

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

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TOPRAKTAN SOĞUK ALKALİ PROTEAZ ÜRETİCİSİ TÜRLERİN  
İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**Murat ÇAKMAK**

**KASIM 2016**

Biyoloji Anabilim Dalında Murat ÇAKMAK tarafından hazırlanan **TOPRAKTAN SOĞUK ALKALİ PROTEAZ ÜRETİCİSİ TÜRLERİN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU** 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 : Doç. Dr. Hikmet KATIRCIOĞLU

Üye (Danışman) : Prof. Dr. Aysun ERGENE

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ümit YIRTICI

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

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

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### TOPRAKTAN SOĞUK ALKALİ PROTEAZ ÜRETİCİSİ TÜRLERİN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Murat ÇAKMAK

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Bu çalışmada, yarasa mağarasından alınan toprak örneklerindeki bakteriler seri dilüsyon yapılarak izole edilmiş, sıcaklık, pH, proteaz üretme özelliklerine göre Skim Milk Agar besiyerine ekilerek en iyi proteaz üreticisi 2 bakteri örnek seçilip saflaştırılmıştır. İzolatların optimum üreme koşulları belirlenmiştir. Hücre dışı proteaz aktiviteleri sıcaklık, pH, ve inkübasyon süresine göre 1 µl tirozin açığa çıkması için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. İzolatların biyokimyasal testleri belirlenmiştir. Örnekler DNA izolasyonu ve 16S rDNA sekans analizi yöntemleri kullanılarak tanımlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Proteaz, 16S rDNA, Soğuk Alkali, Mağara, Karakterizasyon

2016, 85 sayfa

## ABSTRACT

### ISOLATION OF COLD TYPE PRODUCING ALKALINE PROTEASE SPECIES FROM SOIL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION

Murat ÇAKMAK

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Consultant: Prof. Dr. Aysun ERGENE

In this study, the bacteria isolated from the bat cave soil with serial dilutions and planted Skim Milk Agar Medium according to temperature, pH and characteristics of protease selected and purified two bacteria which are the best producer of protease. The optimum growth conditions were determined for isolated bacteria. The extracellular protease activity identified to 1 µl tyrosine amount of enzyme required for the release by temperature, pH and incubation time. Biochemical tests of the isolates were determined. The samples were identified using DNA isolation and 16S rDNA sequence analysis methods.

**Key words:** Protease, 16S rDNA, Cold Alkaline, Cave, Characterization  
2016, 85 pages

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezimi hazırlamamda bana yol gösteren tecrübe ve bilgileri ile her aşamada destekçim olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Aysun ERGENE hocama sonsuz minnet ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalıştığımız örneklerin toplanmasında, yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK hocama teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında tecrübelerini esirgemeyerek bana yol gösteren Nebahat Aytuna ÇERÇİ, Salih Batuhan SALIK, Karcan IŞIK, Şeyma DUMAN, a teşekkür ederim.

Çalışmalarım ve üniversite hayatımda yanımda olan çalışmalarım boyunca her an beraber olduğumuz Tayfun ÇOŐKUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca tüm maneviyatı ile yanımda olan Arif Furkan BALKAN, Okan YILMAZ, Kürşad AYAN a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım ve hayatım boyunca her an yanımda olan ve beni sonsuz sevgileriyle kucaklayan bütün aile fertlerime başta babam Mehmet ÇAKMAK, annem AYTEN ÇAKMAK kardeşim Elif ÇAKMAK a sonsuz ve içten teşekkürlerimi sunarım.

MURAT ÇAKMAK  
KIRIKKALE, 2016

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	<b>iv</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>1.GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
1.1.1. Enzimler .....	3
1.1.2. Soğukta Aktif Enzimler.....	4
1.1.3. Enzimlerin Sınıflandırılması .....	6
1.1.4. Proteazlar.....	7
1.1.5. Proteazların Sınıflandırılması.....	8
1.1.5.1. Ekzopeptinaz .....	8
1.1.5.1.1. Aminopeptidaz .....	8
1.1.5.1.2. Karboksipeptidaz.....	9
1.1.5.2. Endopeptinaz.....	9
1.1.5.2.1. Serin proteazlar.....	9
1.1.5.2.2. Aspartik proteazlar .....	10
1.1.5.2.3. Sistein / Tiyol proteazlar .....	10
1.1.5.2.4. Aspartat proteazlar .....	11
1.1.5.2.5. Metallo proteazlar.....	11
1.1.6. Proteaz Kaynakları .....	11
1.1.6.1. Bitkisel Proteazlar .....	11
1.1.6.2. Hayvansal Proteazlar.....	12

1.1.6.3. Mikrobiyal Proteazlar.....	13
1.1.7. Mikrobiyal Proteazların Endüstride Kullanım Alanları .....	15
1.1.8. 16S rDNA Dizi Analizi .....	17
1.1.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) .....	19
1.1.10. 16S rDNA Analizinin Avantajları ve Dezavantajları.....	21
1.1.11. Bu Tez Çalışmasının Amacı.....	21
<b>2. MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>22</b>
2. 1. MATERYAL.....	22
2.1.1. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar .....	22
2.1.1.1. NaOH Çözeltisi ( 2 N NaOH Çözeltisi ).....	22
2.1.1.2. Sodyum Fosfat Tamponu .....	22
2.1.1.3. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Çözeltisi ( % 10' luk Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Çözeltisi ).....	22
2.1.1.4. HCl Çözeltisi ( 0.1 M HCl Çözeltisi ) .....	23
2.1.1.5. Serum Fizyolojik Çözeltisi.....	23
2.1.2. Proteaz Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Çözelti ve Tamponlar .....	23
2.1.2.1. Glisin – NaOH Tamponu ( 50 mM Glisin – NaOH Tamponu ) .....	23
2.1.2.2. Sodyum Karbonat Tamponu ( 0.5 M Sodyum Karbonat Tamponu ) .....	24
2.1.2.3. TCA ( Trichloro asetic asit ) Çözeltisi .....	24
2.1.2.4. Folin Reaktifi ( 2 N Folin Reaktifi ).....	24
2.1.3. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	24
2.1.3.1. Tris / EDTA Tamponu(250mL) .....	25
2.1.3.2. % 10'luk SDS Tamponu (100mL) .....	25
2.1.3.3. Proteinaz-K'nın Hazırlanması (10mL) .....	25
2.1.3.4. NaCl Tamponu (5M, 100 mL).....	25
2.1.3.5. CTAB/NaCl Tamponu (100 mL).....	25
2.1.3.6. Kloroform / İzoamil Alkol Tamponu ( 100 mL).....	26
2.1.3.7. Kloroform / İzoamil Alkol / Fenol Tamponu (100 mL) .....	26
2.1.3.8. İzopropanol Alkol (100 mL) .....	26
2.1.3.9. %70'lik Etil Alkol (100 mL).....	26

