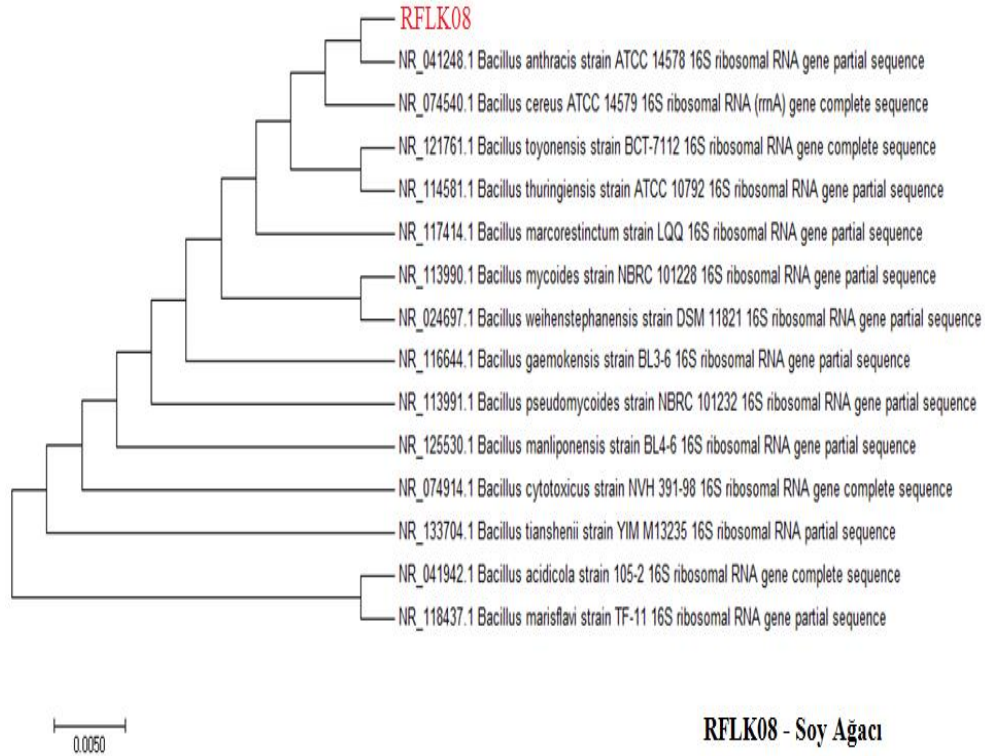


Şekil 3.32. RFLK07 izolatının soy ağacı görüntüsü



RFLK08 - Uzaklık Matrisi																			
NR_041248.1 <i>Bacillus anthracis</i>	0,00885																		
NR_074540.1 <i>Bacillus cereus</i>	0,00984	0,00098																	
NR_114581.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	0,01083	0,00195	0,00098																
NR_121761.1 <i>Bacillus toyonensis</i>	0,01083	0,00195	0,00098	0,00000															
NR_117414.1 <i>Bacillus marcorestinctum</i>	0,01283	0,00391	0,00293	0,00195	0,00195														
NR_113991.1 <i>Bacillus pseudomycooides</i>	0,01383	0,00490	0,00588	0,00687	0,00687	0,00884													
NR_113990.1 <i>Bacillus mycooides</i>	0,01580	0,00685	0,00587	0,00489	0,00489	0,00489	0,01180												
NR_024697.1 <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	0,01580	0,00685	0,00587	0,00489	0,00489	0,00489	0,01180	0,00000											
NR_116644.1 <i>Bacillus gaemokensis</i>	0,02288	0,01380	0,01280	0,01181	0,01181	0,01182	0,01082	0,01082	0,01082										
NR_125530.1 <i>Bacillus maniponensis</i>	0,02685	0,01774	0,01875	0,01975	0,01975	0,02176	0,01877	0,02274	0,02274	0,02583									
NR_074914.1 <i>Bacillus cytotoxicus</i>	0,02994	0,02077	0,02178	0,02279	0,02279	0,02481	0,01776	0,02782	0,02782	0,02683	0,02275								
NR_133704.1 <i>Bacillus tianshenii</i>	0,04764	0,03920	0,04025	0,04128	0,04128	0,04131	0,04031	0,04231	0,04231	0,04343	0,04325	0,04639							
NR_041942.1 <i>Bacillus acidicola</i>	0,05176	0,04224	0,04330	0,04433	0,04433	0,04642	0,03914	0,04951	0,04951	0,04316	0,05164	0,03919	0,05702						
NR_118437.1 <i>Bacillus marisflavi</i>	0,05289	0,04334	0,04440	0,04543	0,04543	0,04753	0,04022	0,04854	0,04854	0,04219	0,05274	0,04744	0,04755	0,02682					

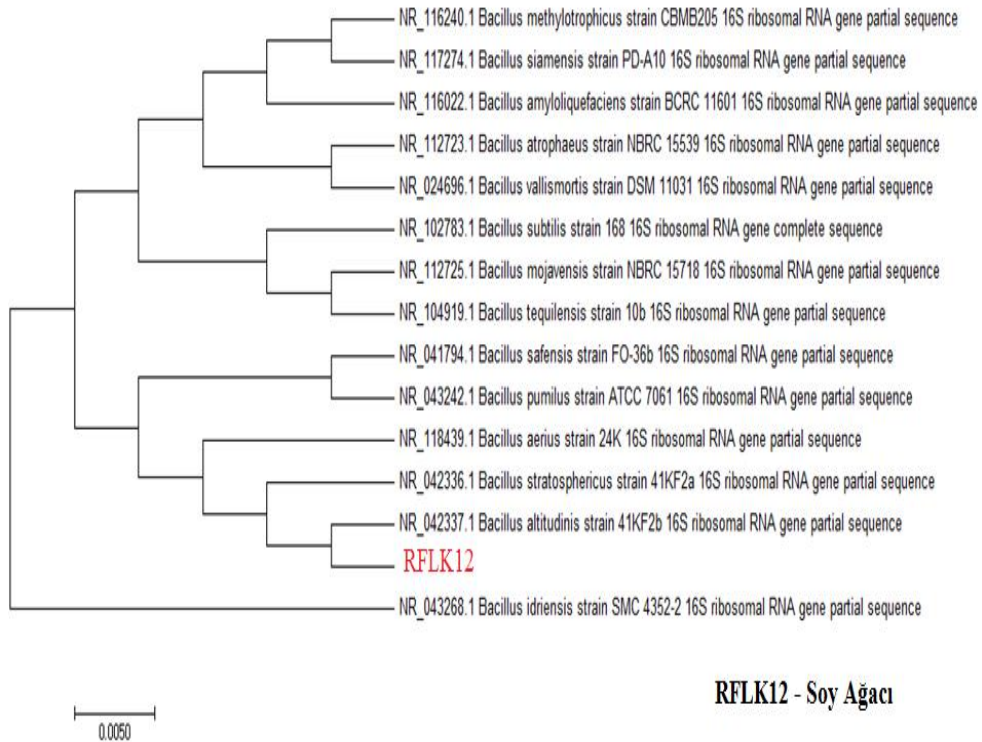
Şekil 3.33. RFLK08 izolatının uzaklık matrisi



Şekil 3.34. RFLK08 izolatının soy ağacı görüntüsü

RFLK12 - Uzaklık Matrisi														
NR_118439.1 <i>Bacillus aerius</i>	0,00624													
NR_042336.1 <i>Bacillus stratosphericus</i>	0,00624	0,00000												
NR_042337.1 <i>Bacillus altitudinis</i>	0,00624	0,00000	0,00000											
NR_041794.1 <i>Bacillus safensis</i>	0,00982	0,00355	0,00355	0,00355										
NR_043242.1 <i>Bacillus pumilus</i>	0,01072	0,00444	0,00444	0,00444	0,00089									
NR_112723.1 <i>Bacillus atropheus</i>	0,03086	0,02438	0,02438	0,02438	0,02621	0,02713								
NR_102783.1 <i>Bacillus subtilis</i>	0,03178	0,02529	0,02529	0,02529	0,02713	0,02804	0,00623							
NR_116240.1 <i>Bacillus methylophilus</i>	0,03271	0,02621	0,02621	0,02621	0,02804	0,02896	0,00534	0,00266						
NR_116022.1 <i>Bacillus amyloiquefaciens</i>	0,03273	0,02622	0,02622	0,02622	0,02806	0,02898	0,00355	0,00266	0,00178					
NR_104919.1 <i>Bacillus tequilensis</i>	0,03456	0,02804	0,02804	0,02804	0,02804	0,02896	0,00713	0,00266	0,00533	0,00534				
NR_024696.1 <i>Bacillus vallismortis</i>	0,03458	0,02806	0,02806	0,02806	0,02806	0,02898	0,00355	0,00445	0,00355	0,00177	0,00355			
NR_112725.1 <i>Bacillus mojavensis</i>	0,03551	0,02898	0,02898	0,02898	0,03082	0,03175	0,00623	0,00355	0,00623	0,00444	0,00266	0,00444		
NR_112724.1 <i>Bacillus siamensis</i>	0,03553	0,02900	0,02900	0,02900	0,03084	0,03177	0,00803	0,00534	0,00267	0,00445	0,00802	0,00624	0,00892	
NR_043268.1 <i>Bacillus idriensis</i>	0,03942	0,03283	0,03283	0,03283	0,03097	0,03190	0,04793	0,04504	0,04598	0,04601	0,04410	0,04412	0,04695	0,04888

Şekil 3.35. RFLK12 izolatının uzaklık matrisi



Şekil 3.36. RFLK12 izolatının soy ağacı görüntüsü

#### 3.2.5.4 ARDRA

ARDRA analizi, 16S rRNA geninin, 27F-1492R primerleriyle çoğaltılmasıyla elde edilen PZR ürünlerinin, restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonunda, kalıp DNA olarak kullanılmasıyla gerçekleştirildi. Hem standart suşların hem de izolatların PZR reaksiyonu ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesi, *AluI*, *HaeIII* veya *TaqI* restriksiyon enzimleri ile kesildi ve oluşan kesim ürünleri agaroz jel elektroforezi ile belirlendi.

*Bacillus cereus* ATCC 10876 referans suşu *AluI* enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 650bp, 225bp, 125bp olmak üzere 3 farklı bant profili oluşturdu. *HaeIII* enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 650bp, 500bp, 325bp ve 125bp olmak üzere 4 farklı bant profili oluşturdu. *TaqI* enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 850bp, 575bp ve 125bp olmak üzere 3 farklı bant profili oluşturdu.

*Bacillus subtilis* ATCC 6633 referans suşu *AluI* enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 650bp, 225bp, 125bp olmak üzere 3 farklı bant profili oluşturdu. *HaeIII* enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 650bp, 500bp, 325bp ve 125bp olmak üzere 4 farklı bant profili oluşturdu. *TaqI* enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 850bp, 575bp ve 125bp olmak üzere 3 farklı bant profili oluşturdu.

RFLK01 kodlu izolat *AluI* enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 500bp, 300bp ve 125 bp olmak üzere 3 farklı bant profili oluşturdu. *HaeIII* enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 750bp, 500bp, 325bp ve 125bp olmak üzere 4 farklı bant profili oluşturdu. *TaqI* enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 525bp, 450bp, 350bp ve 200bp olmak üzere 4 farklı bant profili oluşturdu.

RFLK03 kodlu izolat *AluI* enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 650bp, 225bp ve 125bp olmak üzere 3 farklı bant profili oluşturdu. *HaeIII* enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 650bp, 500bp, 325bp ve 125bp olmak üzere 4 farklı bant profili oluşturdu. *TaqI* enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 850bp, 575bp ve 125bp olmak üzere 3 farklı bant profili oluşturdu.

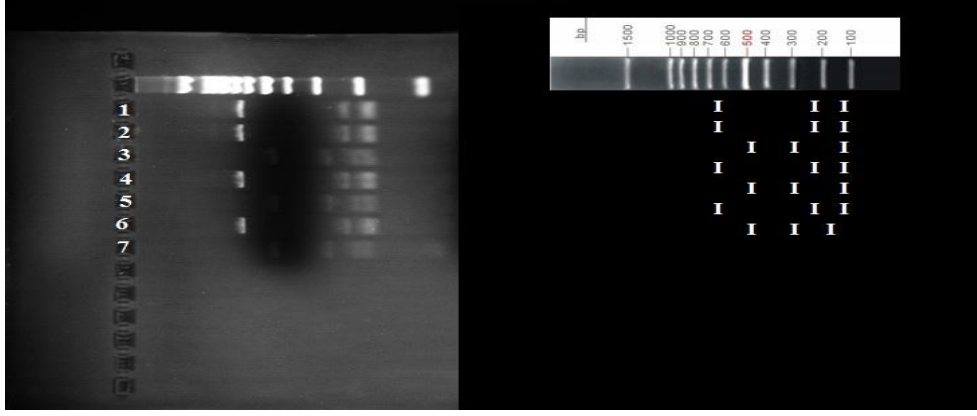
RFLK06 kodlu izolat AluI enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 500bp, 300bp ve 125 bp olmak üzere 3 farklı bant profili oluşturdu. HaeIII enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 750bp, 500bp, 325bp ve 125bp olmak üzere 4 farklı bant profili oluşturdu. TaqI enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 525bp, 450bp, 350bp ve 200bp olmak üzere 4 farklı bant profili oluşturdu.

RFLK08 kodlu izolat AluI enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 650bp, 225bp ve 125bp olmak üzere 3 farklı bant profili oluşturdu. HaeIII enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 650bp, 500bp, 325bp ve 125bp olmak üzere 4 farklı bant profili oluşturdu. TaqI enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 850bp, 575bp ve 125bp olmak üzere 3 farklı bant profili oluşturdu.

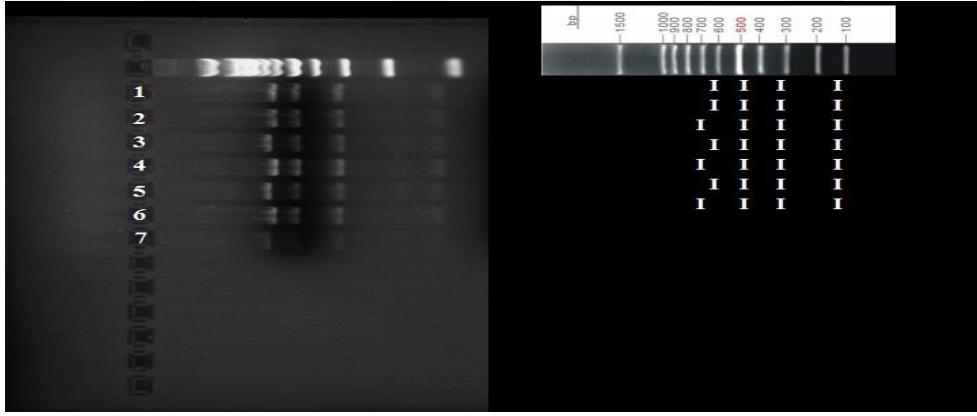
RFLK12 kodlu izolat AluI enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 500bp, 300bp ve 200bp olmak üzere 3 farklı bant profili oluşturdu. HaeIII enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 750bp, 500bp, 325bp ve 125bp olmak üzere 4 farklı bant profili oluşturdu. TaqI enzimi kesim reaksiyonunda, yaklaşık olarak 1000bp, 350bp ve 200bp olmak üzere 3 farklı bant profili oluşturdu.

ARDRA analizlerinin jel görüntüleri Şekil 3.37, Şekil 3.38 ve Şekil 3.39'da gösterildi. Jel görüntülerine Ladder'dan itibaren sırasıyla;

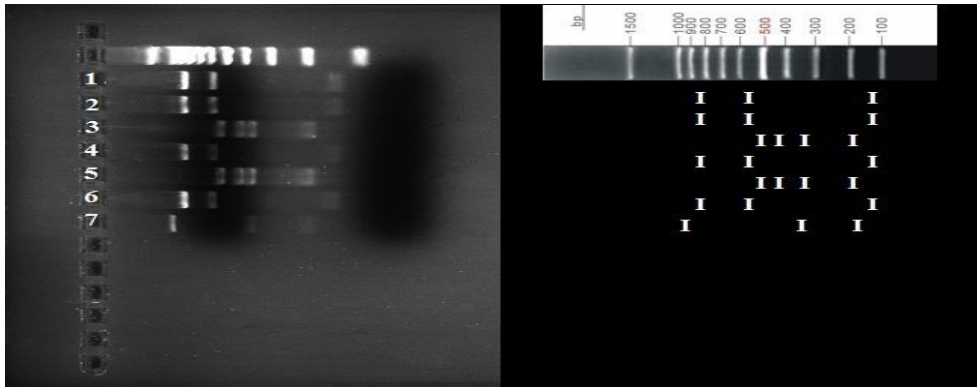
- 1)Referans suş; *Bacillus cereus* ATCC 10876
- 2)Referans suş: *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- 3)RFLK01 (*Bacillus mojavensis*)
- 4)RFLK03(*Bacillus thuringiensis*)
- 5)RFLK06(*Bacillus mojavensis*)
- 6)RFLK08(*Bacillus anthracis*)
- 7)RFLK12(*Bacillus stratosphericus*) yüklendi.



Şekil 3.37. AluI enzimi ile kesim reaksiyon sonucunun jel görüntüsü



Şekil 3.38. HaeIII enzimi ile kesim reaksiyon sonucunun jel görüntüsü

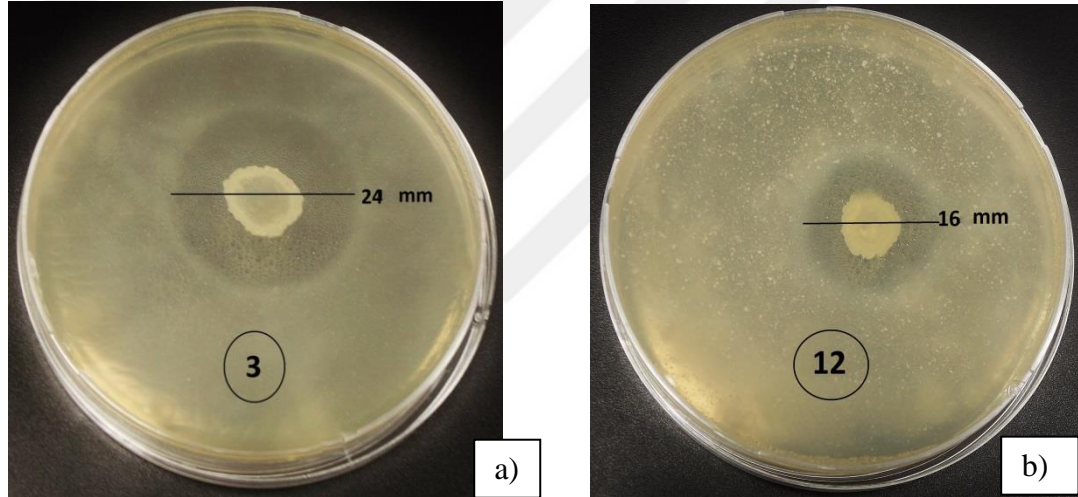


Şekil 3.39. TaqI enzimi ile kesim reaksiyon sonucunun jel görüntüsü

### 3.3. Proteaz Enzimi Üretimi

#### 3.3.1. Proteaz Aktivitesinin Kalitatif Belirlenmesi

İzolatların skimmilk agar besiyerinde, 27 °C’de, pH 7.0, 72 saat inkübasyonları sonucu oluşturdukları zon çapları Çizelge 3.7.’deve Şekil 3.40’de gösterildi.En büyük zon çapı RFLK07(*Aeromonas salmonicida*), en küçük zon çapı RFLK08(*Bacillus anthracis*)’de görüldü.