2.1.3.10. Tris- HCl Tamponu ( 50 mM, 100 mL).....	26
2.1.3.11. Tris-HCl Tamponu (1 M, 100 mL) .....	26
2.1.3.12. Elektroforez Tamponu ( 50x TAE ) Hazırlanması.....	27
2.1.3.14. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Suşların Tanımlanmasında Kullanılan Primerler ve Özellikleri.....	27
2.1.4. Kullanılan Besiyerleri.....	27
2.1.4.1. Nutrient Broth ( MERCK 1.05443 ) .....	27
2.1.4.2. Nutrient Agar ( MERCK 1.05450 ).....	28
2.1.4.3. N1 Agar .....	28
2.1.4.4. Skimmilk Besiyeri.....	28
2.1.4.5. Uygun Enzim Üretim Besiyeri.....	29
2.2. METOD.....	30
2.2.1. Bakterilerin İzolasyonu .....	30
2.2.2. Bakteri Üreme Eğrisinin Belirlenmesi .....	30
2.2.3. Proteaz Pozitif Bakterilerin Belirlenmesi.....	31
2.2.4. İzolatların Ekstraselüler Proteaz Enzim Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi .....	31
2.2.5. Proteaz Üretimi.....	31
2.2.6. Proteaz Aktivite Tayini .....	33
2.2.7. Tirozin Standart Grafiğinin Oluşturulması.....	33
2.2.8. Seçilen İzolatların Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	34
2.2.8.1. Gram Boyama .....	34
2.2.8.2. Katalaz Testi.....	35
2.2.8.3. Oksidaz Testi.....	35
2.2.8.4. IMVIC Test .....	35
2.2.8.4.1. İndol Test.....	36
2.2.8.4.2. Metil kırmızısı ve Voges-Proskauer (MR-VP) testleri.....	36
2.2.8.4.3. Sitrat Testi .....	36
2.2.9. Proteaz Üretimi İçin En Uygun Koşulların Belirlenmesi.....	37
2.2.9.1. İnkübasyon Sıcaklığının Proteaz Üretiminin Belirlenmesi.....	37



2.2.9.2. İnkübasyon Süresinin Proteaz Üretimini Belirlenmesi .....	37
2.2.10. Üretilen Proteaz Enziminin Karakterizasyonu .....	37
2.2.10.1. Proteaz Enziminin Optimum reaksiyon pH Aralıklarının Saptanması .....	37
2.2.10.2. Proteaz Enziminin Optimum reaksiyon Süresinin Belirlenmesi.....	38
2.2.10.3. Proteaz Enziminin Optimum reaksiyon Sıcaklığının Belirlenmesi .	38
2.2.11. Kromozomal DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini .....	38
2.2.12. PZR ve Optimizasyonu .....	39
2.2.12.1. PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi.....	39
2.2.12.2. 16s rDNA Sekans Analizi .....	40
2.2.12.3. Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması.....	40
<b>3. ARAŞTIRMA BULGULARI</b> .....	<b>41</b>
3.1. İzolasyon Çalışmaları ve Proteaz Üreticisi Etkin İzolatın Seçilmesi .....	41
3.2. Bakterilerin Üreme Eğrisinin Belirlenmesi .....	41
3.3. İzolatların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi .....	42
3.3.1. Gram Boyama.....	43
3.3.2. Katalaz Testi .....	44
3.3.3. Oksidaz Testi .....	44
3.3.4. IMVIC Testleri .....	45
3.4. Proteaz Üretimi İçin En Uygun Koşulun Belirlenmesi .....	47
3.4.1. MH1 Suşunun Sıcaklık, İnkübasyon Süresi, ve pH Değerinin Proteaz Üretimine Etkisinin Belirlenmesi .....	49
3.4.2. MB2 kodlu suşun Sıcaklık, İnkübasyon Süresi ve Ph Değerinin Proteaz Üretimine Etkisinin Belirlenmesi .....	51
3.6. 16S rDNA Sekans Analizi ile Tanımlama .....	54
3.6.1. Kromozomal DNA İzolasyonu.....	54
3.6.2. MH1 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması.....	54
3.6.3. MH1 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması .....	55
3.6.4. MB2 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması .....	58
3.6.5. MB2 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması .....	59
<b>4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA</b> .....	<b>62</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>66</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL	Sayfa
1.2. 16S rDNA Sekans Analizi [43].....	19
1.3. PZR Aşamaları [46] .....	20
2.1. Skim Milk Agar besiyerinde izolatlarının proteolitik zonları .....	30
2.2. Folin reaktifi sonrası görüntüsü .....	32
2.3. Tirozin Standart Grafiği .....	34
3.1. MH1 in pH 9.0 daki üreme grafiği.....	41
3.2. MB2 in pH 7.0 deki üreme grafiği.....	42
3.3. Gram Boyama Sonucu MH1 (a), MB2 (b) ile gösterilmiştir. ....	43
3.4. Katalaz Testi.....	44
3.5. Oksidaz testi.....	44
3.6. İndol testi görüntüsü.....	45
3.7. Metil testi görüntüsü .....	45
3.8. Voges Proskauer testi görüntüsü.....	46
3.9. Sitrat testi görüntüsü .....	46
3.10. MH1 suşu pH 7 için proteaz enzim aktivite grafiği .....	49
3.11. MH1 suşu, pH 9 için proteaz enzim aktivite grafiği .....	50
3.12. MH1 suşu pH 10 için proteaz enzim aktivite grafiği 16 .....	50
3.13. MH1 suşu pH 12 için proteaz enzim aktivite grafiği .....	51
3.14. MB2 suşu pH 7 için proteaz enzim aktivite grafiği .....	52
3.15. MB2 suşu pH 9 için proteaz enzim aktivite grafiği .....	52
3.16. MB2 suşu pH 10 için proteaz enzim aktivite grafiği .....	53
3.17. MB2 suşu pH 12 için proteaz enzim aktivite grafiği .....	53
3.18. Farklı primer bağlanma şekillerinde MH1 kodlu PZR ürünleri.....	54
3.19. Farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında MH1 suşuna ait PZR ürünleri.....	55
3.20. MH1 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendogram (İki gen arasındaki uzaklık cetveli) .....	56

3.21. Farklı primer bağlanma şekillerinde MB2 kodlu PZR ürünleri .....	58
3.22. Farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında MB2 suşuna ait PZR ürünleri .....	59
3.23. MB2 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendogram (İki gen arasındaki uzaklık cetveli) .....	60



## ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE	Sayfa
1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması .....	6
2.1. Çalışmada kullanılan primerler ve özellikleri .....	27
3.1. MH1 ve MB2 suşunun biyokimyasal özellikleri .....	43
3.2.4MH1 ve MB2 Proteaz Aktivite Tablosu ( $\mu\text{g/ml}$ ) .....	48
3.3. MH1 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri .....	57
3.4. MB2 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri .....	61

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

N	Azot
P	Fosfor
Ca	Kalsiyum
Mg	Magnezyum
C	Karbon
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sodyum Karbonat
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
kDa	Kilo Dalton
EDTA	Etilen Diamin Tetra
TCA	Trikloroasetik Asit

## 1. GİRİŞ

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitli ve ekonomik değerlerinin çok yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar, daha da önem kazanmaktadır. Özellikle birkaç ülke dışında diğer ülkelerin bu konuda tamamen dışa bağımlı oldukları görülmektedir. Proteazlar aynı zamanda endüstrinin birçok alanında da yoğun şekilde değerlendirilmektedir. Bunlar arasında dericilik, tekstil, gıda endüstrisi, içecek endüstrisi, ekmek ve pasta ürünleri, çeşitli soya ürünlerinin üretimi protein hidrolizatların tatlandırılması farmasötik ve tıbbi uygulamalar kimya endüstrisi, atıkların temizlenmesi, nişastadan etanol üretimi gibi kendi içlerinde birer endüstri kökenli olmakla birlikte ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan izole edilmektedir. Bunun nedeni, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmaları, daha stabil ve daha ucuz olmaları, büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta elde edilmesi ve ekstrem koşullarda aktivite göstermeleridir. Örneğin mikrobiyal enzimler yüksek ve düşük sıcaklık ve pH değerliklerinde aktivite gösterirler.

Enzimlerin endüstriyel alanda kullanılmaları çok eski çağlara kadar uzanmaktadır. İlk çağlardan beri üretildiği bilinen ekmek, yoğurt, şarap, peynir gibi gıda maddelerinin üretiminde kullanıldığı, örneğin incir bitkisinden elde edilen sıvı ile süttten peynir yapıldığı bilinmektedir. Daha sonradan bu sıvıda bir enzim olduğu bulunmuş ve bu enzime 'fisin' adı verilmiştir [1].

1860 yılında Pasteur, fermantasyon olayını enzimlerin gerçekleştirdiğini fark etmiştir. Organizmaların gelişme ve farklılaşma süreçlerini enzimatik reaksiyonlar biçimlendirmektedirler. Canlı organizmaların yaşamsal etkinliklerinde enzimlerin üstlendikleri görev biyo-katalizörlüktür. Buldukları ortam koşullarında gerçekleşmesi mümkün olmayan reaksiyonların oluşmasına katkıda bulunarak biyolojik yaşamı olası kılmaktadırlar [2].

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler, genel olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel ya da hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, çok miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır [3].

Bakteriyel kökenli proteaz enzimler nötral ve alkali kökenli enzimler olup *Bacillus* cinsindeki organizmalar tarafından üretilmektedir. Bakteriyel nötral proteazla pH 5.0-8.0 aralığında optimum aktivite gösterirler ve termotoleranslığı nispeten düşüktür. Termotoleranslıklarının düşük olması gıda ürünlerinin üretilmesi sırasında reaksiyonların kontrol edilebilmesi açısından bir avantajdır. Bazı nötral proteaz enzimlerinin üretilmesi sırasında reaksiyonların kontrol edilebilmesi açısından bir avantajdır [4].

Ülkemizde proteaz üretimi alanında gereksinim duyulan proteazların yerel izolat tarafından elde edilecek olması ile gelecekte üretim sektörü için yurt dışı ithalat zorunluluğunu ortadan kaldıracak, önemli bir alternatif üretici yerel izolat sunulmuş olacaktır. Üretimi yapılacak proteaz ilderide yapılması düşünülen farklı fonksiyonel grupların eklenmesi ile özellikli enzim üretimi ile farklı uygulama seçenekleri için alt yapı oluşturulacaktır. Dolayısı ile gereksinim duyulan enzim türevleri için de alternatifler üretilmiş olacaktır. İzolasyonu gerçekleştirilen termofil mikroorganizmaların endüstriyel süreçlerdeki kullanım üstünlükleri ve metabolik çeşitliliklerinden dolayı ilderide termal stabilitesi yüksek enzim üretimi çalışmaları başta olmak üzere farklı alanlarda kullanılabilmesi için zemin oluşturulacaktır. Bazı durumlarda enzim miktarının veya aktivitesinin yüksek olması yeterli gelmemektedir. En temel olması gereken özellikler; enzimin uzun ömürlü ve dayanıklı olmasıdır, aktivite göstereceği ortam hücre içi şartlarından farklı şartlar olsa da verilen substratı kullanabilmeli, endüstriyel ortamda da iş görebilmelidir. Ayrıca proteaz enzimlerin endüstriyel işlemlerde kullanılmaları ile yüksek ve düşük sıcaklıklarda bakteriyel ve viral kontaminasyon riski de azaltılmış olacaktır. Bu durum ekonomiklik anlamında endüstride bir çözüm olacaktır.