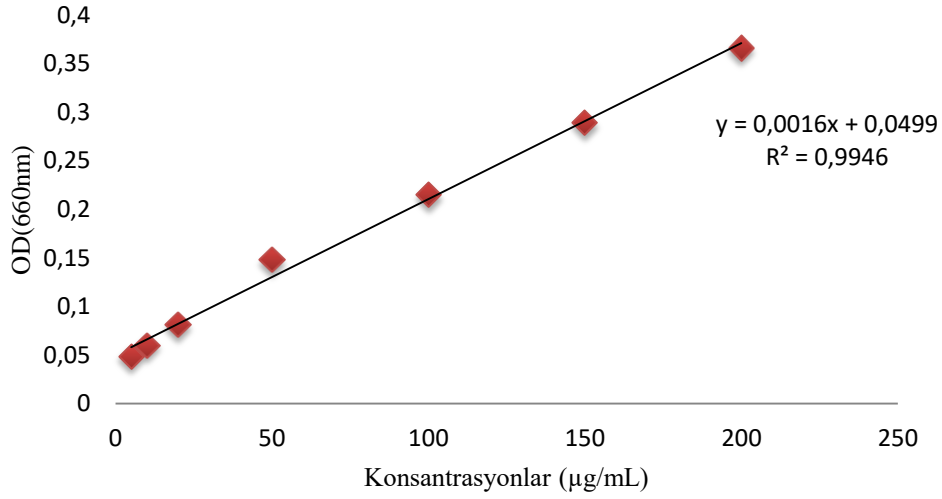
Şekil 3.40. a) RFLK03 ve b) RFLK12 izolatlarının proteaz üretimi sonucu zon çapları (mm)

Çizelge3.7.İzolatlarının zon çapları(mm)

İzolatlar	RFLK01	RFLK03	RFLK06	RFLK07	RFLK08	RFLK12
Zon Çapı (mm)	19 mm	24mm	23mm	33mm	12,5 mm	16mm

### 3.3.2. Proteaz Aktivitesinin Kantitatif Belirlenmesi

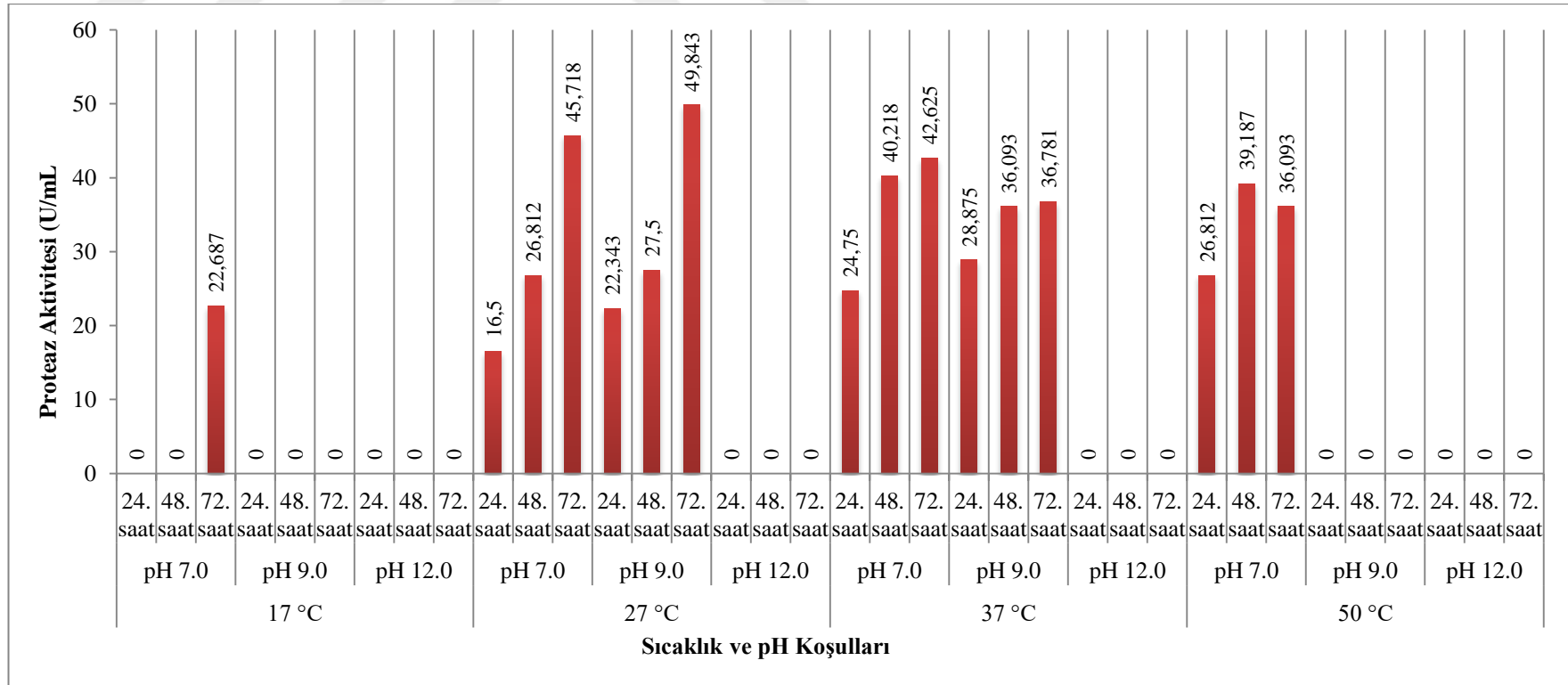
Proteaz aktivitesinin kantitatif belirlenmesi amacıyla tirozin standart grafiği oluşturuldu (şekil 3.41).



şekil 3.41. Tirozin Standart Grafiği

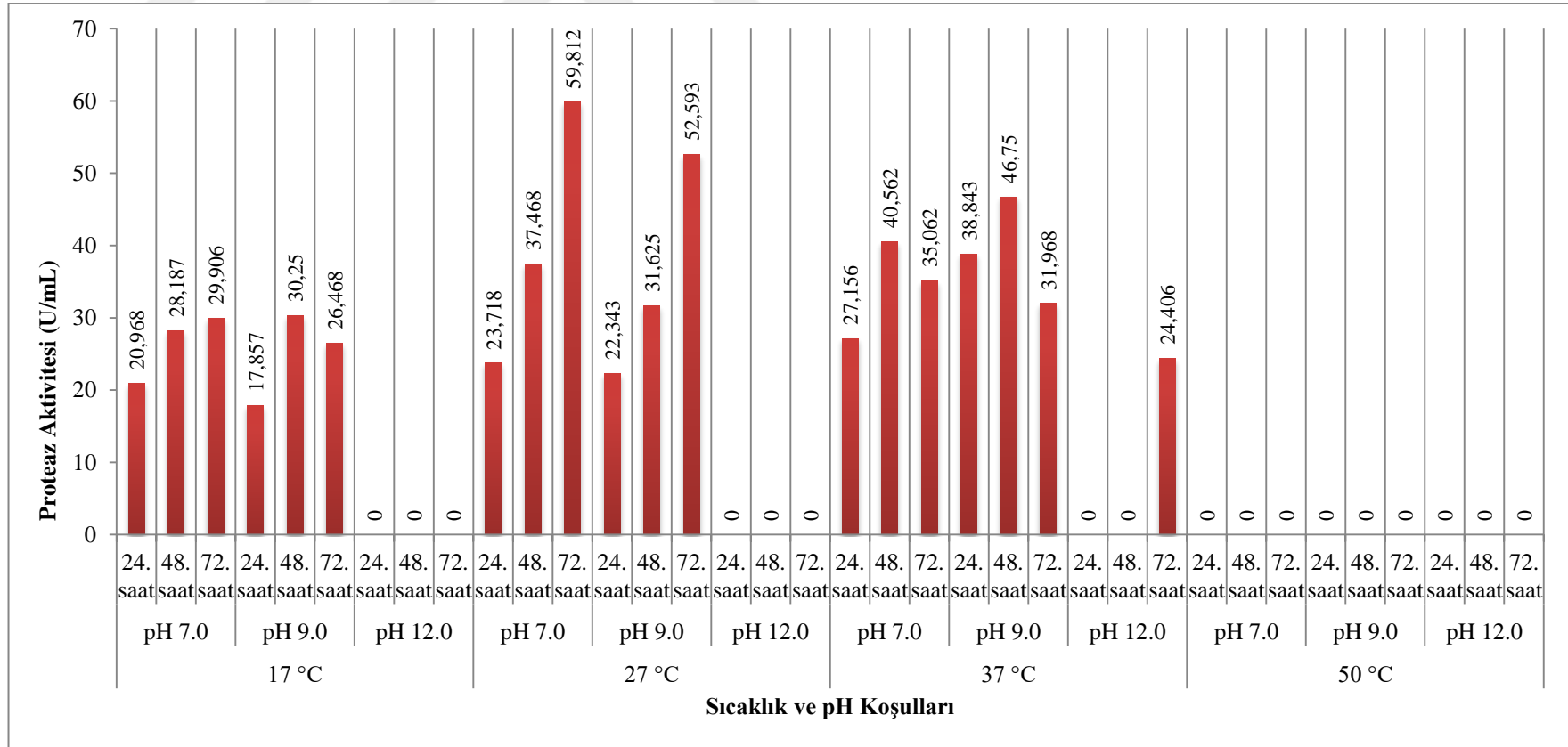
### 3.4. Optimum Proteaz Üretimini Gerçekleştiği Koşulların Belirlenmesi

#### 3.4.1. Proteaz Enziminin Optimum Üretildiği Sıcaklık ve pH Koşullarının Belirlenmesi

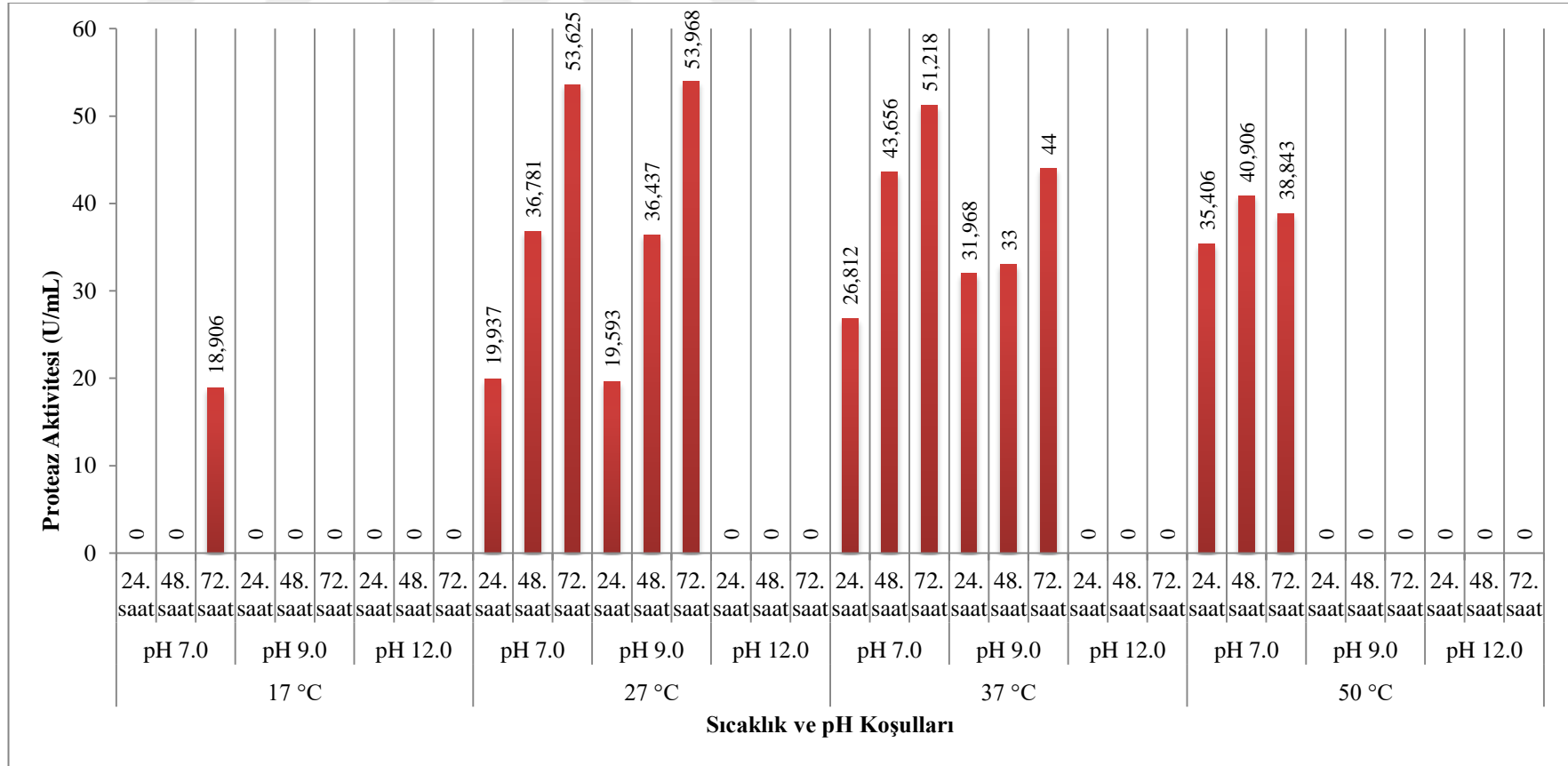


Şekil 3.42. RFLK01 (*Bacillus mojavensis*) proteaz enziminin optimum üretildiği sıcaklık ve pH koşulları

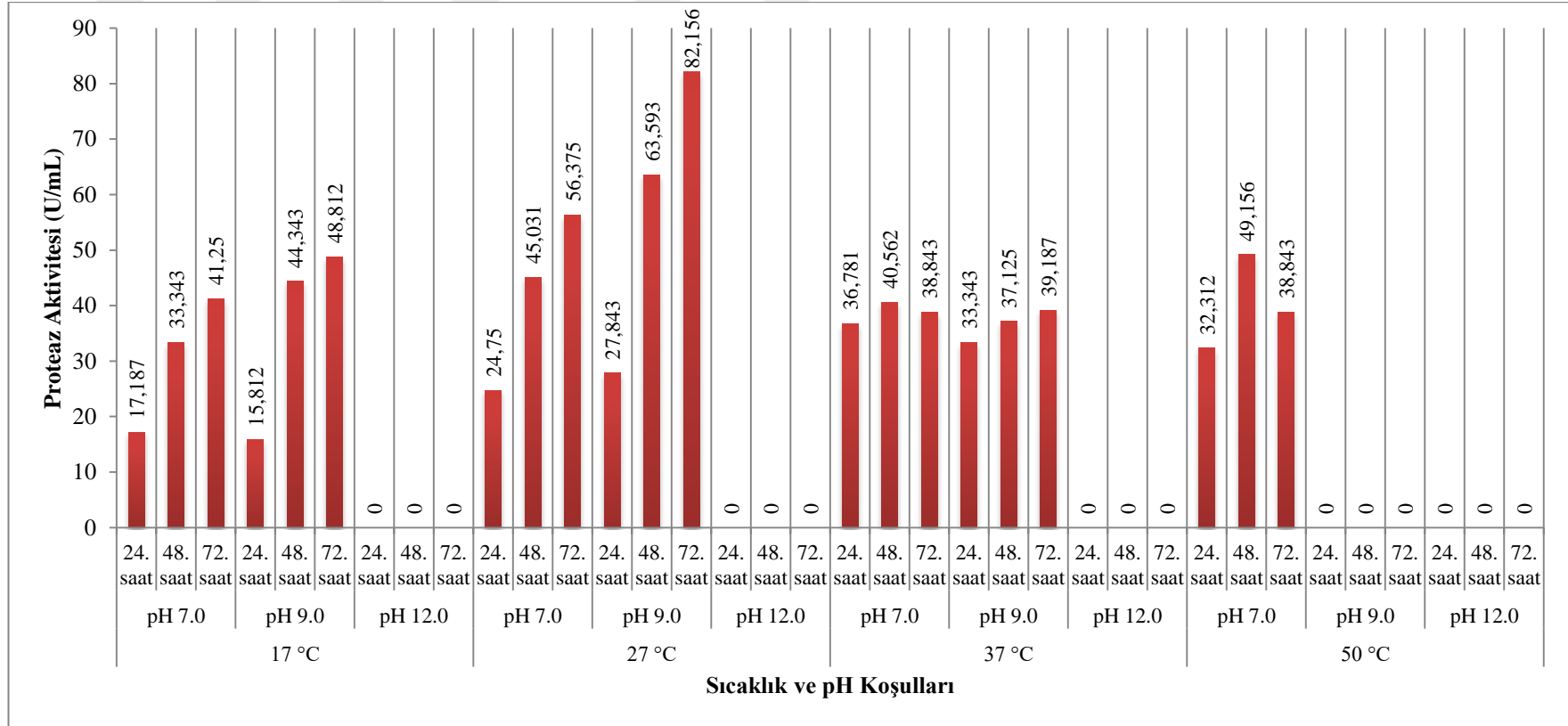




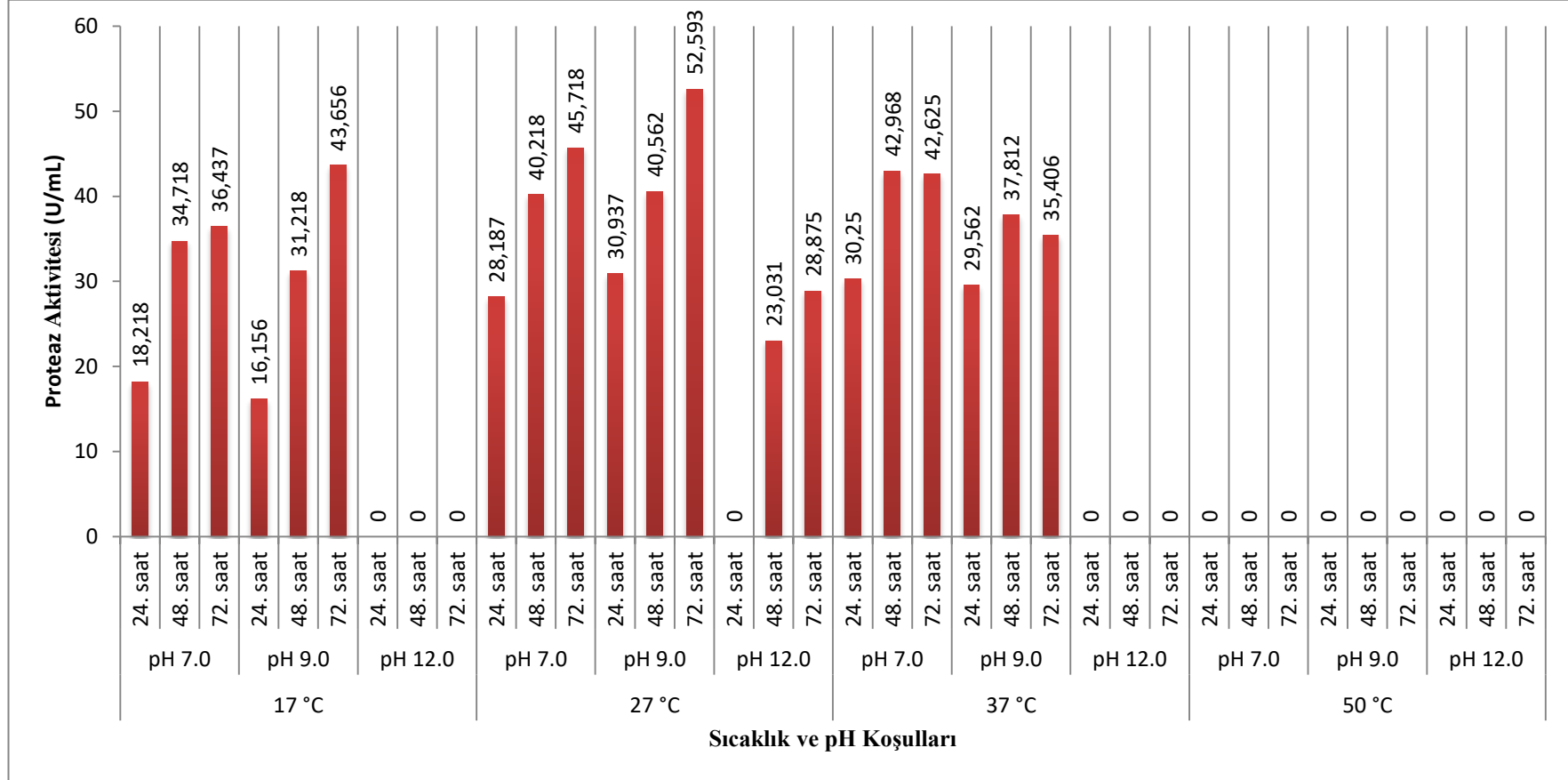
Şekil 3.43. RFLK03(*Bacillus thuringiensis*) proteaz enziminin optimum üretildiği sıcaklık ve pH koşulları



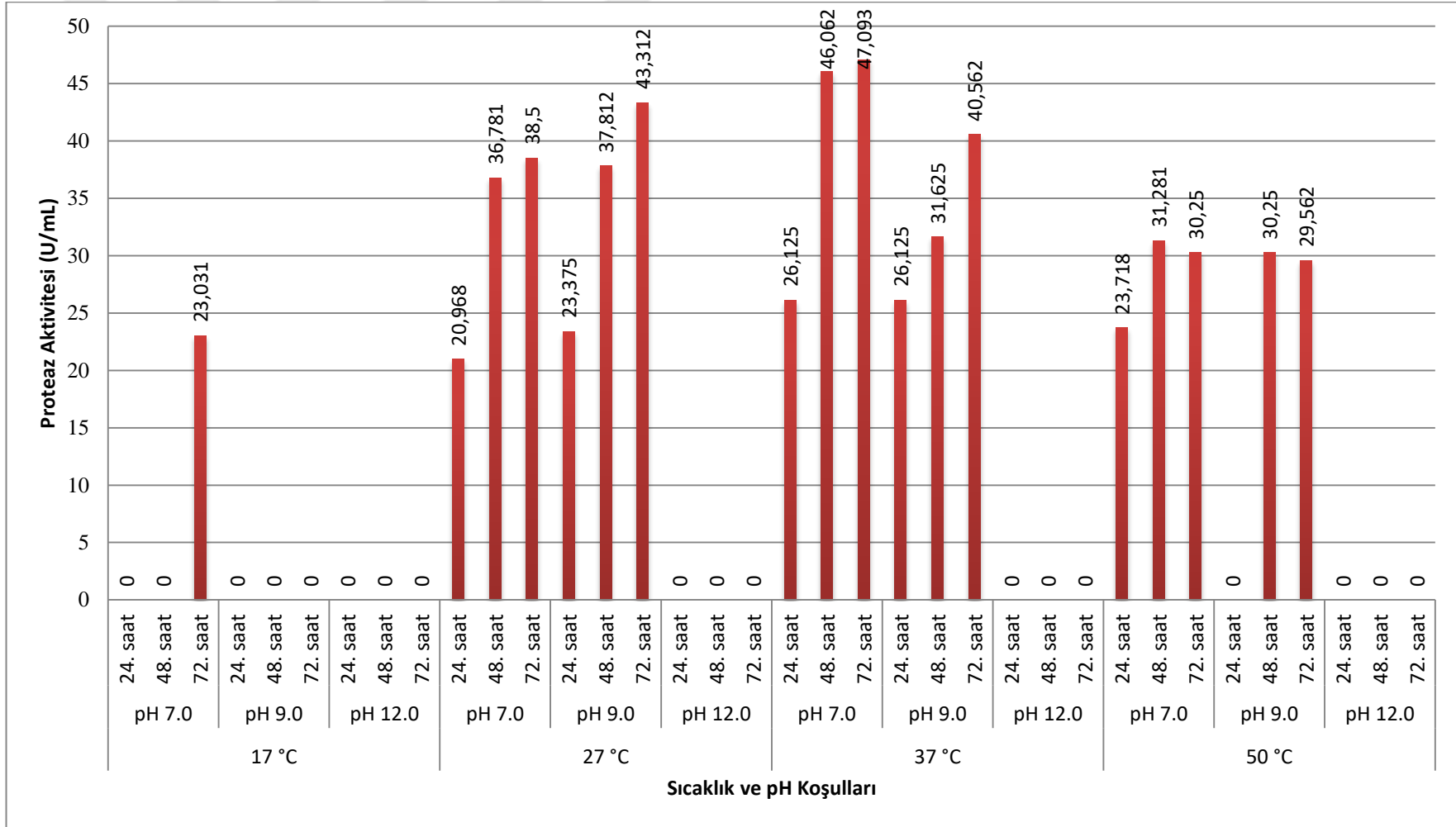
Şekil 3.44. RFLK06(*Bacillus mojavensis*)proteaz enziminin optimum üretildiği sıcaklık ve pH koşulları



Şekil 3.45. RFLK07(*Aeromonas salmonicida*) proteaz enziminin optimum üretildiği sıcaklık ve pH koşulları



Şekil 3.46. RFLK08(*Bacillus anthracis*) proteaz enziminin optimum üretildiği sıcaklık ve pH koşulları



Şekil 3.47. RFLK12(*Bacillus stratosphericus*) proteaz enziminin optimum üretildiği sıcaklık ve pH koşulları

Sonuçlara göre; Çizelge 3.8.'de izolatların optimum proteaz üretiminin gerçekleştiği sıcaklık ve pH koşulları gösterildi.