## 1.1. KAYNAK ÖZETLERİ

### 1.1.1. Enzimler

Enzim canlı hücreler tarafından sentezlenen, canlı metabolizmasındaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşturmadan %100 verim esasına göre çalışan biyolojik bir katalizördür. Katalizleme güçleri ve spesifik oluşları, enzimlerin en önemli özellikleridir. Katalitik RNA moleküllerin küçük bir grubu hariç, bütün enzimler protein yapısındadırlar [5]. Enzimlerin yapılarının aydınlatılmasıyla, enzim katalizli reaksiyonların kinetik ve termodinamik açıdan incelenmesi çalışmaları da ilerlemiştir. Enzimler molekülleri parçalar, birleştirir veya belirli grupları bir molekülden diğerine taşırlar [6].

Enzimlerle katalize edilen tepkimeye katılan kimyasal moleküllere substrat adı verilir. Birçok enzim, substratlarının adın veya aktivitelerini tanımlayan bir kelime veya sözcük gubuna “az” soneki ekleyerek adlandırılır. Üreaz, amilaz, arjinaz, proteaz ve lipaz, substratı tanımlayan; DNA polimeraz, laktat dehidrojenaz ve adenilat siklaz, tepkimeyi tanımlayan adlandırmalardır. Karışık isimlendirmelerin sonucu olarak bazen aynı enzim için iki veya daha fazla ad kullanılmıştır; bazen de iki farklı enzim için aynı ad kullanılmıştır. Böyle belirsiz anlamlılıklar ve yeni olarak keşfedilen enzimlerin sürekli artan sayısı nedeniyle, uluslararası anlaşmalar vasıtasıyla, enzimlerin isimlendirilmesi ve sınıflandırılması için bir sistem benimsenmiştir [7].

Ülkemizde enzimler alanında bilimsel araştırmalar yapan birçok araştırmacı ve çalışma grubu bulunmaktadır. Enzimler alanında bazı araştırmacılar yeni enzimlerin doğal kaynaklardan saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerinde araştırmalar yaparken bazı araştırmacılar da enzimlerin daha etkin üretimi ve kullanımı alanlarında araştırmalarını yapmaktadır. Enzimler biyokimya alanının en önemli çalışma konularından biri olmasından dolayı özellikle biyokimyacılar tarafından çok çalışılmakla birlikte günümüzde tekstil mühendisliği, kimya mühendisliği, gıda mühendisliği, biyomühendislik, kimya, biyoloji, mikrobiyoloji ve biyoteknoloji alanlarını kapsayan geniş bir çalışma konusu haline gelmiştir [7].



### 1.1.2. Soğukta Aktif Enzimler

Mikroorganizmalar düşük sıcaklıklarda işlev yapabilmek ve hayatta kalmak kendine özel adaptasyon mekanizması geliştirmiştir. Soğukta üreyebilen bu mikroorganizmalar psikrofiller ve psikrotolerantlar olmak üzere 2'ye ayrılmıştır. Psikrofilik mikroorganizmaların gelişimi için optimum sıcaklık 15°C, maksimum gelişim sıcaklığı 2°C'nin üstünde ve minimum 0°C'dir. Psikrotolerant mikroorganizmalar genellikle 0°C'de gelişmemekte ancak 3-5°C'de gelişebilmektedir. Optimum ve maksimum gelişim sıcaklığının 20°C'nin üzerinde ancak 30°C'nin altındadır. Arktik ve antartik derin denizlerinin ağır koşullarına karşın birçok soğuk uyumlu organizmalar karakterize edilmiş ve antartik okyanusunda bakteri hücrelerinin yoğunlukta olduğu bildirilmiştir. Psikrofiller soğuk çevrelerde örneğin mağaralar, derin denizler, buzullar, dağlık bölge, toprak, temiz veya tuzlu sular ile soğukkanlı hayvanlar, örneğin balık veya kabuklu hayvanlarda bulunurlar. Genel olarak soğuk uyumlu enzimler düşük ve ılımlı sıcaklıklarda mezofilik benzerlerine göre yüksek spesifik aktiviteye sahiptirler [8].

Günümüzde soğuk uyumlu mikroorganizmadan soğuk aktif enzimlerin bulunması ve geliştirilmesi önemli ölçüde artmıştır. Çoğu Antartika ve antartik mikroorganizmalarından üretilmiştir. Sadece çok az soğukta aktif proteazlar deniz mantarlarında incelemiştir. Deniz mantarları üzerindeki araştırmalar da çoğunlukla biyoaktif substratlar ve sekonder metabolitler üzerinde durmuşlardır (Hui ve ark, 2009). 0-30°C'de soğukta aktif enzimlerin spesifik aktivitelerinin onların mezofilik benzerlerinden daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Ancak soğuk uyumlu enzimlerle ilgili mevcut veriler düşük termostabilite ve neredeyse her zaman yüksek spesifik aktivite olduğunu göstermiştir [9].

Psikrofillerin düşük sıcaklıklarda yüksek aktivite gösterdikleri ve düşük aktivasyon enerjileri ile enzim sentezledikleri bilinmektedir. 0-20°C enzimatik aktivitelerini sürdürmeleri nedeniyle soğukta aktif enzimler büyük ekonomik değere sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı soğukta aktif enzimlerin temel çalışmalar ve endüstriyel kullanım da çok fazla önemini arttırmıştır. Soğuk uyumlu mikroorganizmaların enzimleri önemli enerji tasarrufu oluşturduğundan pratik uygulamalarda çok fazla kullanılmaya başlanmıştır [10].

Düşük sıcaklıklara adapte olmuş mikroorganizmalar ekstremofillerin bir üyesi olup, 0°C de bile üreyebilirler. Literatürde psikrofil bakterilerin optimum 15°C, maksimum 20°C, minimum 0°C veya daha düşük sıcaklıklarda üredikleri bildirilmiştir [10].