**Çizelge 3.8.**Optimum proteaz üretiminin gerçekleştiği sıcaklık ve pH koşulları

İzolatlar	Proteaz Aktivitesi (U/ mL)	Sıcaklık(°C)	pH koşulu
RFLK01	49,843	27 (°C)	pH 9.0
RFLK03	59,812	27 (°C)	pH 7.0
RFLK06	53,968	27 (°C)	pH 7.0
RFLK07	<b>82,156</b>	27 (°C)	pH 9.0
RFLK08	52,593	27 (°C)	pH 9.0
RFLK12	47,093	37 (°C)	pH 7.0

En yüksek proteaz aktivitesi RFLK07 kodlu izolat tarafından gerçekleştirildi. Ancak RFLK07 izolatı *Aeromonas salmonicida* olarak tanımlandığı için patojenitesinden dolayı endüstriyel üretime uygun olmadığı düşünüldü. RFLK07 haricinde proteaz aktivitesi en yüksek olan RFLK03 kodlu izolatın hem patojen olmaması hem de ürettiği optimum proteaz enziminin oda sıcaklığı ve nötral pH koşulları gibi biyoteknolojik uygulanabilirliğe uygun olması sebebi ile bundan sonraki çalışmalara (enzimin özelliklerinin belirlenmesi ve enzimin kısmi saflaştırılması) bu izolat üzerinden devam edildi.

#### **3.4.2. Proteaz Enziminin Optimum Üretildiği İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi**

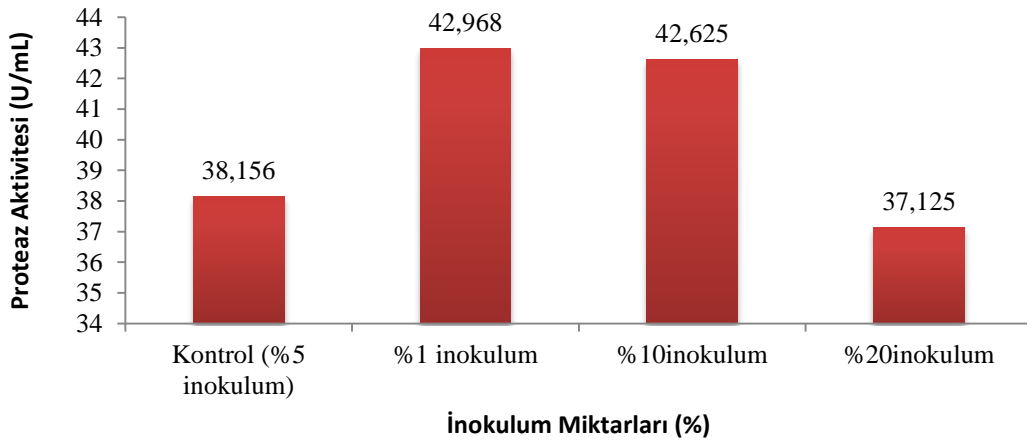
İnkübasyon süresi olarak 24 saat, 48 saat ve 72 saat olmak üzere 3 farklı zaman dilimi araştırıldı. Çizelge3.9.'da izolatların optimum enzim ürettiği inkübasyon süreleri verildi. Tüm izolatların 72. saatte optimum proteaz ürettiği saptandı.

**Çizelge 3.9.** Optimum proteaz üretiminin gerçekleştiği inkübasyon süreleri

İzolatlar	Proteaz Aktivitesi (U/ mL)	İnkübasyon Süresi
RFLK01	49,843	72. saat
RFLK03	59,812	72. saat
RFLK06	53,968	72. saat
RFLK07	82,156	72. saat
RFLK08	52,593	72. saat
RFLK12	47,093	72. saat

### 3.4.3. Proteaz Enziminin Optimum Üretildiği İnokulum Oranının Belirlenmesi

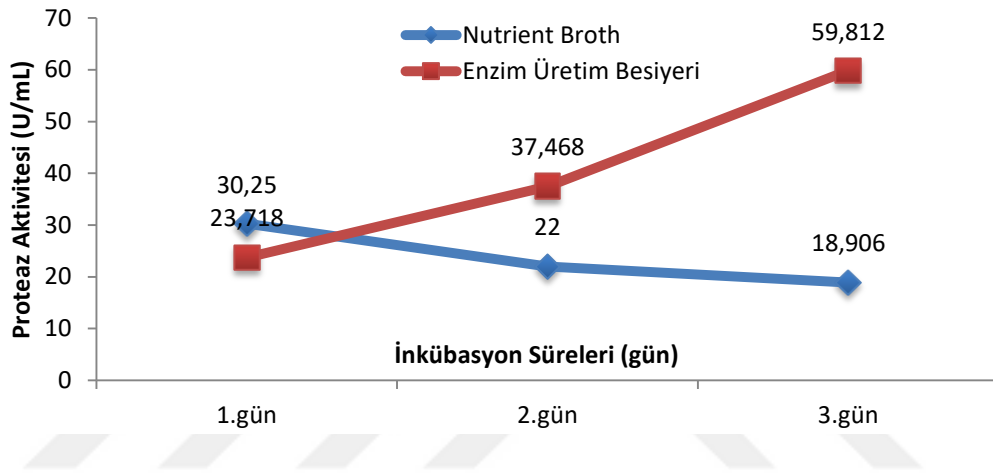
RFLK03 kodlu izolat için, %1, %5, %10 ve %20 olmak üzere 4 farklı inokulum oranı araştırıldı. İnkübasyon sonunda proteaz aktiviteleri hesaplanarak proteaz enziminin optimum üretildiği inokulum oranı belirlendi (Şekil 3.48). Proteaz üretimi için en iyi inokulum oranı % 1, en düşük proteaz üretimi ise % 20 inokulum ile gerçekleşti.



**Şekil 3.48.** RFLK03 izolatı için inokulum oranının proteaz üretimine etkisi

### 3.4.4. Proteaz Enziminin Üretildiği Optimum Besiyerinin Belirlenmesi

Enzim üretimi besiyerinin proteaz üretimini teşvik edici özelliğinin belirlenmesi amacıyla Nutrient Broth besiyeri ile aynı inkübasyon koşullarında proteaz aktiviteleri açısından karşılaştırıldı (Şekil 3.49).

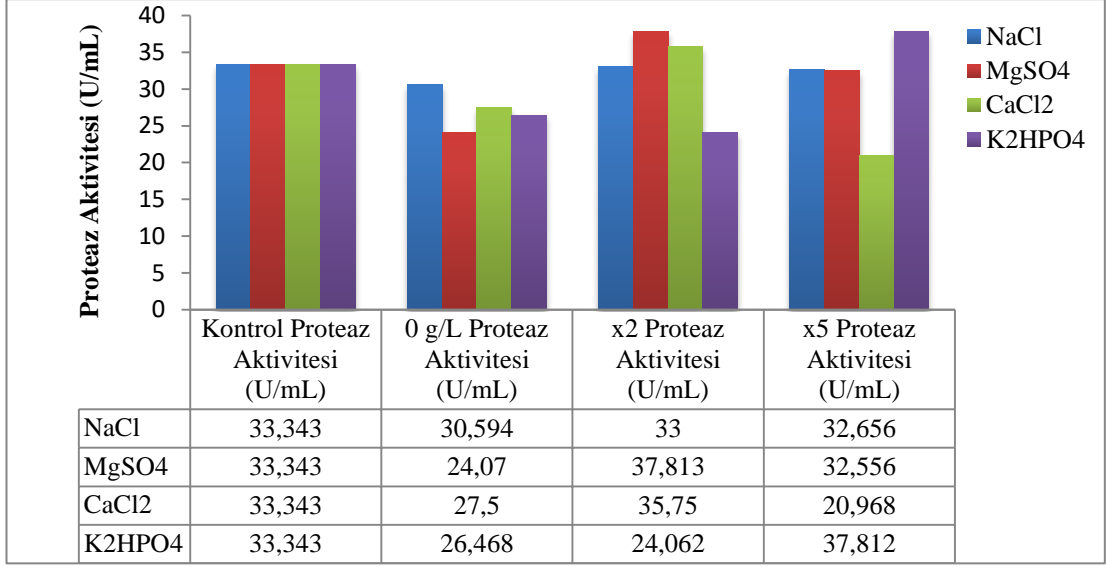


Şekil 3.49. Enzim üretim besiyeri ile Nutrient Broth'un enzim üretimine etkisi

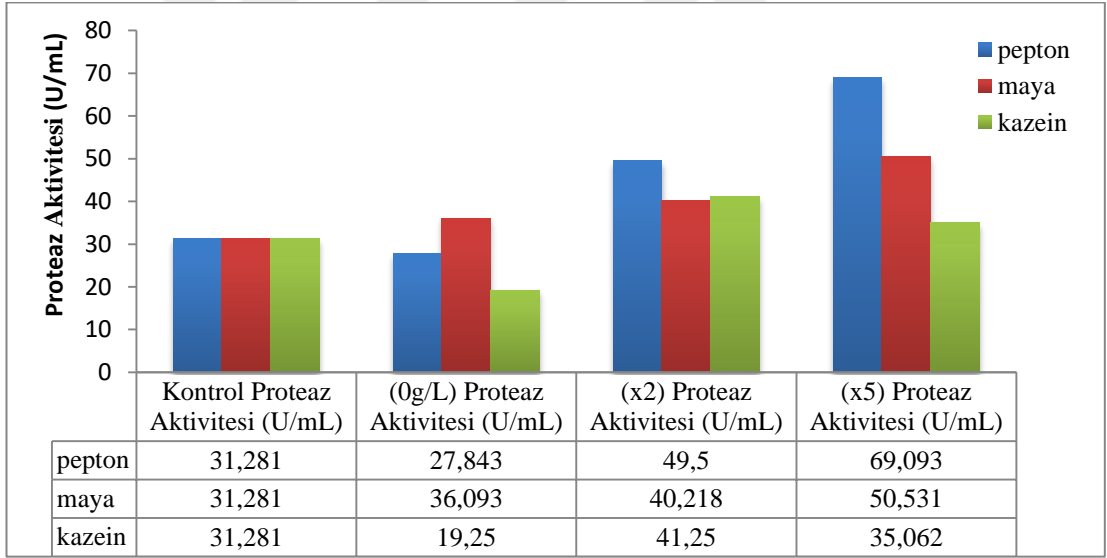
#### 3.4.4.1. Optimize Enzim Üretim Besiyeri

Enzim üretim besiyerindeki bileşenler inorganikler ve organikler olarak 2 ana başlıkta incelendi. Enzim üretim besiyeri içeriğinde bulunan inorganik bileşenler; NaCl, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> VE KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>'tür. Besiyeri içeriğinde 3 farklı konsantrasyonda bulunan bu bileşenlerin proteaz aktivitesi sonuçları Şekil 3.50'de gösterildi. Enzim üretim besiyeri içeriğinde bulunan organik bileşenler; pepton, maya özütü ve kazeindir. Besiyeri içeriğinde 3 farklı konsantrasyonda bulunan bu bileşenlerin proteaz aktivitesi sonuçları Şekil 3.51'de gösterildi.





**Şekil 3.50.** Enzim üretim besiyerindeki inorganik bileşenlerin proteaz aktivitesine etkisi



**Şekil 3.51.** Enzim üretim besiyerindeki organik bileşenlerin proteaz aktivitesine etkisi

Optimize enzim üretim besiyerinde en yüksek proteaz aktivitesine sahip olan bileşen konsantrasyonları Çizelge 3.10.'da gösterildi. İnorganik bileşenlerin konsantrasyonlarının giderek artması ile proteaz üretimi arasında doğrusal bir ilişki gözlenmedi. Organik bileşenlerden ise pepton ve maya özütünün konsantrasyon

arttikça proteaz üretiminin arttığı saptandı. Pepton konsantrasyonunun 5 kat artması proteaz üretimini % 106 (2 kattan daha fazla) arttırdığı, maya özütünün konsantrasyonunun 5 kat artması proteaz üretimini % 51 arttırdığı, kazeinin ise konsantrasyonunun 2 kat artması proteaz üretimini % 23 arttırdığı saptandı.

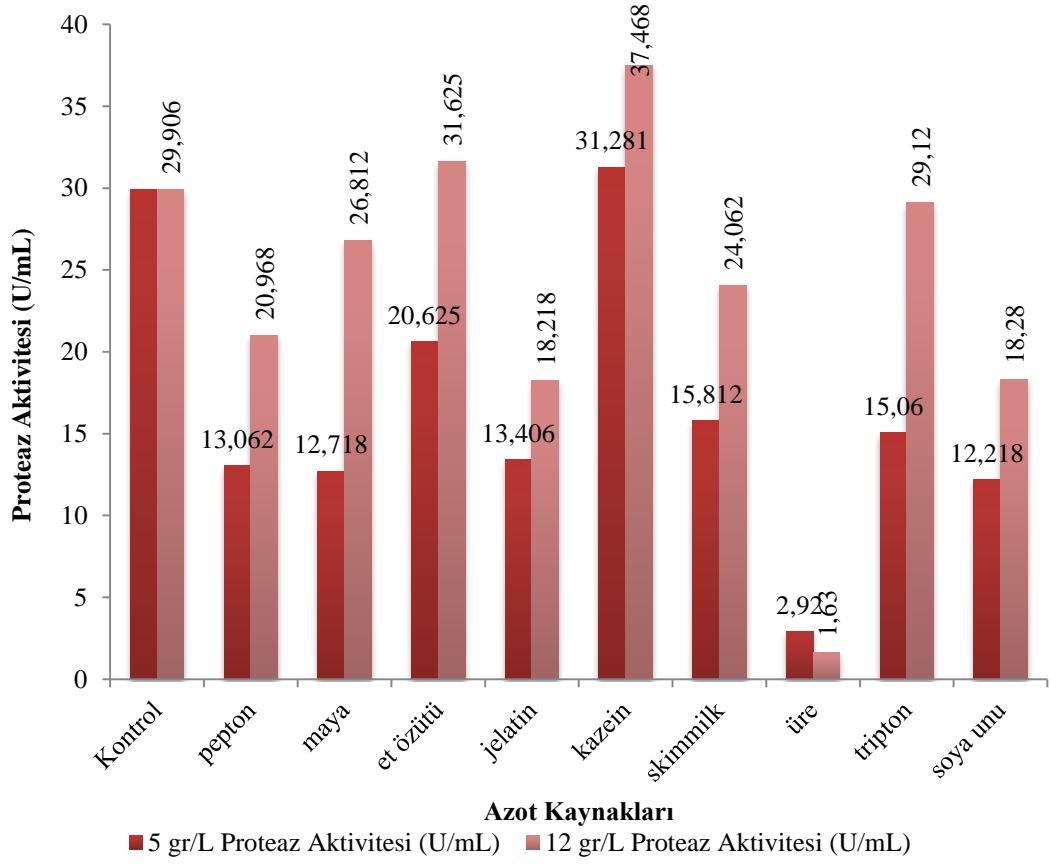
**Çizelge 3.10.** Optimize enzim üretim besiyeri bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşenler	İnorganik Bileşenler				Organik Bileşenler		
	NaCl	MgSO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pepton	maya özütü	kazein
Konsantrasyon (g/L)	5	0,4	0,2	5	25	10	10
Proteaz Aktivitesi (U/mL)	33,34	37,81	35,75	37,812	69,093	50,531	41,25

#### 3.4.4.2. Tek Azot Kaynağı Bulunan Modifiye Enzim Üretim Besiyeri

Enzim üretimi besiyerindeki diğer bileşenler sabit kalmak şartıyla, organik kaynakların yerine tek azot kaynaklarının eklenmesiyle modifiye enzim üretim besiyeri oluşturuldu. Azot kaynakları 5 g/L ve 12g/L olmak üzere 2 farklı konsantrasyonda araştırıldı. Araştırılan organik azot kaynakları; pepton, maya, et özütü, jelatin, kazein, skimmilk, üre, tripton ve soya unudur. Kontrol olarak enzim üretim besiyeri kullanıldı. Aynı inkübasyon koşullarında proteaz aktiviteleri hesaplanarak karşılaştırıldı. Sonuçlar Şekil 3.52’de gösterildi.

Tek azot kaynaklarının konsantrasyonları 5 g/L’den 12 g/L’ye çıktıkça proteaz üretiminin arttığı gözlemlendi. Et özütü ve kazeinin 12 g/L konsantrasyonlarının kontrol olarak kullanılan enzim üretim besiyerinin proteaz üretimi yeteneğinden yüksek olduğu saptandı. Bu sonuçlara göre Organik bileşenlerin et özütü (6 g/L) ve kazein (6 g/L) olduğu yeni bir modifiye enzim üretim besiyeri oluşturuldu.

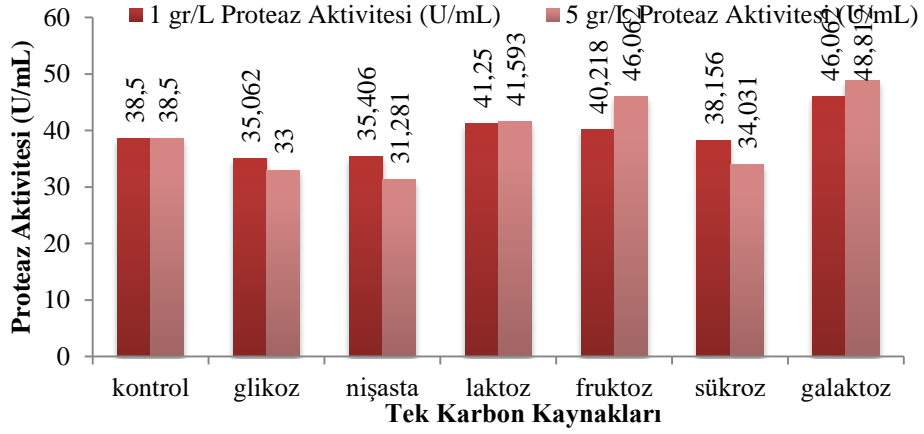


Şekil 3.52. Besiyerindeki tek azot kaynaklarının proteaz aktivitesine etkisi

### 3.4.4.3. Karbon Kaynağı Bulunan Modifiye Enzim Üretim Besiyeri

Enzim üretimi besiyerindeki tüm bileşenler sabit kalmak şartıyla, karbon kaynaklarının ilavesiyle modifiye enzim üretim besiyeri oluşturuldu. Karbon kaynakları 1 g/L ve 5 g/L olmak üzere 2 farklı konsantrasyonda eklendi. Araştırılan karbon kaynakları; glikoz, nişasta, laktoz, fruktoz, sükröz ve galaktozdur. Kontrol olarak enzim üretim besiyeri kullanıldı. Aynı inkübasyon koşullarında proteaz aktivitelerikarşılaştırıldı. Sonuçlar Şekil 3.53’de gösterildi.

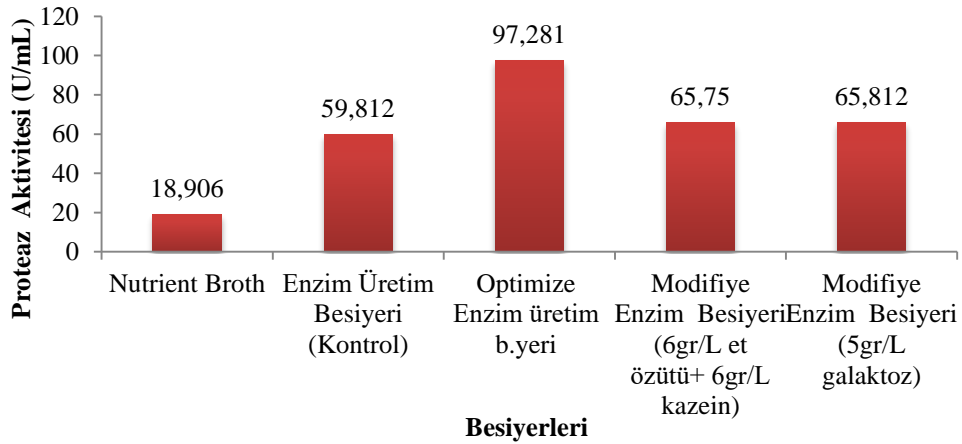
Glikoz, nişasta ve sükrözün proteaz üretimini teşvik edici olmadıkları, laktoz, galaktoz ve fruktozun ise proteaz üretimini arttırdıkları gözlemlendi. En yüksek artış galaktozda görüldü.