Psikrofiller, soğuğa uyumlu (soğuk habitatlara adapte olmuş) mikroorganizmalardır ve bunlar düşük sıcaklıklarda yüksek aktivite gösteren enzimler üretmektedirler. Bu enzimler soğukta aktif (düşük sıcaklıklarda aktif) şeklinde tanımlanırlar [11]. Soğukta aktif enzimler 3 genel özelliğe sahiptir.

1. Sıcaklıkla birlikte enzim aktivitesinin düşük sıcaklığa doğru değişmesi,
2. Spesifik aktivitesinin ve fizyolojik verimin düşük sıcaklıklarda mezofilik koşullara göre daha yüksek olması
3. Mezofil sıcaklıkta enzimin termal stabilite sınırının hızlı bir şekilde düşmesi [10].

Bir başka Japon firması Cao-corporation deterjan kullanımını için soğukta Aktif proteaz enzimine patent almıştır. Düşük sıcaklıklarda proteinleri hızlı şekilde parçalayan mikroorganizmalar protein içerikli atık suların işlenmesinde önemlidir. Çünkü bu tür atık su drenajlarının sıcaklıkları (yaklaşık 5°C -25°C) nispeten düşüktür [12]. Daha önemlisi soğukta aktif proteaz enzimlerinin kullanıldığı alanlarda önemli bir enerji tasarrufu sağlanmaktadır.

Örneğin gıda endüstrisinde sıcaklığa hassas ürün ve substratların korumasında, değişimleri önlenmektedir. Bunların dışında soğukta aktif proteaz enzimi içecek ve şarap endüstrisi, peynir üretimi, hayvansal gıdaların eldesi ve meyve suyu endüstrisi gibi alanlarda da mezofilik enzimlere karşı iyi bir alternatiftir. Ayrıca soğukta aktif proteazların düşük sıcaklıkta yüksek katalitik aktivite göstermeleri nedeniyle gıda endüstrisinde tatlandırıcı enzimler şeklinde kullanılması da söz konusudur [13].

### 1.1.3. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzim terminolojisi ve sınıflandırılması için 1961 yılında toplanan ilk Enzim Komisyonun raporuna göre enzimler, katalizörlük yapılan tepkimenin tipine göre 6 ana sınıfa ayrılmıştır [14]. Enzimlerin sınıflandırılması tablosu ve açıklamaları Çizelge 1.1’de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzim Adı	Reaksiyon
1.Oksidoredüktazlar	İki substrat arasındaki oksidasyon (yükseltgenme) ve redüksiyon(indirgenme) reaksiyonlarını katalizleyen enzimler
2.Transferazlar	Molekülden H <sup>+</sup> dışında başka grupları (C, N ve fosfor taşıyan) aktaran enzimler
3. Hidrolazlar	Değişik bağların (C-halojenür ya da P-N bağlarına su katılmasıyla) hidrolizini sağlayan enzimler.
4.Liyazlar	C-C, C-O, C-N, C-S bağlarını yükseltgenme ve hidroliz dışında bir mekanizma ile kıran enzimler
5.İzomerazlar	Optik ve geometrik izomerlerin rasemizasyonunu katalizleyen enzimler
6.Ligazlar	Yüksek enerjili fosfatların enerjisini kullanarak, C, O, S, N arasında bağ oluşumunu sağlayan enzimler

**Oksidoredüktazlar:** Bu sınıf, redoks tepkimelerini katalizleyen tüm enzimleri içine alır, bir substrattan diğerine H, O<sub>2</sub>, ve e<sup>-</sup> transferini sağlarlar.

**Transferazlar:** Transferazlar, metil, açıl, amino glikozil veya fosfat gibi belirli bir grubun bir maddeden diğerine transferini katalize eder.

**Hidrolazlar:** Ester, peptid, eter, glikoz, asit, anhidrit, C-O, C-N, C-C bağlarını hidroliz ederler. Proteaz enzimi bu gruptandır.

**Liyazlar:** Susuz ortamdaki grupların uzaklaştırılmasını katalizlerler.

**İzomerazlar:** Bir molekül içinde geometrik veya yapısal yeniden ayarlamaları katalize ederler.

**Ligazlar:** ATP veya diğer nükleosit trifosfat içindeki pirofosfatın hidrolizi ile eşleşmiş olan iki molekülün birleşmesini katalize ederler.

Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin %80'i polimerlerin doğal yapısını bozabilme yeteneğine sahip olan hidrolazlardır [15]. Endüstriyel açıdan çok önemli olan hidrolazların %60'ını ise proteazlar oluşturmaktadır [16].

#### 1.1.4. Proteazlar

Proteolitik enzimler olarak da bilinen proteazlar (peptidazlar veya proteinaz), proteinlerdeki peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Proteazlar, büyük proteinler ve polipeptidleri hidroliz ederek hücreler tarafından içeri alınabilecek daha küçük moleküllerin oluşumunu sağlamaktadırlar [5, 17].

Proteazlar, enzimlerin oldukça kompleks bir grubunu oluştururlar ve oldukça farklı katalitik ve fizikokimyasal özelliklere sahiptirlerdir. Proteaz sentezinin hücrel kontrolünden sorumlu mekanizma henüz tam olarak bilinmemekle beraber alkali proteazların üretimi amino asit veya amonyum gibi hızlı bir şekilde metabolize edilebilen azot kaynakları ile baskılanmaktadır. Diğer ortam bileşenleri olan küçük şekerler ve mineraller enzim sentezini etkilemektedir [18]. Proteazların farklı kaynaklardan izole edilebilen bazı sınıfları, nötral pH'nın üzerindeki bazı pH değerlerinde de kataliz yeteneğine sahip olmaları sayesinde endüstriyel alanda önem kazanmalarına neden olmuştur [19].

Alkali proteazlar deri, gıda, deterjan, eczacılık, fotoğrafçılık, atık yönetimi v.b. birçok endüstriyel alanda kullanılan enzim grubudur. Son yıllarda, endüstride klasik yöntemler yerine enzimlere dayalı üretime geçilmiştir.

Proteazlar endüstriyel enzimlerin üç büyük grubundan birini temsil eder ve dünya çapındaki toplam enzim satışının yaklaşık %60'ını oluşturarak endüstriyel enzim marketinde büyük bir hakimiyete sahiptirler [4]. Mikrobiyal enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanım değerlerine bakıldığı zaman toplam dünya enzim piyasasının %60'ını alkalın serin proteaz kapsamaktadır [20].