Şekil 3.53. Besiyerindeki tek karbon kaynaklarının proteaz aktivitesine etkisi

#### 3.4.4.4. Farklı besiyerlerinde Elde Edilen Proteaz Aktiviteleri

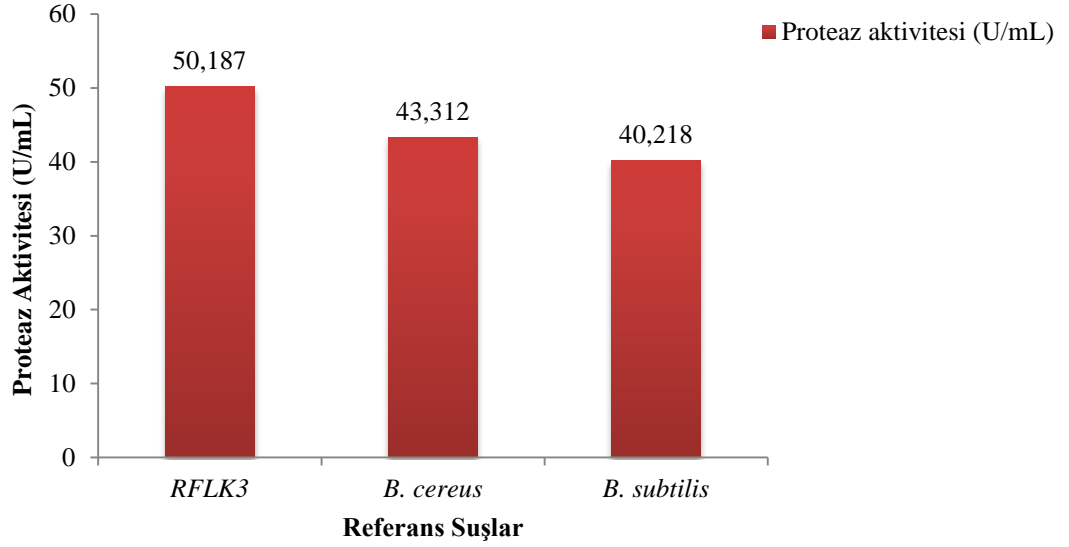
Karşılaştırılan besiyerleri; Nutrient Broth besiyeri, enzim üretim besiyeri, optimize enzim üretim besiyeri, modifiye enzim üretim besiyeri (organik bileşen olarak 6g/L et özütü ve 6 g/L kazein içeren), modifiye enzim üretim besiyeri 2 (5 g/L galaktoz içeren)'dir. Aynı inkübasyon şartlarında proteaz aktiviteleri hesaplanarak birbirleriyle kıyaslandı. Sonuçlar Şekil 3.54.'de gösterildi. En yüksek proteaz üretimi optimize enzim üretiminde görüldü. En düşük proteaz üretimi ise Nutrient Broth'da gerçekleşti.



Şekil 3.54. Farklı besiyerlerinin proteaz aktivitelerinin karşılaştırılması

### 3.4.5.Referans Suşlar ile RFLK03 Kodlu İzolatın ProteazAktivitelerinin Karşılaştırılması

Referans suşlar; *Bacillus cereus* ATCC 10876 ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633'tür. Sonuçlar Şekil 3.55'de gösterildi. RFLK03(*Bacillus thuringiensis*) izolatının proteaz aktivitesinin referans suşlardan daha yüksek olduğu belirlendi.

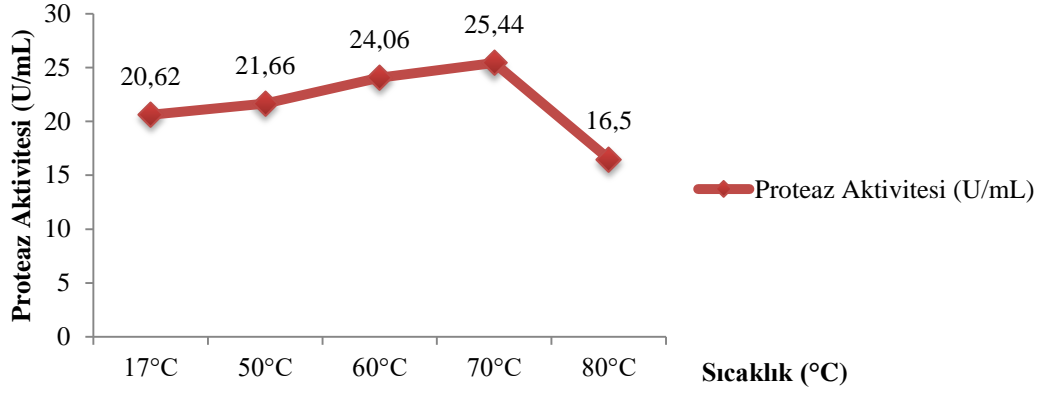


Şekil 3.55. Referans Suşlar ile RFLK03 izolatınınaktivitelerinin karşılaştırılması

## 3.5. Enzim Özelliklerinin Belirlenmesi

### 3.5.1. Sıcaklığın Proteaz Aktivitesine Etkisi

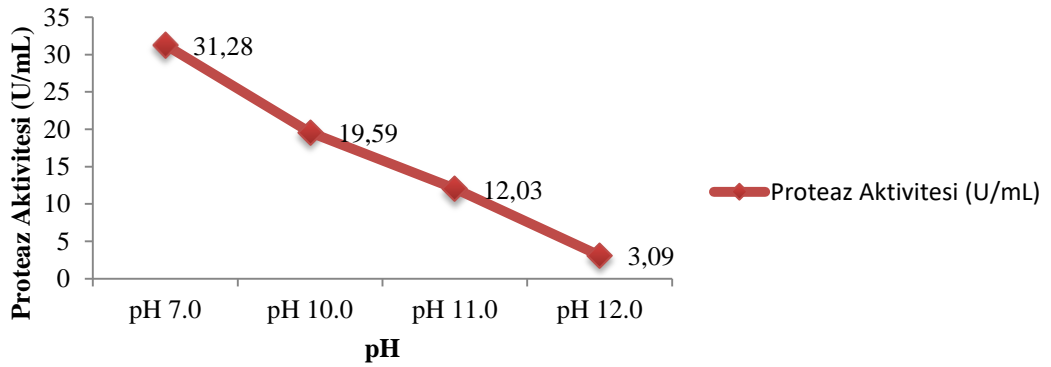
Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisinin incelendiği çalışmanın sonuçlarıŞekil 3.56'da gösterildi. Enzimin 17 °C ile 80 °C arasında aktivitesini koruduğu gözlemlendi. Enzimin optimum aktive olduğu sıcaklık 70 °C bulundu.



Şekil 3.56. Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi

### 3.5.2. pH Değerinin Proteaz Aktivitesine Etkisi

pH değerinin enzim aktivitesine etkisinin incelendiği çalışmanın sonuçları Şekil 3.57’de gösterildi. Enzimin aktive olduğu optimum pH değerinin pH 7.0 olduğu, pH değeri arttıkça aktivitesinin düştüğü gözlemlendi.



Şekil 3.57. pH’in enzim aktivitesine etkisi

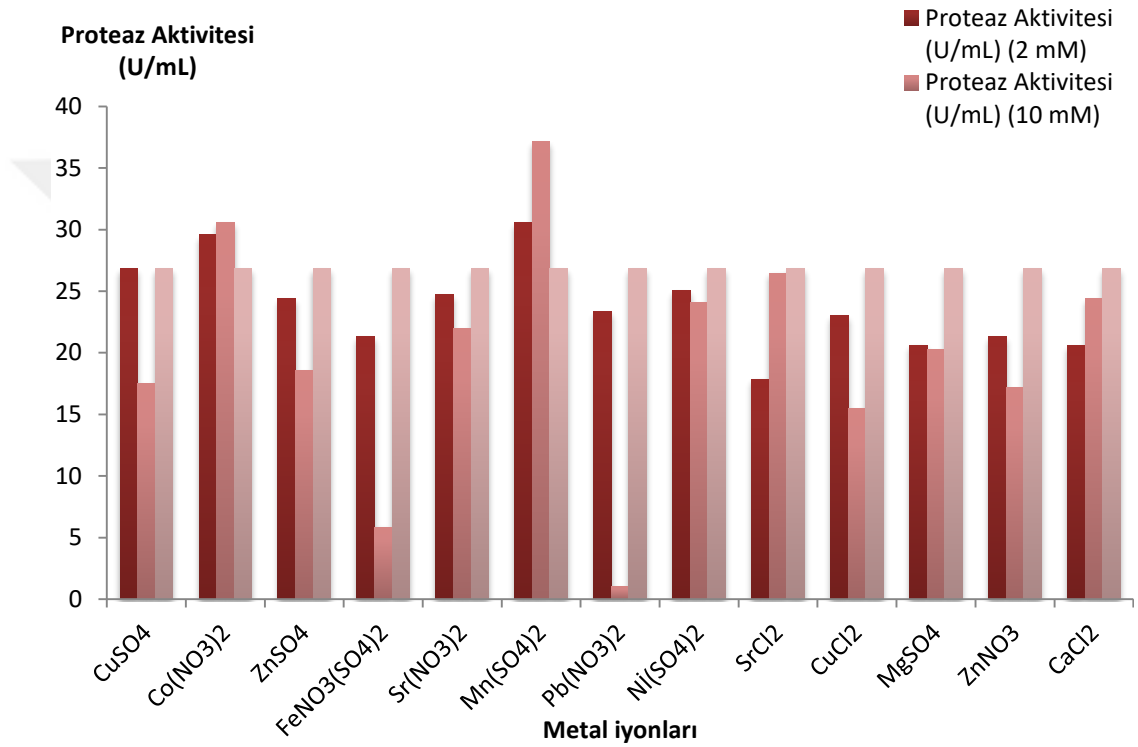
### 3.5.3. Metal İyonlarının Proteaz Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi

Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisinin belirlendiği çalışmaların sonuçları Çizelge 3.11’de, (+2) değerlikli metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi Şekil 3.58’de gösterildi. Enzimin araştırılan metal iyonları varlığında aktivitesini koruduğu; mangan ve kobalt varlığında aktivitesini arttırdığı gözlemlendi (Şekil 3.58).

**Çizelge 3.11.** Metal İyonlarının Proteaz Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi

Metal iyonları	Kontrol	Proteaz Aktivitesi (U/mL) (2 mM)	Proteaz Aktivitesi (U/mL) (10 mM)
	26,81		
LiCl		15,81	22,34
NaCl		24,06	23,03
KCl		21,31	25,78
AlCl <sub>3</sub>		22,00	10,31
Cr(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>		24,41	19,25
FeCl <sub>3</sub>		17,19	20,63
CuSO <sub>4</sub>		26,81	17,53
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		<b>29,56</b>	<b>30,60</b>
ZnSO <sub>4</sub>		24,41	18,56
FeNO <sub>3</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>		21,31	05,84
Sr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		24,75	22,00
Mn(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>		<b>30,59</b>	<b>37,13</b>
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		23,37	01,03
Ni(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>		25,09	24,06
SrCl <sub>2</sub>		17,87	26,47
CuCl <sub>2</sub>		23,03	15,47

MgSO <sub>4</sub>	20,63	20,28
ZnNO <sub>3</sub>	21,31	17,19
CaCl <sub>2</sub>	20,62	24,41
MgCl	20,28	21,66

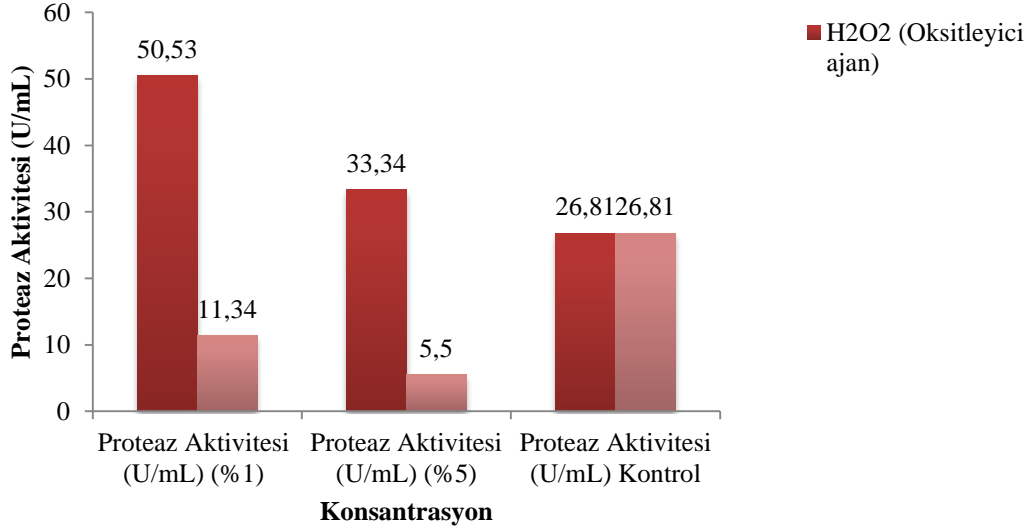


**Şekil 3.58.** Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi

### 3.5.4. Çeşitli Kimyasalların Proteaz Aktivitesine Etkisi

Çeşitli kimyasalların proteazaktivitesine etkisinin belirlendiği çalışmaların sonuçları Şekil 3.59'da gösterildi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin aktiviteyi büyük ölçüde arttırdığı (yaklaşık 2 kat), SDS'in ise büyük ölçüde azalttığı gözlemlendi.

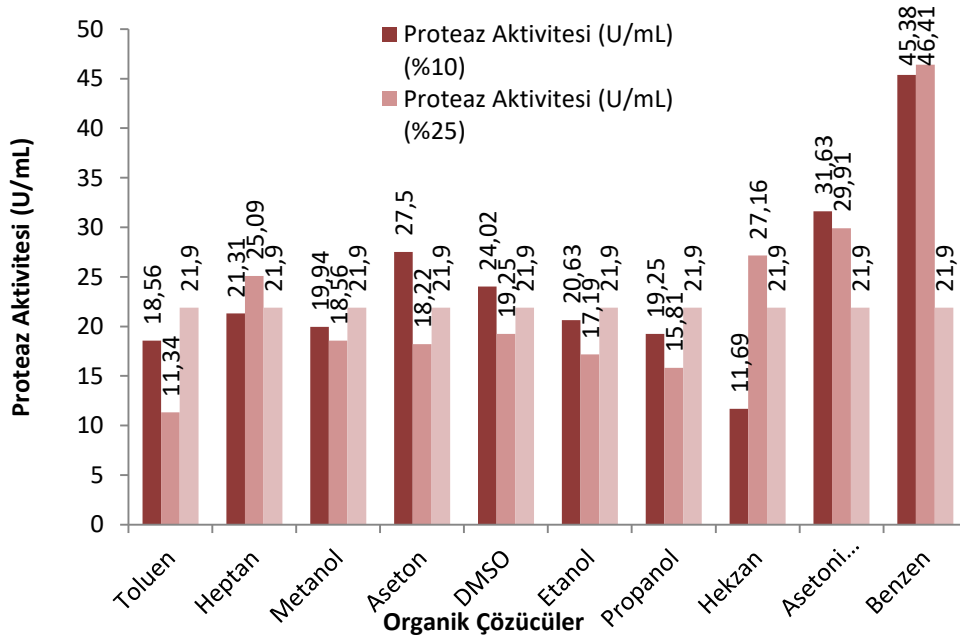




Şekil 3.59. Çeşitli kimyasalların enzim aktivitesine etkisi

### 3.5.5. Organik Çözücülerin Proteaz Aktivitesine Etkisi

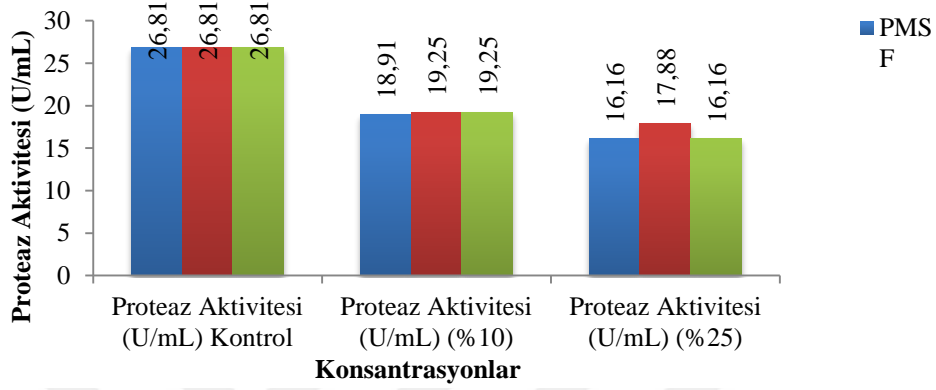
Organik çözücülerin varlığında proteaz aktivitesinin korunduğu, benzenin aktiviteyi büyük ölçüde arttırdığı (yaklaşık 2 kat) gözlemlendi (Şekil 3.60.).



Şekil 3.60. Organik çözücülerin enzim aktivitesine etkisi

### 3.5.6. İnhibitörlerin Proteaz Aktivitesine Etkisi

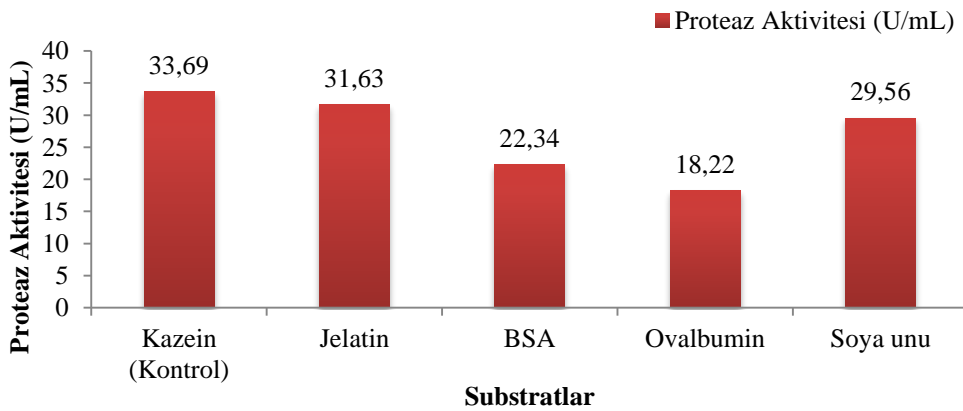
İnhibitörlerin proteazaktivitesine etkisinin belirlendiği çalışmaların sonuçlarına göre EDTA ve PMSF'nin enzim aktivitesini % 40, DPPH'ın ise % 34 oranında inhibe ettiği saptandı (Şekil 3.61).



Şekil 3.61. İnhibitörlerin enzim aktivitesine etkisi

### 3.5.7. Substrat Özgüllüğü

Substrat özgüllüğünün belirlendiği çalışmaların sonuçlarına göre; enzimin kazein, jelatin ve soya ununu hidrolize etmede, BSA ve ovalbumine göre daha başarılı olduğu saptandı (Şekil 3.62.).