### **1.1.5. Proteazların Sınıflandırılması**

Uluslararası Biyokimya Birliği (International Union of Biochemistry) tarafından yapılan enzim sınıflandırılmasında tüm enzimler katalizledikleri reaksiyon tipine göre 6 sınıfa ayrılmışlar ve proteazlar 3. sırada yer alan hidrolazlar sınıfına dahil edilmişlerdir. Proteazların alt sınıfı peptid bağlarını parçalamadan dolayı 3.4 olarak belirlenmiştir. Buna rağmen, yapısındaki ve etkilerindeki büyük çeşitlilikler nedeniyle genel enzim adlandırma sistemi ile kolayca adlandırılmazlar [4].

#### **1.1.5.1. Ekzopeptinaz**

Ekzopeptidazlar sadece peptid zincirinin sonundaki bölgeye etki etmektedir. Peptid ve proteinlerin (N) ve (C) ucundan etkileşimlerine göre sırasıyla, karboksipeptidazlar ve aminopeptidazlar olarak sınıflandırılırlar.

##### **1.1.5.1.1. Aminopeptidaz**

Peptid zincirinin serbest N-ucuna etki ederek tek bir amino asitin, dipeptitin veya tripeptidin bağdan ayrılmasını sağlarlar. Aminopeptidazlar çok geniş çeşitlilik gösteren bakteri ve fungus türlerinde sentezlenmektedir. Aminopeptidazlar genellikle hücre içi enzimlerdir. Bakteriler ve mantarlardaki aminopeptidazların substrat spesifikliği oldukça farklıdır. Optimum pH 7.5-10.5 arasındadır. Optimum aktivite için  $Mg^{+2}$  ya da  $Mn^{+2}$  ihtiyaç duyarlar [4].

### 1.1.5.1.2. Karboksipeptidaz

Polipeptid zincirini C-ucuna etki ederek tek bir amino asitin ya da dipeptidin ayrılmasını sağlarlar. Karboksipeptidazlar enzimlerin aktif bölgesindeki aminoasit çeşitlerinin yapısına göre üç ana gruba ayrılırlar. Bunlar; serin karboksipeptidazlar, metallo karboksipeptidazlar ve sistein karboksipeptidazlardır. *Penicillium sp.*, *Saccharomyces sp.* ve *Aspergillus sp.*'den izole edilen serin karboksipeptidazların substrat spesifisiteleri aynıdır fakat optimum pH, stabilite, moleküler ağırlık ve inhibitörlerin etkisi gibi diğer özellikleri farklıdır. *Saccharomyces sp.* ve *Pseudomonas sp.*'den izole edilen metallo karboksipeptidazlar aktiviteleri için  $Zn^{+2}$  ya da  $Co^{+2}$  iyonuna ihtiyaç duyarlar. Sistein karboksipeptidazlar, aktif bölgelerinde sistein aminoasidi bulundururlar [4].

### 1.1.5.2. Endopeptinaz

Endopeptidazlar ekzopeptidazların aksine amino veya karboksil uçlarda bulunan peptit bağları yerine iç kısımlarda bulunan peptit bağlarını hidroliz ederler. Ortamda serbest aminoasit veya karboksil gruplarının varlığı enzim aktivitesine negatif etki etmektedir. Endopeptidazlar serin proteazlar, sistein proteazlar, aspartik proteazlar ve metalloproteazlar olmak üzere dört alt kısma ayrılmıştır.

#### 1.1.5.2.1. Serin proteazlar

Serin proteazlar, aktif bölgelerinde serin içermeleri ile karakterize edilirler. Serin proteazlar substrat tercihlerine göre 3 grupta toplanırlar; tripsin benzeri serin proteazlar, pozitif yüklü aminoasitten sonraki peptid bağına hidrolizlerler, kimotripsin benzeri serin proteazlar, büyük hidrofobik aminoasitten sonraki peptid bağına hidrolizlerler, elastaz benzeri serin proteazlar ise küçük hidrofobik aminoasitten sonraki peptid bağına hidrolizlemektedirler [4]. Serin proteazlar, virüsler, bakteriler ve ökaryot organizmalarda çok sık ve bol sayıda olmakla birlikte hayati önem

taşımaktadır. Serin proteazlar, 7 ile 11 arasında değişen pH'larda aktiftirler, bu nedenle bunlara serin alkalın proteazlarda denmektedir.

Moleküler ağırlıkları 18-35 kDa arasında değişmektedir. Küfler, maya mantarları, birçok bakteri turu ve bazı makro mantar çeşitleri bilinen serin proteaz üreticileri olsa da, subtilisin üreten bazı *Bacillus sp.*'ler en iyi serin proteaz üreticilerindedir [4]. Bilinen en önemli serin proteazlar ise triptaz, lipaz, elastaz, kimotripsin, tripsin, trombin ve fosfolipazdır.

#### **1.1.5.2.2. Aspartik proteazlar**

Genellikle asidik proteazlar olarak bilinen aspartik endopeptidazlar aktif merkezlerinde katalitik aktiviteleri için aspartik asit rezidülerine ihtiyaç duyar. Düşük pH' larda aktivite gösteren aspartik proteazların molekül ağırlıkları 30-45 kDa arasında değişmektedir ve heksapeptid yapısında olan pepstatin adlı inhibitör tarafından inhibe edilmektedirler. İzoelektrik noktaları pH 3 ile 4.5 arasında değişmektedir. Pepsin, katepsin D ve E ile renin aspartat endopeptidazların bilinen örnekleridirler [4].

#### **1.1.5.2.3. Sistein / Tiyol proteazlar**

Sistein proteazlar hem prokaryotik hem de ökaryotik organizmalarda bulunmaktadır. Tüm sistein proteazların aktivitesi, histidin veya sistein içeren katalitik bir çifte bağlıdır. Sistein proteazlar genellikle sadece HCN (hidrosiyamik asit) ve sistein gibi azaltıcı ajanların varlığında aktiftirler. Sistein proteazların tek zincir spesifitelerine dayanarak papain benzeri, arginin rezidüsünde bağı açığa çıkarmak için tercih edilen tripsin benzeri, glutamik aside spesifik ve diğerleri olmak üzere 4 gruba ayrılırlar. Papain en iyi bilinen sistein proteazdır. Sistein proteazların optimumu nötral pH' lardadır fakat lizozomal proteazlar gibi bazıları da asidik pH' larda aktiftir [4].