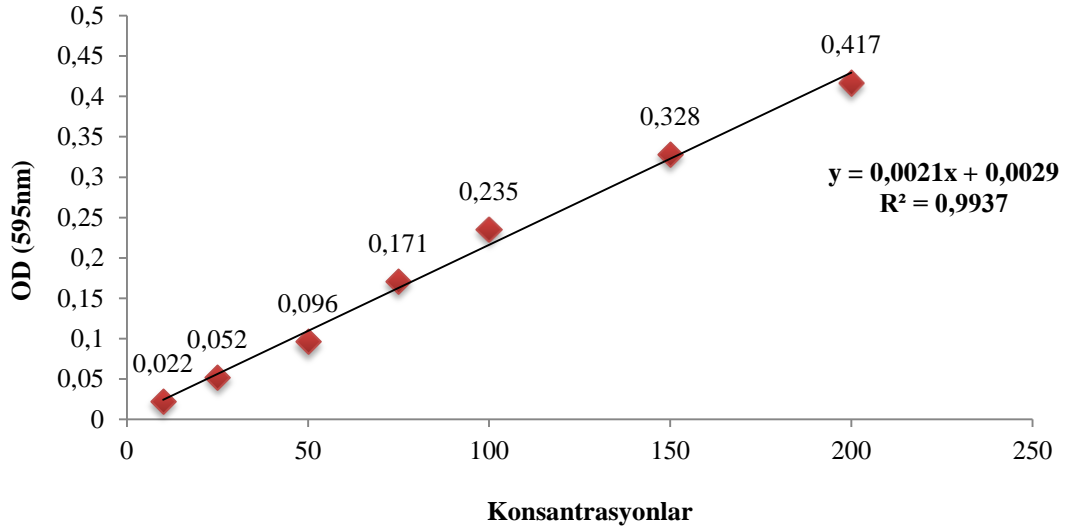


Şekil 3.62. Substrat özgüllüğü

### 3.6. Enzimin Kısmi Saflaştırılması

#### 3.6.1. Toplam Protein Miktarının Hesaplanması

##### 3.6.1.1. BSA Standart Grafiği



Şekil 3.63. BSA Standart Grafiği

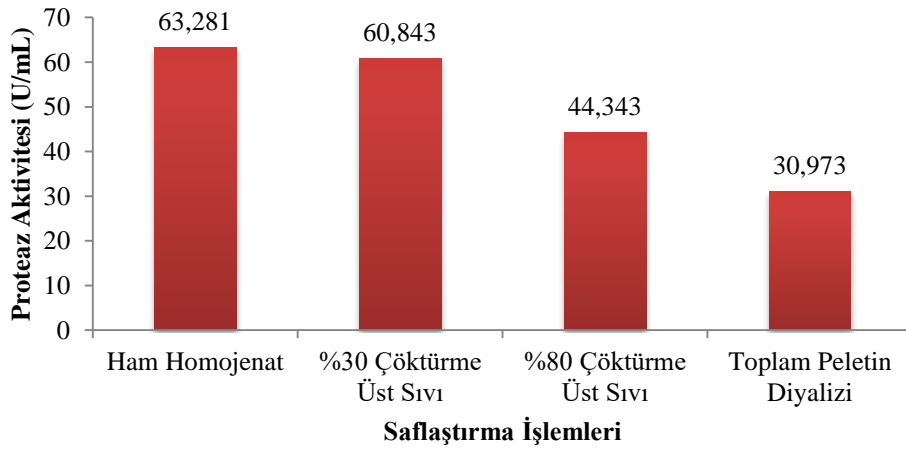
#### 3.6.2. Saflaştırma Basamakları

Enzimin kısmi saflaştırılması için sırasıyla; Santrifügasyon, Çöktürme, Diyaliz ve İyon Değişimi Kromatografisi işlemleri uygulandı. Her bir basamak sonunda saflaştırılan enzimin proteaz aktivitesi(U/mL), protein miktarı ( $\mu\text{g/mL}$ ), spesifik aktivitesi (U/mg), verim(%) ve saflaştırma katsayısı hesaplandı. Sonuçlar Çizelge 3.12, Şekil 3.64 ve Şekil 3.65’de gösterildi.

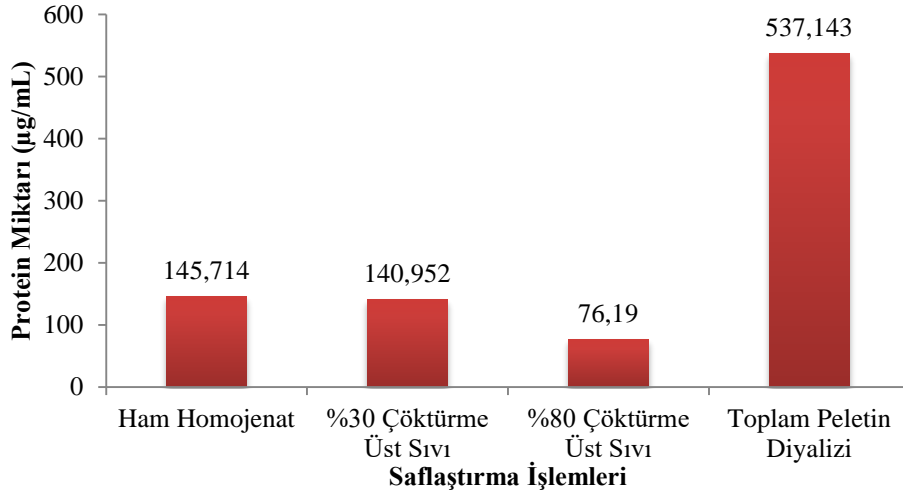
**Çizelge 3.12.**Saflaştırma basamakları ve parametrelerin etkisi

RFLK03	Ham Homojenat	%30 Ç. (üst sıvı)	%80 Ç. (üst sıvı)	Diyaliz (Pelet)	Kromatografi (5No'lu Frak.)	Kromatografi (31No'lu Frak.)
Proteaz Aktivitesi (U/ mL)	63,281	60,843	44,343	30,973	6,875	13,75
Protein Miktarı (µg/mL)	145,714	140,952	76,19	537,143	63,3	119,5
Spesifik Aktivite (U/mg)	436,42	-	-	576,7	1091,2	1155,4
Enzim Hacmi(mL)	50	-	-	5	5	5
Verim (%)	100	-	-	30	150	164
Saflaştırma Katsayısı	1,0	-	-	1,3	2,5	2,6

Kısmi saflaştırma sonuçlarına göre enzim saflaştırıldıkça proteaz aktivitesinde düşüş, protein miktarında artış meydana geldiği; kromatografi sonrası; proteaz aktivitesinin düştüğü, spesifik proteaz aktivitesinin arttığı saptandı. Proteaz enzimi; NaCl içermeyen fraksiyonlarda ve 1 M NaCl içeren fraksiyonlarda görüldü. Protein miktarları yüksek olan 5 ve 31 numaralı fraksiyonlara enzimin moleküler ağırlığının tespiti için SDS-PAGE analizi yapıldı. Kromatografiye ait sonuçlar Çizelge 3.13, Şekil 3.66. ve Şekil 3.67.'de gösterildi.



**Şekil 3.64.** Kısmi saflaştırmanın proteaz aktivitesine etkisi



**Şekil 3.65.**Kısmi safıştırmanın protein miktarına etkisi

**Çizelge 3.13.** Fraksiyonların Proteaz Aktiviteleri (U/mL), Protein Miktarları (µg/mL) ve Spesifik Aktiviteleri (U/mg)

Fraksiyonlar	Proteaz Aktivitesi (U/mL)	Protein Miktarları (µg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg) (1/10)
1	0	1,428	0
2	0	26,19	0
3	0	28,571	0
4	0	30,476	0
5	6,875	63,3	109,12
6	6,875	31,428	218,94
7	13,75	30	458,33
8	20,625	25,714	825
9	0	31,428	0
10	20,625	22,381	937,5
11	0	15,238	0
12	0	8,571	0
13	0	6,19	0
14	0	6,19	0
15	27,5	6,66	<b>4583,3</b>
16	6,875	9,047	763,88
17	0	9,047	0
18	0	10,476	0
19	<b>41,25</b>	10	4125
20	0	7,142	0
21	20,625	10,952	2062,5

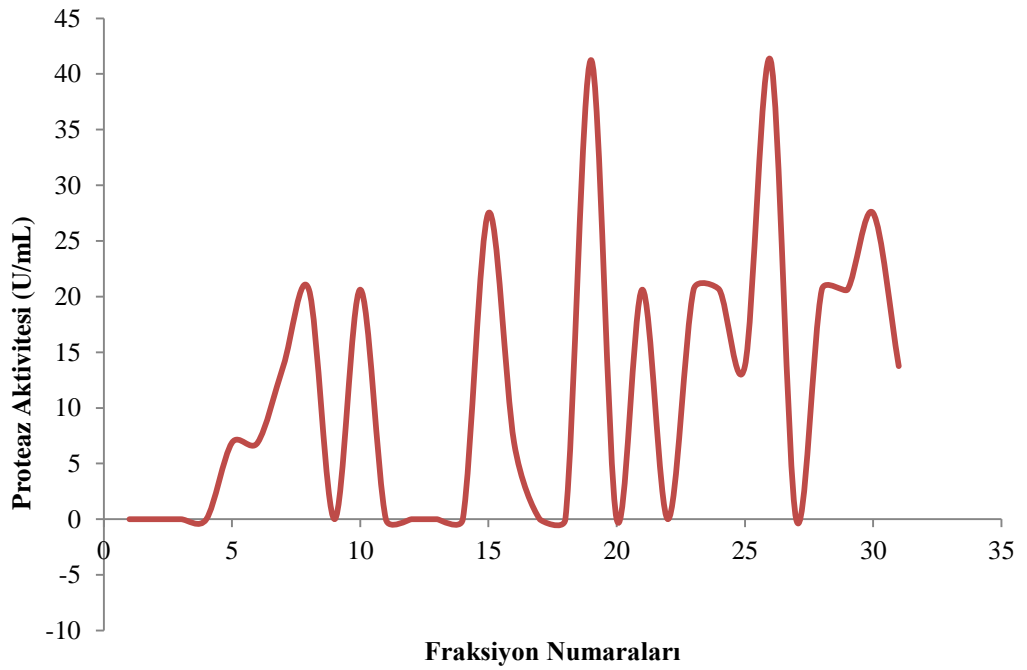
22	0	10	0
23	20,625	18,095	1145,8
24	20,625	38,095	542,76
25	13,75	37,142	371,62
26	<b>41,25</b>	40,476	1031,25
27	0	45,238	0
28	20,625	48,095	429
29	20,625	50,476	412
30	27,5	57,619	482
31	13,75	<b>119,5</b>	115,54

0-9: NaCl içermeyen tampon

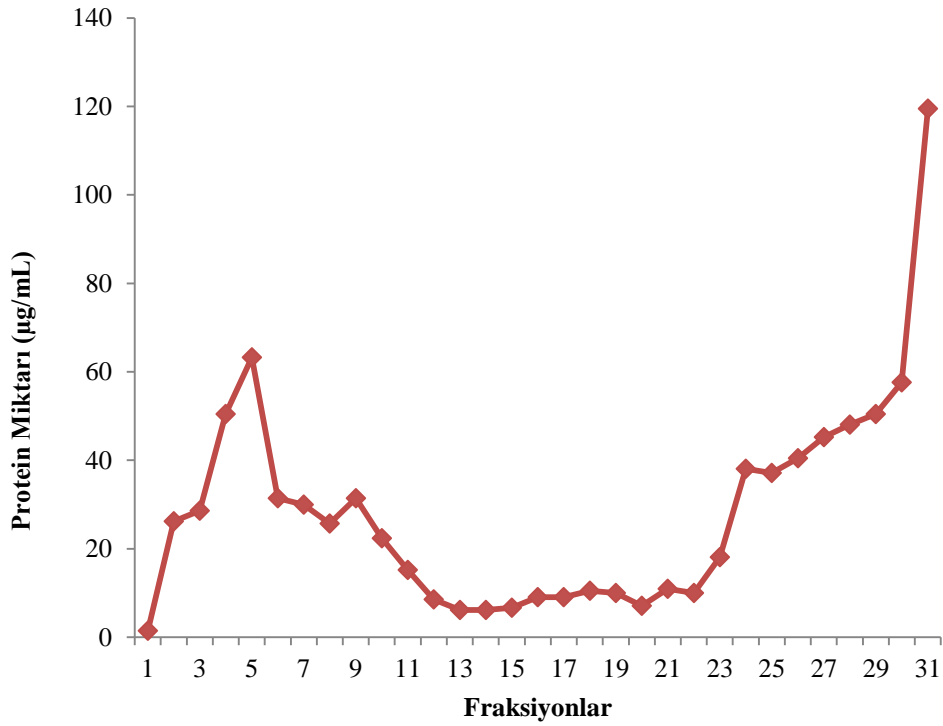
9-16: 10 mM NaCl içeren tampon

16-23: 100 mM NaCl içeren tampon

23-31: 1 M NaCl içeren tampon bulunmaktadır.



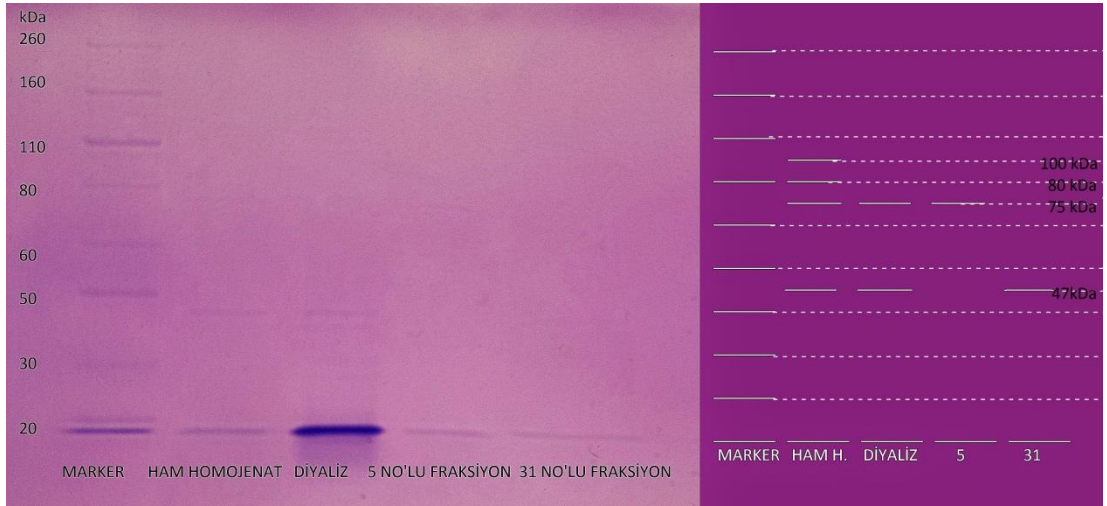
**Şekil 3.66.** DEAE sepharose iyon değiştirici kromatografi sonrası fraksiyonların proteaz aktiviteleri (U/mL)



**Şekil 3.67.** DEAE sepharose iyon değiştirici kromatografi sonrası fraksiyonların protein miktarları (µg/mL)

### 3.6.3. SDS-PAGE

Ham homojenat örneğinin SDS-PAGE analizinde yakşalık 100kDa, 80 kDa, 75kDa ve 47 kDa olmak üzere toplamda 4 bant gözlemlendi (Şekil 3.68). Enzimin giderek saflaşması ile görölen bant sayıları azaldı ve kolon sonrası tek banta düştü. Diyaliz örneğinde yakşalık olarak 75 kDa ve 47 kDa olmak üzere 2 bant gözlemlendi. DEAE Sepharose iyon değişimi kromatografi örneklelerinden 2 fraksiyon seçildi. 5 NO'lu fraksiyon hiç NaCl tamponu içermeyen fraksiyonlardan en yüksek protein miktarına sahip olan fraksiyondur. 5 NO'lu fraksiyon örneğinin yakşalık 75 kDa olduğu göröldü. 31 NO'lu fraksiyon ise en yüksek konsantrasyonda(1 M) NaCl tamponu içeren fraksiyonlardan en yüksek protein miktarına sahip fraksiyondur. 31 NO'lu fraksiyon örneğinin yakşalık 47 kDa olduğu göröldü. PMSF ve EDTA inhibitörleri ile aynı oranda (%40) inhibe olan ham homojenat örneğinden 2 farklı moleküler ağırlığa sahip (yakşalık 75 kDa ve 47 kDa) proteaz enzimi saflaştırıldı.



**Şekil 3.68.**SDS-PAGE analiz sonuçları



#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çalışmada  $10^{-4}$  seyreltilmiş toprak örneğinin yayma ekimi başarılı bir sonuç verdi. Koloni etrafındaki zonlar karışmamış, koloniler saflaştırılmaya uygun birbirinden uzak ve sık oluştu. Koloni etrafındaki zonların büyüklüklerine göre 6 farklı koloni seçildi ve izolatlar RFLK01, RFLK03, RFLK06, RFLK07, RFLK08 ve RFLK12 olarak kodlandı.

İzolatların makroskopik özellikleri incelendiğinde; RFLK01, RFLK03, RFLK06, RFLK08 ve RFLK12'nin birbirlerine benzer koloni morfolojileri oluşturduğu gözlemlendi. Kenarları girintili ve yüzeyi pürüzlü, R tipi formunda koloni yapıları saptandı. RFLK07 kodlu izolatın ise kolonileri yuvarlak, pürüzsüz ve homojen, S tipi formunda koloni yapısı gözlemlendi. RFLK01, RFLK03, RFLK06, RFLK08 ve RFLK12 izolatlarının 16S rRNA analizi ve ARDRA sonuçlarına göre *Bacillus* cinsine ait mikroorganizmalar olarak tanımlanması, izolatların makroskopik özellikleri ile uyumlu olduğunu destekledi. Yu ve ark. (2012) yaptıkları araştırmada basil morfolojisinde olan *B. anthracis*, *B. thuringiensis* ve *B. circulans*'ın aynı koloni morfolojisi gösterdiğini belirtmişlerdir[139]. Cihan ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada izole ettikleri *Bacillus* sp. türlerinin sarı renkli koloniler meydana getirdiğini belirtmiştir[140]. RFLK07 kodlu izolatın *Aeromonas salmonicida* olarak tanımlanması, makroskopik özellikleri ile uyumlu olduğunu gösterdi.

İzolatların mikroskopik özellikleri incelendiğinde; tüm izolatların gram boyama sonucu, RFLK07 kodlu izolat hariç, gram (+) olduğu saptandı. Tüm izolatların basil morfolojisinde olduğu gözlemlendi. Tüm izolatlarda spor boyama sonucu, RFLK07 kodlu izolat hariç, sporlanma saptandı. Sporlanma yetenekleri besiyeri içeriğine göre değişmekte olup, enzim üretimi besiyerinde 24. saatten sonra oluşmaya başladığı görüldü. RFLK01, RFLK03, RFLK06, RFLK08 ve RFLK12 izolatlarının 16S rRNA analizi ve ARDRA sonuçlarına göre *Bacillus* cinsine ait mikroorganizmalar olarak tanımlanması, izolatların mikroskopik özellikleri ile uyumlu olduğunu destekledi. Daffonchio ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada *Bacillus* türlerinin spor yapma yeteneklerinin olduğunu ve bu yeteneklerinden dolayı çevresel etkilere karşı çok

dirençli olduklarını belirtmiştir[141].Gosh ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada *Bacillus sp.* olarak tanımladıkları izolatların terminal/subterminal konumlarında spor yapıları olduğunu, sporların oval/elipsoidal şekle sahip olduğunu belirtmiştir[142].RFLK07 kodlu izolatın *Aeromonas salmonicida* olarak tanımlanması, mikroskobik özellikleri ile uyumlu olduğunu gösterdi.

İzolatların fizyolojik özellikleri incelendiğinde; RFLK01 kodlu izolat 17°C’de hiçbir pH koşulunda üremedi, 50°C’de pH 7.0’de üredi. Optimal üreme sıcaklığı ve pH koşulu ise 37°C’ ve pH 7.0 olarak saptandı (Şekil 3.4.). Mezofilik özellik gösterdiği saptandı. RFLK03 kodlu izolat 17°C’de pH 7.0 ve pH 9.0 da üredi, 50°C’de hiçbir pH koşulunda üremedi. Optimal üreme sıcaklığı ve pH koşulu ise 37°C’ ve pH 7.0 olarak saptandı (Şekil 3.5.). Mezofilik özellik gösterdiği saptandı. RFLK06 kodlu izolat 17°C’de hiçbir pH koşulunda üremedi, 50°C’de pH 7.0’de üredi. Optimal üreme sıcaklığı ve pH koşulu ise 37°C’ ve pH 7.0 olarak saptandı (Şekil 3.6.). Mezofilik özellik gösterdiği saptandı. RFLK07 kodlu izolat 17°C’de pH 7.0 ve pH 9.0 da, 50°C’de pH 7.0’de üredi. Optimal üreme sıcaklığı pH koşulu ise 37°C’ ve pH 5.0 olarak saptandı (Şekil 3.7.). Mezofilik özellik gösterdiği saptandı. RFLK08 kodlu izolat 17°C’de pH 7.0 ve pH 9.0 da üredi, 50°C’de hiçbir pH koşulunda üremedi. Optimal üreme sıcaklığı ve pH koşulu ise 37°C’ ve pH 7.0 olarak saptandı (Şekil 3.8). Mezofilik özellik gösterdiği saptandı. RFLK12 kodlu izolat ise 17°C’de pH 5.0 ve 50°C’de ise pH 7.0 ve pH9.0’da üredi. Optimal üreme sıcaklığı ve pH koşulu ise 27°C ve pH5.0 olarak saptandı (Şekil 3.9). Mezofilik özellik gösterdiği saptandı. Gosh ve ark (2002) yaptıkları çalışmada *Bacillus* olarak tanımladıkları izolatların gelişmesi için en uygun sıcaklık ve pH’ın sırasıyla 35-37 °C, ve pH 6.8-7.5 olduğunu belirtmiştir[142]. Wu ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada mezofilik, optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla pH 7.0 ve 25-45 °C olan *Bacillus türlerinin* ARDRA analizini araştırmışlardır [143].

Sonuç olarak; RFLK01 ve RFLK06 izolatlarının, RFLK03 ile RFLK08 izolatlarının benzer fizyolojik özellikler gösterdiği, RFLK07 ve RFLK12 izolatlarının ise diğerlerinden farklı fizyolojik özellikler gösterdiği görüldü. RFLK01 ve RFLK06 izolatlarının 16S rRNA analizi ve ARDRA sonuçlarına göre;*Bacillus mojavensis* türüne ait mikroorganizmalar olarak tanımlanması, izolatların fizyolojik özellikleri

ile uyumlu olduğunu destekledi. RFLK03 ve RFLK08 izolatlarının 16S rRNA analizi ve ARDRA sonuçlarına göre; aynı grupta yer alan, birbirleriyle yüksek homoloji gösteren *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus anthracis* türüne ait mikroorganizmalar olarak tanımlanması, izolatların fizyolojik özellikleri ile uyumlu olduğunu destekledi[139].RFLK12 izolatının 16S rRNA analizi ve ARDRA sonuçlarına göre diğer Bacillus gruplarından ayrılan, *Bacillus stratosphericus* olarak tanımlanması fizyolojik özelliklerinin uyumlu olduğunu gösterdi. RFLK07 izolatının *Aeromonas salmonicida* olarak tanımlanması, fizyolojik özellikleri ile uyumlu olduğunu gösterdi. İzolatların biyokimyasal özellikleri incelendiğinde; RFLK01, RFLK03, RFLK06, RFLK8 ve RFLK12'nin indol, voges proskauer, sitrat, katalaz ve jelatin hidroliz testi aynı sonucu verdi. Metil Red testinde RFLK03 kodlu izolat diğerleri negatif iken, pozitif sonuç verdi. Yu ver ark. (2012) yaptıkları çalışmada *B. thuringiensis* ve *B. anthracis*'in aynı biyokimyasal sonuçları verdiğini belirtmişlerdir[139].Daffonchio ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada *Bacillus cereus* grubunun dört türü (*Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* ve *Bacillus thuringiensis*) kapsadığını ve bu türlerin aynı biyokimyasal sonuçları verdiğini belirtmiştir[141]. Gosh ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada Bacillus sp. olarak tanımladıkları izolatların ortak olarak sitrat testi, katalaz testi, jelatin hidrolizasyon testi ve kazein hidrolizasyon testlerinin pozitif sonuç verdiğini belirtmiştir[142].