#### **1.1.5.2.4. Aspartat proteazlar**

Aspartat proteazlar asit endopeptidazlar olarak da bilinirler. Bu enzimlerin katalitik bölgeleri iki aspartik asit içerir ve bu proteazlar genellikle düşük pH değerlerinde aktivite gösterirler. Molekül ağırlıkları 30-45 kDa arasında olup; pepsin, katepsin D ve E ile renin aspartat endopeptidazların bilinen örnekleridirler [21].

#### **1.1.5.2.5. Metallo proteazlar**

Metallo proteazlar, katalitik mekanizmasında genel olarak çinko, kobalt veya diğer metal iyonlarını kullanmaktadırlar. EDTA ile reaksiyona girip inhibe edilebilen metalloproteazlar, aktif merkezlerindeki fonksiyonel gruplara göre sınıflandırılırlar. En iyi bilinen tipleri adamalysin, serralysin gibi matriks metalloproteazları ve hücre zarının yapısında bulunan yüzey membran proteinleri olan ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) proteinleridir [22].

#### **1.1.6. Proteaz Kaynakları**

Proteaz elde edebilmek için 3 kaynak vardır. Proteazlar kaynağına göre; bitkisel proteazlar, hayvansal proteazlar, mikrobiyal proteazlar olarak 3 kısma sınıflandırılmıştır.

##### **1.1.6.1. Bitkisel Proteazlar**

Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanılmasını, bitkinin yetiştiği iklim şartları ve kültivasyon toprağının uygunluğu gibi farklı faktörler etkilemektedir. Bitkisel kaynaklı proteazlar özellikle tropikal bitkilerden elde edilmektedir. Bitkisel kaynaklı proteazlardan en yaygın olarak bilinenleri papain, bromolein, fisin ve keratinazdır [4].



Bilinen en güçlü bitkisel proteaz kaynakları; papaya (*Carica papaya*), ananas (*Anana sativa*), bazı *Ficus* türleri (*F. carica*, *F. glabrata*), enginar (*Cynera cardunculus*) ve soya fasulyesi (*Soya hispidus*) dir [23].

Papain, tropikal bölgelerde yetişen (*Carica papaya*) meyvesinin öz suyundan izole edilmiştir. Katalitik yapısı sistein, histidin, asparajin'ten oluşurken, molekül kütlesi 23 kDa'dur. pH 5-9 arasında aktiftir ve 80-90 °C sıcaklıkta kararlılığını koruyabilen bir proteaz türüdür. Endüstriyel olarak en çok et endüstrisinde etin yumuşatılması için kullanılmasının yanı sıra, hayvan derisinin işlenmesi, ilaç üretimi, meşrubatların berraklaşmasında ve acılık tadının giderilmesi sindirim sistemi için iyi bir destekleyici, hazmı kolaylaştırıcı, hazımsızlık ve benzeri rahatsızlıkların giderilmesi gibi birçok yaygın kullanım alanına sahiptir [4, 24].

#### **1.1.6.2. Hayvansal Proteazlar**

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

Tripsin, pankreastan salgılanan, ince bağırsakta proteinleri parçalayıcı özelliğe sahip sindirim enzimidir. Enzimatik mekanizması diğer serin proteazlara benzer. Tripsin, bakteriyel ortamın hazırlanmasında ve bazı özel tıbbi uygulamalarda kullanılır. Kimotripsin, proteolizi gerçekleştirebilen hayvansal pankreatik ekstraktlarda bulunan bir sindirim enzimidir. Bir serin proteazdır ve peptid bağlarını fenilalanin, tirozin ve triptofan aminoasitlerinden sonraki karboksil gruplarından hidrolizler. Saf kimotripsin pahalı bir enzimdir ve yalnızca diagnostik ve analitik uygulamalarla sut protein hidrolizatlarının dealler jenasyonunda kullanılmaktadır [4].

Renin, anne sütünü sindirmek için memelilerin midesinde üretilen sütü pıhtılaştırıcı doğal, kompleks bir enzimdir. Yeni doğan sütle beslenmiş buzağının kesilen şirdeni hayvansal bazlı renin (rennet) için en yaygın kaynaktır. Renin, bütün süt veren memelilerin midelerinde inaktif pro-renin olarak bulunur. Pepsin işleviyle ya da kendi kendine katalizle aktif renine dönüşür. Süt endüstrisinde süt kazeininin çöktürülmesinde ve lor peyniri üretiminde sıkça kullanılmaktadır [4].

### **1.1.6.3. Mikrobiyal Proteazlar**

Hücrede birçok önemli fizyolojik görevler üstlenen proteazlar, tüm ökaryotik ve prokaryotik organizmalar için vazgeçilmez enzimlerdir. Proteazlar, proteinazlar veya peptidazlar organizmada sentezlenen proteinlerin kompozisyonunun, büyüklüğünün, biçiminin ve döngüsünün kontrolünde esansiyel olan enzimlerdir [25].

Güncel dünyada proteazlara duyulan talep; mikrobiyal canlıların hızlı gelişimden, düşük maliyetli üretiminden ve mikrobiyal canlıları genetik olarak modifiye ederek çeşitli endüstriyel uygulamalar için gerekli olan daha verimli enzimleri düşük bütçelerle üretebilen ve istenilen karaktere sahip yüksek verimli suşlar elde etmeyi kolaylaştırdıklarından dolayı mikrobiyal proteazlara karşı endüstride bir artış gözlemlenmektedir [26].

Günümüzde en çok kullanılan mikrobiyal proteaz kaynağı, bakteri, fungus ve virüs orijinli olan mikrobiyal proteazlardır. Mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamalar için hemen hemen tüm özelliklerinin istenen şekilde değiştirilebilmesi, bitki ve hayvansal proteazlara göre daha saf ve çok elde edilebilmesi ve mikroorganizmaların uygun bir kültür ortamında düşük bütçelerle üretilmesi mümkün olduğundan mikrobiyal kaynaklı proteazlar bitki ve hayvan kaynaklı proteazlara göre daha çok tercih edilmektedirler [27].