Nişasta hidroliz testinde RFLK01, RFLK03 ve RFLK06 pozitif iken diğerleri negatif sonuç verdi. RFLK07 kodlu izolat ise çoğunlukla diğer izolatlara zıt sonuçlar gösterdi.

6 izolatın, 16S rRNA gen dizilerinin çoğaltılması için universal 27F forward ve 1492R reverse primeri kullanılarak yapılan PZR reaksiyonları sonucunda, yaklaşık 1500 bp'lik 16S ribozomal RNA gen bölgesinin çoğaltıldı [139, 140, 144].

PZR Optimizasyonu çalışmasında; RFLK01, RFLK0 6, RFLK0 7, RFLK 12 kodlu izolatların optimum bağlanma sıcaklıkları 54 °C, RFLK03 kodlu izolat 50 °C, RFLK12 kodlu izolat 52 °C olarak belirlenmiştir. MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları ise RFLK12 (1.67 mM ) hariç, 1.33 mM bulundu.

İzolatların 16S rRNA gen sekans analizi ve filogenetik sekans analizine göre RFLK01 izolatı *Bacillus mojavensis* olarak tanımlandı. Uzaklık matrisine göre en

küçük tür yakınlık değeri 0.0088'dir. RFLK03 soy ağacına göre en yakın tür olarak *Bacillus thuringiensis* olarak tanımlandı. Uzaklık matrisine göre en küçük tür yakınlık değeri 0.06992'dir. *Bacillus thuringiensis* ile *Bacillus tonoyensis* ile aynı değere sahip olduğu görüldü. RFLK06 soy ağacına göre en yakın tür olarak *Bacillus mojavensis* olarak tanımlandı. Uzaklık matrisine göre en küçük tür yakınlık değeri 0.00804'tür. RFLK07 soy ağacına göre en yakın tür olarak *Aeromonas salmonicida* olarak tanımlandı. Uzaklık matrisine göre en küçük tür yakınlık değeri 0.02076'dır. RFLK08 soy ağacına göre en yakın tür olarak *Bacillus anthracis* olarak tanımlandı. Uzaklık matrisine göre en küçük tür yakınlık değeri 0.00885'tir. RFLK12 soy ağacına göre en yakın tür olarak *Bacillus stratosphericus* olarak tanımlandı. Uzaklık matrisine göre en küçük tür yakınlık değeri 0.0624'tür. *Bacillus stratosphericus*'un *Bacillus aerius* ve *Bacillus altitudinis* ile aynı değere sahip olduğu görüldü. 16S rRNA gen sekans analizi sonucu *Bacillus* cinsine ait bakterilerin bir heterojeniteye sahip olduğu gözlemlendi ve 16S rRNA analizinin tam tür teşhisi için yeterli olmadığı görüldü. Daffonchio ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada *Bacillus cereus* grubunun dört türünün (*Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycooides* ve *Bacillus thuringiensis*) 16S ve 23S rRNA analizi ile ayırt edilemediğini belirtmişlerdir [141]. Andersen ve ark. (1996) (ORF) (*vrrA*) adlı bir çift primer geliştirerek *B. anthracis* suşlarını *B. cereus* ve *B. mycooides*'ten ayırt edebildiğini belirtmiştir [145]. Pobell ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada *B. cereus* ve *B. thuringiensis*'in 16S rRNA yapılarının hemen hemen aynı olduğu için ayırt edilemediklerini belirtmiştir [146]. Wu ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada *B. subtilis* kümesi (*B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* and *B. atrophaeus*) ve *B. cereus* kümesinin (*B. cereus*, *B. thuringiensis* and *B. anthracis*) 16S rRNA sekans analizlerine göre farklılık gösterdiğini belirtmiştir [143]. Henderson ve ark. (1994) DNA homoloji çalışmaları sonucunda *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus mycooides*'in birbirleri ile neredeyse aynı olduğunu, bu türlerin aynı G + C içeriği (% 31 ila % 34 mol)ne sahip olduğu ve ribozomal DNA sekans verilerinde sadece minör farklılıklar olduğunu belirtmiştir [147]. Cihan ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada 16S rRNA analizi sonucu tanımladıkları *B. smithii* türlerinin %96.7-%99.6; *B. pumilus* türlerinin %96.7-%99.7; *B. subtilis* türlerinin %94.2-100; *B. licheniformis* türlerinin % 95-99.5 oranında benzerlik gösterdiğini bulmuşlardır [140]. Veith ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada *B. licheniformis* / *B. subtilis* / *B. halodurans* grubunun, *B.*

*cereus* / *B. anthracis* grubundan oldukça farklı olduğunu belirtmiştir. *B. subtilis* grubunun kromozom büyüklüğünün yaklaşık 4 milyon baz çiftinden oluştuğunu, yaklaşık 4.000 genden meydana geldiğini, yaklaşık %44 G+C içeriğine sahip olduğunu, yaklaşık 9 tRNA operonu içerdiğini ve yaklaşık 80 tRNA geni bulunduğunu belirtmiştir. *B. cereus* grubunun ise kromozom büyüklüğünün yaklaşık 5 milyon baz çiftinden oluştuğunu, yaklaşık 5.000 genden meydana geldiğini, yaklaşık %34 G+C içeriğine sahip olduğunu, yaklaşık 11 tRNA operon içerdiğini ve yaklaşık 96 tRNA geni bulunduğunu belirtmiştir[148].

ARDRA(Amplifiye edilmiş Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi)'da tüm izolatların bant profilleri sonucu 16S rRNA gen sekans analizi sonucunu desteklediği görüldü. 16S rRNA gen bölgesi sekans analizine göre *Bacillus mojavensis* olarak tanımlanan RFLK01 ve RFLK06 kodlu izolatlar tüm enzim kesim reaksiyonlarında aynı bant profilini verdi. *Bacillus cereus* grubu üyelerinden olmayan *Bacillus mojavensis* (RFLK01 ve RFLK06), *Bacillus cereus* grubu üyelerinden (*Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*) olan türlerle tüm enzim gruplarında farklı bant profilleri verdiği için ARDRA'da başarılı bir ayırım sağlandı. Referans suşlar olarak kullanılan homolojileri yüksek *Bacillus cereus* ATCC 10876ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşları arasında 3 enzimde de aynı bant profili gözlemlendiği için başarılı bir ayırım sağlanamadı. 16S rRNA gen sekansları birbirlerine çok benzeyen *Bacillus cereus* (referans suş) *Bacillus thuringiensis*(RFLK03), ve *Bacillus anthracis* (RFLK08) arasında aynı bant profillerini verdiği için başarılı bir ayırım yapılamadı. Diğer *Bacillus* türleriyle homolojisi düşük olan *Bacillus stratosphericus* (RFLK12) *AluI* ve *TaqI* enzim kesim reaksiyonlarında farklı bant profilleri oluşturarak başarılı bir ayırım sağlandı.

Sonuç olarak; evrimsel olarak oldukça korunmuş 16S rRNA geninin temel alınmasıyla yapılan ARDRA analizinde; birbirlerine oldukça benzeyen türler arasında (*Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus anthracis*) arasında ayırım yapılamadı. Ancak birbirlerinden farklı gruplarda yer alan *Bacillus mojavensis*, *Bacillus thuringiensis*-*Bacillus anthracis* ve *Bacillus stratosphericus* türleri arasında başarılı bir ayırım sağlandı. Özellikle *AluI* restriksiyon enziminin 16S rRNA dizi analizi

sonuçlarını desteklediği ve izolatları cins, tür ve alt tür seviyesinde başarılı bir şekilde ayırdığı görüldü.

Swings ve ark.(1995) ARDRA analizinin ribozomal genlerde korunmuş veya değişken bölgelerin seçimine bağlı olarak, farklı taksonomik seviyelerde bakteri soylarının sınıflandırılması için yararlı olduğunu bildirmişlerdir[149].

Caccamo ve ark.(2001) ARDRA analizinde AluI restriksiyon endonükleaz enziminin, HaeIII ve CfoI enzimlerine göre Geobacillus cinsi bakterileri ayırmak için için en sık kullanılan ve en fazla sayıda ayırıcı bant üreten enzim olduğunu belirtmişlerdir[136, 150-152].

Wu ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada AluI ve TaqI restriksiyon enzimleri ile çoğu Bacillus türünün birbirlerinden ayrılabilmediğini ancak yöntemin bazı sınırlamaları olduğunu belirtmiştir. *B. subtilis* kümesinin (*B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. atrophaeus*) üç üyesi ile *B. cereus* kümesindeki üç türün üyesi (*B. cereus*, *B. thuringiensis* ve *B. anthracis*). arasında ayırım yapamadığını bildirmişlerdir[143].

Kuisiene ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada Bacillus türlerinin ARDRA analizi için kullanılan AluI, CfoI, HaeIII, HinfI, MseI, RsaI ve TaqI restriksiyon enzimlerinden AluI ve HaeIII'ün en fazla sayıda ayırıcı bant oluşturduğu bildirilmiştir[153].

Cihan ve ark. (2012) Bacillus izolatlarının ARDRA analizi ile ayrılmasında; AluI enziminin, HaeIII ve TaqI restriksiyon enzimlerine göre daha uyumlu olduğu ve genetik çeşitliliğinin ortaya koyulmasında daha başarılı olduğunu ifade etmişlerdir. *B. cereus* ve *B. anthracis* gruplarını oluşturan izolatların tamamının 16S rRNA geni dizi benzerliğinden dolayı, AluI enzimi ile ribotiplendirmede birbirlerinden ayrılamadığını belirtmişlerdir [140].

İzolatlardan elde edilen proteaz enzimlerinin aktivitesi kalitatif ve kantitatif olarak hesaplandı. Her iki hesaplamada sonuçların birbirleri ile uyumlu olduğu görüldü. İlk 24 saat proteaz üretimi düşük seviyede iken giderek artmaya başladığı, 72.saatte optimum değere ulaştığı görüldü. Skimmilk agar besiyerindeki zonlar 30. saatten sonra oluşmaya başladı, mm cinsinden en büyük zon ise 72. saatte meydana geldi.

RFLK01(*Bacillus mojavensis*)'ten elde edilen proteaz enzimi optimum 27°C ve pH 9.0'da, RFLK03(*Bacillus thuringiensis*) 'ten elde edilen proteaz enzimi optimum 27°C ve pH 7.0'da, RFLK06(*Bacillus mojavensis*)'ten 'ten elde edilen proteaz

enzimi optimum 27°C ve pH 7.0'da, RFLK07(*Aeromonas salmonicida*)'den elde edilen proteaz enzimi optimum 27°C ve pH 9.0'da, RFLK08(*Bacillus anthracis*) 'ten elde edilen proteaz enzimi optimum 27°C ve pH 9.0'da, RFLK12 (*Bacillus stratosphericus*) 'den elde edilen proteaz enzimi optimum 37°C ve pH 7.0'da aktivite gösterdiği bulundu. Denizci ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada *Bacillus clausii* GMBAE 42'den serin proteaz üretmişlerdir. En iyi proteaz üretiminin 3. günde gerçekleştiğini optimum pH 10.5 ve 37°C üretildiğini tespit etmişlerdir[154]. Arulmani ve ark.(2007) yaptıkları çalışmada *Bacillus laterosporus*-AK1'den serin proteaz elde etmişlerdir. Enzim üretiminin optimum 48. saatin sonunda, pH 9.0 ve 37°C gerçekleştiğini bulmuşlardır[155]. Li ve ark. (2016) *Cellulomonas bogoriensis*'den alkali proteaz elde etmişlerdir. Optimum proteaz üretimi 5. günün sonunda ve 30°Cgerçekleşmiştir[22]. Pant ve ark.(2015) *Bacillus subtilis*'ten proteaz elde etmişlerdir. Optimum fermentasyon ortamı 36 saat, pH 10.0 ve 45°C olarak bulunmuştur[156].

İzolatların arasından en yüksek RFLK07(*Aeromonas salmonicida*) proteaz aktivitesine sahipken ikinci sırada RFLK03(*Bacillus thuringiensis*) en düşük ise RFLK08(*Bacillus anthracis*)'te görüldü.Ancak RFLK07 izolatu *Aeromonas salmonicida* olarak tanımlandığı için patojenitesinden dolayı endüstriyel üretime uygun olmadığı düşünüldü. RFLK07 haricinde proteaz aktivitesi en yüksek olan RFLK03 kodlu izolatu hem patojen olmaması hem de ürettiği optimum proteaz enziminin oda sıcaklığı ve nötral pH koşulları gibi biyoteknolojik uygulanabilirliğe uygun olması sebebi ile bundan sonraki çalışmalara (enzimin özelliklerinin belirlenmesi ve enzimin kısmi saflaştırılması) bu izolat üzerinden devam edildi.

RFLK03(*Bacillus thuringiensis*)'ten elde edilen proteaz üretimi optimum %1 inokulum ile gerçekleşti. %5 inokulum ile üretimde düşüş yaşanırken, %10 ile yeniden artış gösterdiği, %20 inokulumda ise yeniden düştüğü gözlemlendi. Bu durumun rekabetten kaynaklanabileceği yorumlandı. %1 inokulum ile maksimum proteaz üretiminin gerçekleşmesi, verim açısından, biyoteknolojiye uygun olabileceği düşünüldü.

Enzim üretimi besiyerinin optimizasyonu çalışmasında inorganik bileşenlerin konsantrasyonlarının giderek artması ile proteaz üretimi arasında doğrusal bir ilişki gözlenmedi. Organik bileşenlerden ise pepton, maya özütü ve kazeinin konsantrasyonlarının arttıkça proteaz üretiminin arttığı saptandı. Peptonun konsantrasyonunun 5 kat artması proteaz üretiminin %106 (2 kattan daha fazla) arttırdığı, maya özütünün konsantrasyonunun 5 kat artması proteaz üretiminin %51 arttırdığı, kazeinin ise konsantrasyonunun 2 kat artması proteaz üretimini %23 arttırdığı saptandı. Sonuçlara göre; proteaz üretiminde amonyumlu bileşenlerin önemli bir rol aldığı yorumlandı.

Tek azot kaynağı bulunan modifiye enzim üretim besiyeri çalışmasında; besiyerine eklenen tek azot kaynaklarının konsantrasyonlarının arttıkça proteaz üretiminin arttığı gözlemlendi. Et özütünün 12 g/L konsantrasyonlarında enzim üretim besiyerine göre %25 daha fazla proteaz üretildiği, kazeinin 12 g/L konsantrasyonlarında enzim üretim besiyerine göre %5 daha fazla proteaz üretildiği görüldü. Ürenin ise protez üretiminde inhibe edici olduğu, enzim üretim besiyerine göre proteaz üretimini %81 engellediği görüldü. Daha az bileşen ile aynı verimde proteaz üretiminin biyoteknolojiye uygun olduğu düşünüldü.

Tek karbon kaynağı bulunan modifiye enzim üretim besiyeri çalışmasında; glikoz, nişasta ve sükrozun proteaz üretimini teşvik edici olmadıkları, laktoz, galaktoz ve fruktozun ise proteaz üretimini arttırdıkları gözlemlendi. En yüksek üretim galaktoz varlığında, en düşük üretim nişasta varlığında görüldü. Galaktozun 5g/L konsantrasyonunda enzim üretim besiyerine göre %26 daha fazla proteaz üretildiği, fruktozun 5g/L konsantrasyonunda enzim üretim besiyerine göre %19 daha fazla proteaz üretildiği gözlemlendi. Nişastanın ise protez üretiminde inhibe edici olduğu, enzim üretim besiyerine göre proteaz üretimini %19 engellediği görüldü. Bu durumun mikroorganizmanın proteaz salgılamasında monosakkaritleri tercih ettiği, daha fazla enerji harcaması gerektiği polisakkaritleri hidrolize etme konusunda kaçındığı şeklinde yorumlandı. Ek olarak proteaz üretiminin laktoz ve galaktozda artış göstermesi; izolatin peynir altı suyu gibi biyoteknolojik üretime uygun, maliyetsiz bir besiyerinde gelişebileceğini gösterdi. Nilegaonkar ve ark. (2011) yaptıkları çalışmalarda en yüksek proteaz üretiminin azot kaynaklarından et özütü ve



pepton ile sağlandığını bulmuşlardır.Nilegaonkar ve ark. (2011) yaptıkları çalışmalarda en yüksek proteaz üretiminin karbon kaynaklarından laktoz ile en düşük ise glikoz ile sağlandığını bulmuşlardır[157].Gessesse ve ark. (1997) yaptıkları çalışmada *Microbacterium*'den elde ettikleri proteaz enziminin optimum aktiviteyi glukoz ve sukroz varlığında gösterdiğini bulmuşlardır[130].Pant ve ark.(2015) yaptıkları araştırmada karbon kaynaklarından en yüksek galaktozda en düşük sükrozda proteaz üretiminin gerçekleştiğini bulmuşlardır. Azot kaynaklarından ise en yüksek pepton en düşük amonyum klorid'de proteaz aktivitesinin gözlemlendiğini belirtmişlerdir[156].

Farklı besiyerlerinin aktivitelerinin kıyaslanması çalışmasında, en yüksek proteaz üretimi; optimize edilmiş enzim üretim besiyerinde (97,281 U/mL), en düşük proteaz üretimi; Nutrient Broth besiyerinde (18,906 U/mL) görüldü.

RFLK03(*Bacillus thuringiensis*)'in referans suşlarla proteaz aktivitelerinin kıyaslanması çalışmasında, en yüksek proteaz üretimi RFLK03(*Bacillus thuringiensis*)'de görüldü (50,187 U/mL). *Bacillus cereus* ATCC 10876 (43,312 U/mL), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (40,218 U/mL) bulundu.

Enzim özelliklerinin belirlenmesi çalışmasında; RFLK03(*Bacillus thuringiensis*)'ten üretilen enzimin 17-80°C ve pH 7.0-11.0 arasında aktivitesini koruduğu görüldü. Optimum enzim aktivitesi 70°C ve pH 7.0 olarak bulundu. Nilegaonkar ve ark. (2011) yaptıkları çalışmalarda ürettikleri serin proteazın pH 7.0-9.0 ve 20-50°C arası aktivitesini koruduğu tespit etmişlerdir. Optimum pH ve sıcaklığı ise sırasıyla pH 8.0 ve 35°C bulmuşlardır. Yamagata ve ark. (1995) yaptıkları çalışmalarda elde ettikleri proteaz enziminin en iyi 50°C aktive olduğunu bulmuşlardır. Kumar ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada enzimin pH 8.5-12.5 arasında aktivitesini koruduğunu en iyi aktive olduğu koşulu pH9.5 ve 45°C olarak bulmuşlardır. Denizci ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada proteaz enziminin optimum pH 11.3 ve 60°C'de aktive olduğunu bulmuşlardır.Singh ve ark.(2000) yaptıkları çalışmada proteaz enzimlerinin pH 8.0–11.0 arasında aktivitesini koruduğunu optimum 40°C'de aktive olduğunu belirtmişlerdir.Arulmani ve ark.(2007) yaptıkları çalışmada enzimin optimum pH 9.0 ve 75°C aktive olduğunu bulmuşlardır.Li ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada enzimin optimum aktivitesini pH11.0 ve 60°C olduğunu bulmuşlardır. Huang ve ark. (2003) yaptıkları araştırmada proteaz enzimlerinin optimum aktivitesini pH 10.0 ve

58°C bulmuşlardır.Pant ve ark.(2015) yaptıkları araştırmada proteaz enziminin optimum pH7.0 ve 50°C’de aktive olduğunu belirtmişlerdir.Reddy ve ark. (2008) yaptıkları araştırmada enzimin pH 7.0-9.0 arasında aktivitesini koruduğunu, optimum 60°C aktive olduğunu belirtmişlerdir.

RFLK03(*Bacillus thuringiensis*)’ten üretilen enzimin kobalt ve mangan varlığında aktivitesinin arttığı gözlemlendi. Kobalt( $Co^{+2}$ ) ve manganın( $Mn^{+2}$ ) bağıl aktivitesi(%) sırası ile 114,13 ve 138,49 bulundu. Enzimin bu metal iyonlarıyla aktive olması ile enzimin metalloproteaz sınıfında olabileceği tespit edildi. Nilegaonkar ve ark. (2011) yaptıkları çalışmalarda elde ettikleri proteaz enziminin çinko ve mangan ile aktivitesini düştüğünü tespit etmişlerdir [157]. Denizci ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada proteaz enzimlerinin mangan metal iyonu ile aktive olduğunu bulmuşlardır[154].Singh ve ark.(2000) yaptıkları çalışmada  $Fe^{+3}$ ,  $Ca^{+2}$  ve  $Na^{+1}$  metal iyonlarının proteaz aktivitesini arttırdığını tespit etmişlerdir[128]. Arulmani ve ark. (2007) ürettikleri proteaz enziminin  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  metal iyonlarıyla aktive olduğunu bulmuşlardır [155]. Li ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada enzimin  $Na^{+1}$  ve  $Zn^{+2}$  metal iyonları varlığında aktivitesinin arttığını bulmuşlardır[22]. Huang ve ark. (2003) yaptıkları araştırmada proteaz enzimlerinin  $Ca^{+2}$ ,  $Na^{+1}$ ve  $Mg^{+2}$  metal iyonları varlığında aktiviterin arttığını tespit etmişlerdir [158]. Orhan ve ark. (2005) proteaz enzimlerinin mangan ile aktivitesinin arttığı belirtmişlerdir[159]. Reddy ve ark. (2008) yaptıkları araştırmada proteaz enzimlerinin mangan ve kalsiyum varlığında aktive olduğunu bulmuşlardır [160].

RFLK03(*Bacillus thuringiensis*)’ten üretilen enzimin  $H_2O_2$  varlığında aktivitesinin büyük ölçüde arttığı, SDS varlığında ise azaldığı belirlendi. Bağıl aktiviteri(%) sırası ile188,47(yaklaşık 2 kat artış) ve 42,29 olduğu tespit edildi. Enzimin deterjan endüstrisinde kullanılan  $H_2O_2$  ile aktivitesinin artması ile enzimin deterjan endüstrisinde kullanılabileceği düşünöldü.Li ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada enzimin  $H_2O_2$  varlığında %86 oranında inhibe olduğunu bulmuşlardır[22].Reddy ve ark. (2008) yaptıkları araştırmada proteaz enzimlerinin  $H_2O_2$  ile aktive olduğunu SDS varlığında aktiviterinin düştüğünü belirtmiştir [160].

RFLK03(*Bacillus thuringiensis*)’ten üretilen enzimin araştırılan organik çözücülerin varlığında aktivitesini koruduğu; aseton, hekzan ve benzen varlığında aktivitesinin arttığı belirlendi. Bağlı aktiviteleri(%) sırası ile 102.57, 101.3 ve 173.1(yaklaşık 2 kat artış) bulundu. Reddy ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada proteaz enzimlerinin benzen ve hekzan varlığında aktivitelerinin arttığını belirtmişlerdir[160].

RFLK03 (*Bacillus thuringiensis*)’ten üretilen enzimin EDTA ve PMSF inhibitörleri ile sırasıyla% 40 ve % 34 inhibe olduğu saptandı[27]. Yamagata ve ark. (1995) yaptıkları çalışmalarda proteaz enziminin PMSF ile %97 oranında, EDTA ile %37 inhibe olduğunu bulmuşlardır[161]. Kumar ve ark. (2011) yaptıkları çalışmalarda proteaz enziminin PMSF ile % 13 inhibe olduğunu bulmuşlardır[162]. Singh ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada *Bacillus sp.* SSR1’den serin proteaz üretmişlerdir. proteaz enziminin PMSF ile %86 oranında inhibe olduğunu bulmuşlardır[128]. Li ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada enzimin PMSF ile %85 oranında inhibe olduğunu bulmuşlardır[22]. Huang ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada proteaz enzimlerinin PMSF ile tamamen inhibe olduğunu bulmuşlardır[158]. Reddy ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada proteaz enzimlerinin PMSF ile tamamen inhibe olduğunu bulmuşlardır[160].

RFLK03(*Bacillus thuringiensis*)’ten üretilen enzimin substrat özgüllüğü çalışmasında; enzimin en yüksek kazein ve jelatine karşı, en düşük ovalbumin ve BSA’ya karşı özgüllük gösterdiği bulundu. Araştırılan kazein, jelatin, BSA, ovalbumin ve soya ununun bağlı aktiviteleri(%) sırasıyla; 100, 93.88, 66.31, 54.08 ve 87.74 bulundu. Nilegaonkar ve ark. (2011) yaptıkları çalışmalarda saflaştırdıkları serin proteazın substrat özgüllüğünün en yüksek jelatin ve kazeinde en düşük BSA da olduğunu gözlemlemişlerdir [157]. Yamagata ve ark. (1995) yaptıkları çalışmalarda ürettikleri proteaz enziminin substrat özgüllüğünün en yüksek jelatin de en düşük BSA ve ovalbuminde olduğunu gözlemlemişlerdir[161]. Li ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada enzimin kazein ve hemoglobine karşı yüksek bir substrat spesifitesi gösterdiğini jelatin ve kollajene karşı hiç aktivite göstermediğini bulmuşlardır[22]. Enzimin kısmi saflaştırılması çalışmasında;enzim saflaştırıldıkça proteaz aktivitesinde (U/mL)düşüş, protein miktarında( $\mu\text{g/mL}$ ) artış meydana geldiği; kromatografi sonrası; proteaz aktivitesinin(U/mL) düştüğü, spesifik proteaz

aktivitesinin(U/mg) arttığı saptandı. Ham homojenat, çöktürme sonrası diyaliz örneği, kromatografi sonrası 5NO'lu fraksiyon, kromatografi sonrası 31NO'lu fraksiyonun spesifik aktiviteleri(U/mg) sırasıyla; 436.42, 576.7, 1091.2 ve 1155.4 bulundu. Saflaştırma katsayıları ise sırasıyla 1.0, 1.3, 2,5 ve 2,6 bulundu. Nilegaonkar ve ark. (2011) yaptıkları çalışmalarda proteaz enziminin saflaştıkça spesifik aktivitesini arttırdığını, amonyum sülfat çöktürmesi ve Sephadex G50 iyon değişim kromatografisi ile saflaştırma katsayısının sırasıyla 1.03 ve 1.11 bulmuşlardır[157]. Kumar ve ark. (2011) yaptıkları çalışmalarda proteaz enziminin saflaştıkça spesifik aktivitesini arttırdığını, aseton çöktürmesi ve DEAE sepharose iyon değişim kromatografisi ile saflaştırma katsayısının sırasıyla 2,48 ve 7,03 bulmuşlardır[162]. Denizci ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada proteaz enzimini  $(NH_4)_2SO_4$  çöktürmesi ve DEAE-cellulose kromatografi ile saflaştırmışlardır. Saflaştırma katsayılarını sırasıyla 1.3 ve 16 bulmuşlardır. Enzimin spesifik aktivitesi giderek artmıştır[154]. Singh ve ark.(2000) yaptıkları çalışmada proteaz enzimlerini %80 amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-Sephadex A-50 kromatografi ile saflaştırmışlardır. Saflaştırma katsayıları sırasıyla 4.6 ve 16.55'tur. Spesifik aktiviteleri giderek artmıştır[128]. Arulmani ve ark. (2007) ürettikleri proteaz enzimi aseton çöktürmesi ve DEAE cellulose iyon değiştirici kromatografi ile saflaştırmışlardır. Saflaştırma katsayısını sırasıyla 2.8 ve 11.1 bulmuşlardır. Spesifik aktiviteleri giderek artmıştır[155]. Li ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada enzimin amonyum sülfat çöktürmesi ve CM Sepharose kromatografi ile saflaştırmışlardır. Enzimin saflaştırma katsayısı sırasıyla 1.2 ve 10.8'dir. Spesifik aktivite giderek artmıştır[22]. Huang ve ark. (2003) yaptıkları araştırmada elde ettikleri proteaz enzimi CM-sepharose, DEAE-sepharose ve Hydrophobic interaction kromatografi ile saflaştırmışlardır. Saflaştırma katsayısını sırasıyla 1.39, 4.09 ve 38.65 bulmuşlardır. Spesifik aktivite giderek artmıştır[158]. Reddy ve ark. (2008) yaptıkları araştırmada proteaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE cellulose iyon değişimi kromatografisi ile saflaştırmışlardır. Enzimin saflaştırma katsayısı sırası ile 9.4 ve 18.5 bulmuşlardır. Spesifik aktivite giderek artmıştır [160].

RFLK03(*Bacillus thuringiensis*)'ten üretilen enzimin SDS-PAGE analizinde; ham homojenat örneğinde yaklaşık 100kDa, 80 kDa, 75kDa ve 47 kDa olmak üzere toplamda 4 bant gözlemlendi (Şekil 3.68). Enzimin giderek saflaşması ile görülen bant sayıları azaldı ve kolon sonrası tek banta düştüğü görüldü. Diyaliz örneğinde

yaklaşık olarak 75 kDa ve 47 kDa olmak üzere 2 bant gözlemlendi. DEAE Sepharose iyon değişimi kromatografisi örneklerinden 2 fraksiyon seçildi. 5 NO'lu fraksiyon hiç NaCl tamponu içermeyen fraksiyonlardan en yüksek protein miktarına sahip olan fraksiyon olarak belirlendi. 5 NO'lu fraksiyon örneğinin yaklaşık 75 kDa olduğu görüldü. 31 NO'lu fraksiyon ise en yüksek konsantrasyonda (1 M) NaCl tamponu içeren fraksiyonlardan en yüksek protein miktarına sahip fraksiyon olduğu belirlendi. 31 NO'lu fraksiyon örneğinin yaklaşık 47 kDa olduğu görüldü. Sonuç olarak yaklaşık 75 kDa ve 47 kDa moleküler ağırlığında 2 farklı proteaz enzimi saflaştırıldı. Nilegaonkar ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada saflaştırdıkları serin proteazın moleküler ağırlığını SDS PAGE analizinde 56 kDa olarak bulmuşlardır [157]. Yamagata ve ark. (1995) yaptıkları çalışmada *Bacillus* sp. NKS-21, 'den serin proteaz üretmişlerdir. Enzimin moleküler ağırlığını 36.6 kDa bulmuşlardır [161]. Kumar ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada ürettikleri proteaz enziminin moleküler ağırlığını 28 kDa olarak bulmuşlardır [162]. Denizci ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada proteaz enziminin moleküler ağırlığını SDS-PAGE analizi sonrası 26.50 kDa olarak bulmuşlardır [154]. Singh ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada proteaz enzimlerinin moleküler ağırlığını SDS-PAGE analizinde 29 kDa olarak bulmuşlardır [128]. Arulmani ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada enzimin moleküler ağırlığını SDS PAGE analizinde 86.29 kDa olarak bulmuşlardır [155]. Li ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada enzimin moleküler ağırlığının SDS-PAGE analizinde 18.3 kDa olarak bulmuşlardır [75]. Huang ve ark. (2003) *Bacillus pumilus*'den alkali proteaz üretmişlerdir. Proteaz enziminin moleküler ağırlığını SDS-PAGE'DE 32 kDa bulmuşlardır [158]. Reddy ve ark. (2008) *Bacillus* sp. RKY3'ten serin proteaz elde etmişlerdir. Enzimin moleküler ağırlığını SDS-PAGE de 38 kDa olarak bulmuşlardır [160].

## KAYNAKLAR

1. A. K. Kundu, S.D., S. Manna, and N. Pal, *Extracellular Proteinases Of Aspergillus Oryzae*. American Society For Microbiology. **16**: P. 1799-1801.
2. Morihara, K., *comparative specificity of microbial proteinases*. Advances In Enzymology And Related Areas Of molecular Biology, 1974. **41**: P. 179-239.
3. Gupta, R., Q.K. Beg, And P. Lorenz, *Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches And Industrial Applications*. Appl Microbiol Biotechnol, 2002. **59**(1): P. 15-32.
4. 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.
5. Maccabe, A.P., *Industrial Enzymes Structure, Function And Applications*, J. Polaina, Editor. 2007. P. 161-243.
6. Mala B. RAO, A.M.T., Mohini S. Ghatge, and Vasanti V. Deshpande, *Molecular And Biotechnological Aspects Of Microbial Proteases*. American Society For Microbiology, 1998: P. 597–635.
7. Raghunath T. Mahajan, S.B.B., *Biological Aspects Of Proteolytic Enzymes: A Review*. Journal Of Pharmacy Research, 2010.
8. El-Bendary, M.A., M.E. Moharam, And T.H. Ali, *Purification And Characterization Of Milk Clotting Enzyme Produced By Bacillus sphaericus*. Journal Of Applied Sciences Research, 2007. **3**(8): P. 695-699.
9. Puhan, Z. And D.M. Irvine, *Proteolysis By Proteases Of Bacillus subtilis Used To Make Canadian Cheddar Cheese*. Journal Of Dairy Science, 1973. **56**(3): P. 317-322.
10. Rao, K. And M.L. Narasu, *Alkaline Protease From Bacillus firmus 7728*. African Journal Of Biotechnology, 2007. **6**(21).
11. Rao, K., Y. Prameela Devi, And M. Lakshmi Narasu, *A New Acidic Protease From Bacillus badius*. J. Aqua. Biol, 2007. **22**(1): P. 1-6.
12. El-Safey, E. And U. Abdul-Raouf. *Production, Purification And Characterization Of Protease Enzyme From Bacillus subtilis*. In *International Conferences For Development And The Environment In The Arab World*. 2004. Assiut University.

13. Setyorini, E., Et Al., *Purification And Characterization Of A Halotolerant Intracellular Protease From Bacillus subtilis Strain FP-133*. Journal Of Basic Microbiology, 2006. **46**(4): P. 294-304.
14. 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**(2): P. 353-361.
15. Guangrong, H., Et Al., *Purification And Characterization Of A Protease From Thermophilic Bacillus strain HS08*. African Journal Of Biotechnology, 2006. **5**(24).
16. Saurabh, S., Et Al., *Enhanced Productivity Of Serine Alkaline Protease By Bacillus sp. Using Soybean As Substrate*. Malaysian Journal Of Microbiology, 2007. **3**(1): P. 1-6.
17. Moradian, F., Et Al., *Isolation, Purification And Characterization Of A Surfactants-, Laundry Detergents-And Organic Solvents-Resistant Alkaline Protease From Bacillus sp. HR-08*. Applied Biochemistry And Biotechnology, 2009. **159**(1): P. 33-45.
18. 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.
19. Rao, C.S., Et Al., *Characterization Of Thermo-And Detergent Stable Serine Protease From Isolated Bacillus circulans And Evaluation Of Eco-Friendly Applications*. Process Biochemistry, 2009. **44**(3): P. 262-268.
20. Ferrero, M., Et Al., *Thermostable Alkaline Proteases Of Bacillus licheniformis MIR 29: Isolation, Production And Characterization*. Applied Microbiology And Biotechnology, 1996. **45**(3): P. 327-332.
21. El Hadj-Ali, N., Et Al., *Biochemical And Molecular Characterization Of A Detergent Stable Alkaline Serine-Protease From A Newly Isolated Bacillus licheniformis NHI*. Enzyme And Microbial Technology, 2007. **40**(4): P. 515-523.

22. Li, S., Et Al., *A Novel Organic Solvent-Stable Alkaline Protease From Organic Solvent-Tolerant Bacillus licheniformis YPIA*. *Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009. **56**(2): P. 85-88.
23. Olajuyigbe, F.M. And J.O. Ajele, *Some Properties Of Extracellular Protease From Bacillus licheniformis LBBL-11 Isolated From Iru, A Traditionally Fermented African Locust Bean Condiment*. *African Journal Of Biochemistry Research*, 2008. **2**(10): P. 206-210.
24. Kumar, C., *Purification And Characterization Of A Thermostable Alkaline Protease From Alkalophilic Bacillus pumilus*. *Letters In Applied Microbiology*, 2002. **34**(1): P. 13-17.
25. Jaouadi, B., Et Al., *Biochemical And Molecular Characterization Of A Detergent-Stable Serine Alkaline Protease From Bacillus pumilus CBS With High Catalytic Efficiency*. *Biochimie*, 2008. **90**(9): P. 1291-1305.
26. Banik, R. And M. Prakash, *Purification And Characterization Of Laundry Detergent Compatible Alkaline Protease From Bacillus cereus*. 2006.
27. 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.
28. Haddar, A., Et Al., *A Novel Surfactant-Stable Alkaline Serine-Protease From A Newly Isolated Bacillus mojavensis A21. Purification And Characterization*. *Process Biochemistry*, 2009. **44**(1): P. 29-35.
29. Najafi, M.F., D. Deobagkar, And D. Deobagkar, *Potential Application Of Protease Isolated From Pseudomonas aeruginosa PD100*. *Electronic Journal Of Biotechnology*, 2005. **8**(2): P. 79-85.
30. Dutta, J.R. And R. Banerjee, *Isolation And Characterization Of A Newly Isolated Pseudomonas Mutant For Protease Production*. *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, 2006. **49**(1): P. 37-47.
31. Patil, U. And A. Chaudhari, *Purification And Characterization Of Solvent-Tolerant, Thermostable, Alkaline Metalloprotease From Alkalophilic Pseudomonas aeruginosa MTCC 7926*. *Journal Of Chemical Technology And Biotechnology*, 2009. **84**(9): P. 1255-1262.



32. Tang, X., Et Al., *Screening And Isolation Of An Organic Solvent-Tolerant Bacterium For High-Yield Production Of Organic Solvent-Stable Protease*. *Bioresource Technology*, 2008. **99**(15): P. 7388-7392.
33. Petit, F. And J. Guespin-Michel, *Production Of An Extracellular Milk-Clotting Activity During Development In Myxococcus xanthus*. *Journal Of Bacteriology*, 1992. **174**(15): P. 5136-5140.
34. Vishalakshi, N., Et Al., *Production Of Alkaline Protease From Streptomyces gulbargensis And Its Application In Removal Of Blood Stains*. 2009.
35. SATO, S., Et Al., *Purification And Characterization Of An Extracellular Proteinase Having Milk-Clotting Activity From Enterococcus faecalis TUA2495L*. *Food Science And Technology Research*, 2004. **10**(1): P. 44-50.
36. Shumi, W., M.T. Hossain, And M. Anwar, *Production Of Protease From Listeria monocytogenes*. *Int J Agric Biol*, 2004. **6**: P. 1097-1100.
37. HOGUEIRA, E., U. BESHAY, And A. MOREIRA, *Characteristics Of Alkaline Protease Enzyme Produced By Teredinobacter turnirae And Its Potential Applications As A Detergent Additive*. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 2006. **102**(5): P. 205-210.
38. Stennicke, H.R., K. Breddam, And J.J. Birktoft, *Characterization Of The SI Binding Site Of The Glutamic Acid-Specific Protease From Streptomyces griseus*. *Protein Science*, 1996. **5**(11): P. 2266-2275.
39. Tanaka, T., H. Matsuzawa, And T. Ohta, *Stability Of Thermostable Enzyme, Aqualysin I; A Subtilisin-Type Serine Protease From Thermus aquaticus YT-1*. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry*, 1998. **62**(9): P. 1806-1808.
40. Farías, M.E. And M.C. Manca De Nadra, *Purification And Partial Characterization Of Oenococcus Oeni Exoprotease*. *FEMS Microbiology Letters*, 2000. **185**(2): P. 263-266.
41. Brandelli, A. And A. Riffel, *Production Of An Extracellular Keratinase From Chryseobacterium sp. Growing On Raw Feathers*. *Electronic Journal Of Biotechnology*, 2005. **8**(1): P. 35-42.
42. Thys, R. And A. Brandelli, *Purification And Properties Of A Keratinolytic Metalloprotease From Microbacterium sp.* *Journal Of Applied Microbiology*, 2006. **101**(6): P. 1259-1268.

43. Dos Santos, A.L., *Protease Expression By Microorganisms And Its Relevance To Crucial Physiological/Pathological Events*. World J Biol Chem, 2011. **2**(3): P. 48-58.
44. N. Jisha, V., Et Al., *Versatility Of Microbial Proteases*. Advances In Enzyme Research, 2013. **01**(03): P. 39-51.
45. Felix, F. And N. Brouillet, [*Purification And Properties Of 2 Peptidases From Baker's Yeast*]. Biochim Biophys Acta, 1966. **122**(1): P. 127-44.
46. Stoll, E., H.G. Weder, And H. Zuber, *Amino-peptidase II From Bacillus stearothermophilus*. Biochim Biophys Acta, 1976. **438**(1): P. 213-20.
47. Labbe, J.P., Et Al., [*Extracellular Leucine Aminopeptidases (EC 3.4.1.1) Of Aspergillus oryzae (IP 410). Glycoprotein Nature Of The Fraction Leucine Aminopeptidase I*]. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D, 1974. **279**(26): P. 2139-42.
48. Turk, B., *Targeting Proteases: Successes, Failures And Future Prospects*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(9): P. 785-99.
49. Kataoka, Y., Et Al., *Catalytic Residues And Substrate Specificity Of Scytilidoglutamic Peptidase, The First Member Of The Eqolisin In Family (G1) Of Peptidases*. FEBS Lett, 2005. **579**(14): P. 2991-4.
50. Boguslawski, G., J.L. Shultz, And C.O. Yehle, *Purification And Characterization Of An Extracellular Protease From Flavobacterium Arborescen*. Analytical Biochemistry, 1983. **132**(1): P. 41-49.
51. Jacobs, M., Et Al., *Cloning, Sequencing And Expression Of Subtilisin Carlsberg From Bacillus licheniformis*. Nucleic Acids Research, 1985. **13**(24): P. 8913-8926.
52. Kato, T., Et Al., *Purification Of A New Extracellular 90-Kda Serine Proteinase With Isoelectric Point Of 3.9 From Bacillus subtilis (Natto) And Elucidation Of Its Distinct Mode Of Action*. Biosci Biotechnol Biochem, 1992. **56**(7): P. 1166-8.
53. Leunissen<sup>2</sup>, R.J.S.A.J.A.M., *Subtilases: The Superfamily Of Subtilisin-Like Serine Proteases*. Protein Science (1997), 6301-523. Cambridge University, 1997: P. 501-523.
54. Barrett, A.J., *Proteolytic Enzymes: Serine And Cysteine Peptidases*. 1994: Academic Press.

55. Kageyama, T., *Pepsinogens, Progastricsins, And Prochymosins: Structure, Function, Evolution, And Development*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(2): P. 288-306.
56. Fitzgerald, P., Et Al., *Crystallographic Analysis Of A Complex Between Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease And Acetyl-Pepstatin At 2.0-A Resolution*. Journal Of Biological Chemistry, 1990. **265**(24): P. 14209-14219.
57. Kunitz, M., *Formation Of Trypsin From Trypsinogen By An Enzyme Produced By A Mold Of The Genus Penicillium*. The Journal Of General Physiology, 1938. **21**(5): P. 601-620.
58. Morihara, K. And T. Oka, *Comparative Specificity Of Microbial Acid Proteinases For Synthetic Peptides. III. Relationship With Their Trypsinogen Activating Ability*. Archives Of Biochemistry And Biophysics, 1973. **157**(2): P. 561-572.
59. Tang, J., *Evolution In The Structure And Function Of Carboxyl Proteases*. Molecular And Cellular Biochemistry, 1979. **26**(2): P. 93-109.
60. Ostermann, N., Et Al., *Crystal Structure Of An Activation Intermediate Of Cathepsin E*. J Mol Biol, 2004. **342**(3): P. 889-99.
61. Foltmann, B., *Chymosin: A Short Review On Foetal And Neonatal Gastric Proteases*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1992. **210**: P. 65-79.
62. Dervişoğlu, M.O.A., Yazıcı, F., "Peynir Yapımında Kullanılan Pıhtılaştırıcı Enzimler Ve Kazein Fraksiyonları Üzerine Etkileri." 2007.
63. Yang, J., A. Teplyakov, And J.W. Quail, *Crystal Structure Of The Aspartic Proteinase From *Rhizomucor miehei* At 2.15 Å Resolution*. J Mol Biol, 1997. **268**(2): P. 449-59.
64. Barrett, A., *Methods In Enzymology. Proteolytic Enzymes: Aspartic And Metallo Peptidases, Vol. 248*. 1995, Academic Press.
65. Okada, Y., H. Nagase, And E. Harris, *A Metalloproteinase From Human Rheumatoid Synovial Fibroblasts That Digests Connective Tissue Matrix Components. Purification And Characterization*. Journal Of Biological Chemistry, 1986. **261**(30): P. 14245-14255.

66. Shannon, J.D., Et Al., *Amino Acid Sequence Of A Crotalus Atrox Venom Metalloproteinase Which Cleaves Type IV Collagen And Gelatin*. Journal Of Biological Chemistry, 1989. **264**(20): P. 11575-11583.
67. Gripon, J., B. Auberger, And J. Lenoir, *Metalloproteases From Penicillium Caseicolum And P. Roqueforti: Comparison Of Specificity And Cemical Characterization*. International Journal Of Biochemistry, 1980. **12**(3): P. 451-455.
68. Ası, T., *Tablolarla Biyokimya Cilt II*. Ankara [Http://Veterinary](http://Veterinary). Ankara. Edu. Tr/Fidanci, 1999.
69. Chung, C.H. And A.L. Goldberg, *The Product Of The Lon (Capr) Gene İn Escherichia Coli İs The ATP-Dependent Protease, Protease La*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(8): P. 4931-5.
70. Hershko, A., Et Al., *ATP-Dependent Degradation Of Ubiquitin-Protein Conjugates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(6): P. 1619-23.
71. Dancer, B.N. And J. Mandelstam, *Production And Possible Function Of Serine Protease During Sporulation Of Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 1975. **121**(2): P. 406-10.
72. Esposito, M.S. And R.E. Esposito, *Mutants Of Meiosis And Ascospore Formation*. Methods Cell Biol, 1975. **11**: P. 303-26.
73. Phadatare, S.U., M.C. Srinivasan, And V.V. Deshpande, *Evidence For Controlled Autoproteolysis Of Alkaline Protease. A Mechanism For Physiological Regulation Of Conidial Discharge İn Conidiobolus coronatus*. Eur J Biochem, 1992. **205**(2): P. 679-86.
74. Postemsky, C.J., S.S. Dignam, And P. Setlow, *Isolation And Characterization Of Bacillus Megaterium Mutants Containing Decreased Levels Of Spore Protease*. J Bacteriol, 1978. **135**(3): P. 841-50.
75. Jackson, D.P., A.H. Chan, And D.A. Cotter, *Utilization Of Trehalose During Dictyostelium Discoideum Spore Germination*. Dev Biol, 1982. **90**(2): P. 369-74.
76. O'Day, D.H., *Acid Protease Activity During Germination Of Microcysts Of The Cellular Slime Mold Polysphondylium pallidum*. J Bacteriol, 1976. **125**(1): P. 8-13.

77. Smeekens, S.P., *Processing Of Protein Precursors By A Novel Family Of Subtilisin-Related Mammalian Endoproteases*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(2): P. 182-6.
78. Roberts, J.W., C.W. Roberts, And D.W. Mount, *Inactivation And Proteolytic Cleavage Of Phage Lambda Repressor In Vitro In An ATP-Dependent Reaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(6): P. 2283-7.
79. Lecadet, M.M., M. Lescourret, And A. Klier, *Characterization Of An Intracellular Protease Isolated From Bacillus thuringiensis Sporulating Cells And Able To Modify Homologous RNA Polymerase*. Eur J Biochem, 1977. **79**(2): P. 329-38.
80. Van Melderen, L., Et Al., *ATP-Dependent Degradation Of Ccda By Lon Protease. Effects Of Secondary Structure And Heterologous Subunit Interactions*. J Biol Chem, 1996. **271**(44): P. 27730-8.
81. Gottesman, S. And M.R. Maurizi, *Regulation By Proteolysis: Energy-Dependent Proteases And Their Targets*. Microbiol Rev, 1992. **56**(4): P. 592-621.
82. Suzuki, C.K., Et Al., *ATP-Dependent Proteases That Also Chaperone Protein Biogenesis*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(4): P. 118-23.
83. H.Arnold, H.Z.A.F., *Directed Evolution Converts Subtilisin E Into A Functional Equivalent Of Thermitase*. Division Of Chemistry And Chemical Engineering, 1999. **12**: P. 47-53.
84. Almog, O., Et Al., *Structural Basis Of Thermostability. Analysis Of Stabilizing Mutations In Subtilisin BPN'*. J Biol Chem, 2002. **277**(30): P. 27553-8.
85. Betül Erkan Koç, M.Ö., *Gıda endüstrisinde kitosanın kullanımı*. 2011.
86. Subramani Saravanabhavan, P.M., Jonnalaga Ddaraghavarao, Balachandra Nunninair, *Silicate Enhanced Enzymatic Dehairing: A New Lime-Sulfide-Free Process For Cowhides*. ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY, 2005. **39**.
87. Freddi, G., R. Mossotti, And R. Innocenti, *Degumming Of Silk Fabric With Several Proteases*. Journal Of Biotechnology, 2003. **106**(1): P. 101-112.

88. Rai, R. And V. Taneja, *Papain Catalysed Hydantoin Hydrolysis In The Synthesis Of Amino Acids*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **244**(3): P. 889-92.
89. Gill, I., Et Al., *Biologically Active Peptides And Enzymatic Approaches To Their Production*. Enzyme Microb Technol, 1996. **18**(3): P. 163-83.
90. Du, W., *Towards New Anticancer Drugs: A Decade Of Advances In Synthesis Of Camptothecins And Related Alkaloids*. Tetrahedron, 2003. **59**(44): P. 8649-8687.
91. Soeda, Y., K. Toshima, And S. Matsumura, *Sustainable Enzymatic Preparation Of Polyaspartate Using A Bacterial Protease*. Biomacromolecules, 2003. **4**(2): P. 196-203.
92. Morita, A.H., Et Al., *Chromatographic Fractionation And Characterization Of The Active Platelet Aggregation Inhibitory Factor From Bromelain*. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1979. **239**(2): P. 340-50.
93. Inoue, K., Et Al., *Effect Of Etodolac On Prostaglandin E2 Biosynthesis, Active Oxygen Generation And Bradykinin Formation*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1994. **51**(6): P. 457-62.
94. Munzig, E., Et Al., *Bromelain Protease F9 Reduces The CD44 Mediated Adhesion Of Human Peripheral Blood Lymphocytes To Human Umbilical Vein Endothelial Cells*. FEBS Lett, 1994. **351**(2): P. 215-8.
95. Rosenberg, L., Et Al., *Safety And Efficacy Of A Proteolytic Enzyme For Enzymatic Burn Debridement: A Preliminary Report*. Burns, 2004. **30**(8): P. 843-50.
96. Batkin, S., S.J. Taussig, And J. Szekerezes, *Antimetastatic Effect Of Bromelain With Or Without Its Proteolytic And Anticoagulant Activity*. J Cancer Res Clin Oncol, 1988. **114**(5): P. 507-8.
97. Hunter, R.G., G.W. Henry, And W.H. Civin, *The Action Of Papain And Bromelain On The Uterus*. Am J Obstet Gynecol, 1957. **73**(4): P. 875-80.
98. Knill-Jones, R.P., Et Al., *Comparative Trial Of Nutrizym In Chronic Pancreatic Insufficiency*. Br Med J, 1970. **4**(5726): P. 21-4.
99. Tassman, G.C., J.N. Zafran, And G.M. Zayon, *A Double-Blind Crossover Study Of A Plant Proteolytic Enzyme In Oral Surgery*. J Dent Med, 1965. **20**: P. 51-4.

100. Mekkes, J.R., Et Al., *In Vitro Tissue-Digesting Properties Of Krill Enzymes Compared With Fibrinolysin/Dnase, Papain And Placebo*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(4): P. 703-6.
101. Lecaille, F., J. Kaleta, And D. Bromme, *Human And Parasitic Papain-Like Cysteine Proteases: Their Role In Physiology And Pathology And Recent Developments In Inhibitor Design*. Chem Rev, 2002. **102**(12): P. 4459-88.
102. Küçüköner, E., "*Peynir Ve Yoğurt Oluşum Mekanizması*". 2011.
103. Mohanty, A.K., Et Al., *Bovine Chymosin: Production By Rdna Technology And Application In Cheese Manufacture*. Biotechnol Adv, 1999. **17**(2-3): P. 205-17.
104. Murakami, Y., Et Al., *Continuous Production Of N-(Benzyloxycarbonyl)-L-Glycyl-L-Phenylalanine Methyl Ester Utilizing Extractive Reaction In Aqueous/Organic Biphasic Medium*. Prep Biochem Biotechnol, 2000. **30**(1): P. 15-22.
105. Adekoya, O.A., Et Al., *Comparative Sequence And Structure Analysis Reveal Features Of Cold Adaptation Of An Enzyme In The Thermolysin Family*. Proteins, 2006. **62**(2): P. 435-49.
106. Poms, R., J. Glössl, And H. Foissy, *Increased Sensitivity For Detection Of Specific Target DNA In Milk By Concentration In Milk Fat*. European Food Research And Technology, 2001. **213**(4): P. 361-365.
107. CUTTING, S.M., *Genetic Analysis*. Molecular Biological Methods For Bacillus, 1990: P. 27-74.
108. Innis, M.A., Et Al., *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*. 2012: Academic Press.
109. Erlich, H.A., D. Gelfand, And J.J. Sninsky, *Recent Advances In The Polymerase Chain Reaction*. Science, 1991. **252**(5013): P. 1643-1652.
110. Yılmaz, S. And Z. Devran, "*Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pzr) Ve Bitki Biyoteknolojisinde Yaygın Uygulamaları*". Derim, 2003. **20**(1): P. 31-42.
111. Arı, Ş., *DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Çoğaltılması*. Editörler: Temizkan G., Arda N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Biyogem Yayınları, Nobel Tıp Kitabevleri, 2004(1): P. 101-120.

112. Wilson, I.G., *Inhibition And Facilitation Of Nucleic Acid Amplification*. Applied And Environmental Microbiology, 1997. **63**(10): P. 3741.
113. Kahya, S., E. Buyukcangaz, And K.T. Carlı, *Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu*. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2013. **32**(1).
114. Andrighetto, C., Et Al., *Molecular Identification And Cluster Analysis Of Homofermentative Thermophilic Lactobacilli Isolated From Dairy Products*. Research In Microbiology, 1998. **149**(9): P. 631-643.
115. 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.
116. 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.
117. Maniatis, T., E.F. Fritsch, And J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol. 545. 1982: Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY.
118. Cooper, G.M. And R.E. Hausman, *A Célula-: Uma Abordagem Molecular*. 2016: Artmed Editora.
119. ŞİMŞEK, Ö. And Y.A. KAÇAR, *Bitkilerde Mutasyonların Tespiti İçin Kullanılan Moleküler Yöntemler*. Alatarım: P. 50.
120. Peng, R.-H., A.-S. Xiong, And Q.-H. Yao, *A Direct And Efficient PAGE-Mediated Overlap Extension PCR Method For Gene Multiple-Site Mutagenesis*. Applied Microbiology And Biotechnology, 2006. **73**(1): P. 234-240.
121. Haddad, P.R. And P.E. Jackson, *Ion Chromatography*. Vol. 46. 1990: Elsevier.
122. Wilson, I.D., Et Al., *Encyclopedia Of Separation Science*. 2000: Academic.
123. Selkirk, C., *Ion-Exchange Chromatography*. Protein Purification Protocols, 2004: P. 125-131.



124. Yamamoto, S. And E. Miyagawa, *Dynamic Binding Performance Of Large Biomolecules Such As  $\Gamma$ -Globulin, Viruses And Virus-Like Particles On Various Chromatographic Supports*. 2000.
125. Gu, Y. And J. Huang, *Ultrathin Cellulose Film Coating Of Porous Alumina Membranes For Adsorption Of Superoxide Dismutase*. *Journal Of Materials Chemistry B*, 2013. **1**(41): P. 5636-5643.
126. Javois, L.C., *Immunocytochemical Methods And Protocols*. Vol. 115. 1999: Springer.
127. Sadana, A., *5-Protein Inactivations During Chromatographic Methods Of Separation*. *Separation Science And Technology*, 1998. **1**: P. 135-176.
128. Singh, J., N. Batra, And R. Sobti, *Serine Alkaline Protease From A Newly Isolated Bacillus Sp. SSRI*. *Process Biochemistry*, 2001. **36**(8): P. 781-785.
129. 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.
130. 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.
131. Schaeffer, A.B. And M.D. Fulton, *A Simplified Method Of Staining Endospores*. *Science*, 1933. **77**(1990): P. 194-194.
132. Britschgi, T.B. And S.J. Giovannoni, *Phylogenetic Analysis Of A Natural Marine Bacterioplankton Population By Rrna Gene Cloning And Sequencing*. *Applied And Environmental Microbiology*, 1991. **57**(6): P. 1707-1713.
133. Edgcomb, V.P., Et Al., *Benthic Eukaryotic Diversity In The Guaymas Basin Hydrothermal Vent Environment*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 2002. **99**(11): P. 7658-7662.
134. Kumar, S., K. Tamura, And M. Nei, *MEGA3: Integrated Software For Molecular Evolutionary Genetics Analysis And Sequence Alignment*. *Briefings In Bioinformatics*, 2004. **5**(2): P. 150-163.
135. Jukes, T.H. And C.R. Cantor, *Evolution Of Protein Molecules*. *Mammalian Protein Metabolism*, 1969. **3**(21): P. 132.

136. Caccamo, D., T. Maugeri, And C. Gugliandolo, *Identification Of Thermophilic And Marine Bacilli From Shallow Thermal Vents By Restriction Analysis Of Their Amplified 16S Rdna*. Journal Of Applied Microbiology, 2001. **91**(3): P. 520-524.
137. Cadirci, B.H., Et Al., *Thermostable Serine Protease By Aspergillus parasiticus TEM Have Promising Activity In Enzymatic Dehairing Process*. Journal Of New Results In Science, 2015. **8**(8).
138. Kruger, N.J., *The Bradford Method For Protein Quantitation*. Basic Protein And Peptide Protocols, 1994: P. 9-15.
139. 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.
140. 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.
141. Daffonchio, D., Et Al., *A Randomly Amplified Polymorphic DNA Marker Specific For The Bacillus Cereus Group Is Diagnostic For Bacillus Anthracis*. Applied And Environmental Microbiology, 1999. **65**(3): P. 1298-1303.
142. Ghosh, K., S.K. Sen, And A.K. Ray, *Characterization Of Bacilli Isolated From The Gut Of Rohu, Labeo Rohita, Fingerlings And Its Significance In Digestion*. Journal Of Applied Aquaculture, 2002. **12**(3): P. 33-42.
143. 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.
144. Lal, S., K.N. Mistry, And J.G. Patel, *Evaluation Of Amplified Rdna Restriction Analysis (Ardra) For Identification And Characterization Of Arsenite Resistant Bacterial Isolates*. Evaluation, 2013. **6**(1).
145. Andersen, G.L., J.M. Simchock, And K.H. Wilson, *Identification Of A Region Of Genetic Variability Among Bacillus anthracis Strains And Related Species*. Journal Of Bacteriology, 1996. **178**(2): P. 377-384.

146. Selenska-Pobell, S., Et Al., *Selective Accumulation Of Heavy Metals By Three Indigenous Bacillus Strains, B. Cereus, B. Megaterium And B. Sphaericus, From Drain Waters Of A Uranium Waste Pile.*FEMS Microbiology Ecology, 1999. **29**(1): P. 59-67.
147. Henderson, I., C. Duggleby, And P. Turnbull, *Differentiation Of Bacillus Anthracis From Other Bacillus cereus Group Bacteria With The PCR.*International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology, 1994. **44**(1): P. 99-105.
148. Veith, B., Et Al., *The Complete Genome Sequence Of Bacillus licheniformis DSM13, An Organism With Great Industrial Potential.*Journal Of Molecular Microbiology And Biotechnology, 2004. **7**(4): P. 204-211.
149. Swings, J., *Exploration Of Prokaryotic Diversity Employing Taxonomy.*Microbial Diversity And Ecosystem Function.(Eds. D. Allsopp, RR Colwell, DL Hawksworth), Pp. 371-379. CAV International, Oxon, England (1995), 1995.
150. Fortina, M.G., Et Al., *Reclassification Of Saccharococcus Caldoxylosilyticus As Geobacillus caldoxylosilyticus (Ahmad Et Al. 2000) Comb. Nov.*International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology, 2001. **51**(6): P. 2063-2071.
151. Kuisiene, N., Et Al., *Identification Of The Genus Geobacillus Using Genus-Specific Primers, Based On The 16S–23S Rrna Gene Internal Transcribed Spacer.*FEMS Microbiology Letters, 2007. **277**(2): P. 165-172.
152. Banat, I.M., R. Marchant, And T.J. Rahman, *Geobacillus debilis Sp. Nov., A Novel Obligately Thermophilic Bacterium Isolated From A Cool Soil Environment, And Reassignment Of Bacillus Pallidus To Geobacillus Pallidus Comb. Nov.*International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology, 2004. **54**(6): P. 2197-2201.
153. Kuisienė, N., J. Raugalas, And D. Čitavičius, *Identification Of Geobacillus stearothermophilus By Restriction Digestion With AluI Of The Amplified 16S Rrna.*Biologija, 2007. **53**: P. 62-66.
154. 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.

155. Arulmani, M., Et Al., *Purification And Partial Characterization Of Serine Protease From Thermostable Alkalophilic Bacillus laterosporus-AK1*. World Journal Of Microbiology And Biotechnology, 2007. **23**(4): P. 475-481.
156. Pant, G., Et Al., *Production, Optimization And Partial Purification Of Protease From Bacillus subtilis*. Journal Of Taibah University For Science, 2015. **9**(1): P. 50-55.
157. Zambare, V., S. Nilegaonkar, And P. Kanekar, *A Novel Extracellular Protease From Pseudomonas aeruginosa MCM B-327: Enzyme Production And Its Partial Characterization*. New Biotechnology, 2011. **28**(2): P. 173-181.
158. Huang, Q., Et Al., *Purification And Characterization Of An Extracellular Alkaline Serine Protease With Dehairing Function From Bacillus pumilus*. Current Microbiology, 2003. **46**(3): P. 0169-0173.
159. Orhan, E., D. Omay, And Y. Gvüenilir, *Partial Purification And Characterization Of Protease Enzyme From Bacillus subtilis And Bacillus cereus*. Applied Biochemistry And Biotechnology, 2005. **121**(1-3): P. 183-194.
160. Reddy, L., Y.J. Wee, And H.W. Ryu, *Purification And Characterization Of An Organic Solvent And Detergent-Tolerant Novel Protease Produced By Bacillus Sp. RKY3*. Journal Of Chemical Technology And Biotechnology, 2008. **83**(11): P. 1526-1533.
161. Yamagata, Y. And E. Ichishima, *A New Alkaline Serine Protease From Alkalophilic Bacillus sp.: Cloning, Sequencing, And Characterization Of An Intracellular Protease*. Current Microbiology, 1995. **30**(6): P. 357-366.
162. Kumar, E.V., Et Al., *A Novel Serine Alkaline Protease From Bacillus altitudinis GVC11 And Its Application As A Dehairing Agent*. Bioprocess And Biosystems Engineering, 2011. **34**(4): P. 403-409.