Fungus orijinli proteazları üreten mantarlar, bakterilerden daha geniş kapsamlı enzim üreticileridirler. Örneğin, *Aspergillus oryzae* asit, nötral ve alkale proteazları birlikte üretebilmektedir. Ayrıca fungal proteazlar pH 4-11 gibi geniş bir pH aralığında aktivite gösterirler. Bakteriyel kaynaklı enzimler ile karşılaştırıldıklarında bakteriyel enzimlerden daha düşük reaksiyon hızına ve daha düşük bir sıcaklık toleransına sahiptirler. Fungal asit proteazlar pH 4.0-4.5 arasında optimuma sahiptirler, pH 2.5-6.0 arasında kararlıdır. Özellikle peynir endüstrisinde dar pH ve sıcaklık spesifitesinden dolayı kullanılırlar. Fungal nötral proteazlar, pH 7.0' de aktifler ve şelatlayıcı ajanlar tarafından inhibe olurlar. Protein hidrolizatlarının acılığının azaltılmasında kullanılmaktadırlar [4].

Viral proteazlar, AIDS ve kanser gibi hastalıkların çoğalması ve bu hastalıklara neden olan virüs proteinlerinin fonksiyonlarının araştırılması nedeniyle giderek önem kazanmaktadır. Pek çok virüste serin, aspartik ve sistein peptidaz bulunmaktadır. Virüs kodlu tüm peptidazlar endopeptidaz ailesindedir. Yapılan araştırmalar bu hastalıkların yayılmasını ve öldürücü etkisini engellemek amacıyla etkili inhibitörlerin dizaynını sağlayabilmek için viral proteazların üç boyutlu yapısı ve bunların sentetik inhibitörlerle etkisi üzerine odaklanmıştır [28].

Bakteriyel proteazlar; genellikle ekstraselüler, kolaylıkla büyük miktarlarda üretilen, termostabil ve yüksek pH aralıklarında da aktif olan enzimlerdir. Bu özellikleri bakteriyel proteazları daha geniş endüstriyel uygulamalar için elverişli yapar [29]. Bu nedenle özellikle *Bacillus* türlerinden elde edilen mikrobiyal proteazlar, deterjan formülasyonlarındaki büyük uygulamalarıyla en sık kullanılan endüstriyel enzimlerdir [30, 31]. Bakteri orijinli proteazlar, başlıca nötral ve alkale olmak üzere ticari proteazların çoğu *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilmektedirler. Bakteriyel nötral proteazlar, pH 5-8 arasında, düşük sıcaklıklarda aktifler ve bağıl olarak düşük sıcaklık toleransına sahiptirler. Gıdaları hidrolizlediklerinde oluşan hidrolizatlarda daha az acı tat oluşturdıklarından gıda endüstrisinde hayvansal proteazlara göre daha çok tercih edilmektedirler. Sahip oldukları düşük termotoleransları gıda hidrolizatlarının üretimi sırasında reaktivitelerinin kontrolü için avantajlıdır [4].

### 1.1.7. Mikrobiyal Proteazların Endüstride Kullanım Alanları

Proteaz enzimi günümüzde en önemli enzimlerden bir tanesidir. Proteazlar endüstriyel enzimlerin üç büyük grubundan birini temsil eder ve dünya çapındaki toplam enzim satışının yaklaşık %60'ını oluşturarak endüstriyel enzim marketinde büyük bir hakimiyete sahiptirler [4]. Proteaz enzimi deri, gıda, tekstil, ilaç, deterjan sanayisi, fotoğrafçılık, geri dönüşüm, organik atıklar gibi birçok kullanım alanı bulunmaktadır.

Günümüzde deterjanlarda proteaz enzimi kullanımı tercih edilme sebepleri, yıkama sıcaklığından bağımsız olarak kirleri çıkarabilme kapasiteleridir. Bunlar için kullanılan deterjan enzimleri değişik özellikli enzimlerdir ve bunların arasında proteazlar yüksek oranda kullanılmaktadır. Özellikle bakteriyel proteazlar deterjan endüstrisindeki uygulamalarda büyük bir hâkimiyete sahiptir. Çamaşır deterjanlarında ilk kullanılan enzim de yine proteaz enzimleridir [32].

Çevresel amaçlarla deterjanlardan fosfatların çıkarılması ve deterjan raf ömrü boyunca içine ilave edilen bakteriyel proteazların kararlı olması için gereken şartlar, deterjanların genel oluşumunda büyük bir değişime neden olmuştur. Sıcak yıkamalar için formüle edilmiş olan deterjanlar, sodyum fosfat ve yüksek ısılarda (60 °C üzeri) aktif hale gelen bir beyazlatma maddesi sodyum perborat içermektedirler, fosfat 43 kirlenmesini azaltmak için ortaya çıkan çevresel baskılar ve polyester kumaşların kullanımının artması nedeniyle bakteriyel enzimlerin kullanımı artmıştır. Enzimler düşük fosfat içeriğine sahip, ılık ve soğuk yıkama ısıları için formüle edilmiş olan deterjanların, önemli bir bileşiği haline gelmiştir. Günümüzde deterjanlarda kullanılan enzimlerin market payının büyük bir kısmı *subtilisin* ve/veya *Bacillus sp.*'den elde edilen alkalın proteazların egemenliğindedir. Enzimlerin kullanımı yıkama verimini artırmanın yanında daha düşük ısılarda ve daha düşük sürelerde temizliğin sağlanmasına olanak sağlayarak çamaşırların yıpranmasının da önüne geçmektedir [33, 34].

Deri endüstrisinde bakteriyel proteazlar, derinin kollajen olmayan yapılarının seçimli hidrolizinde, globulinler ve albuminler gibi fibril yapıda olmayan proteinlerin uzaklaştırılmasında, deriden kılların ayrılmasında ve derinin yumuşatılmasında

kullanılmaktadır. Proteazlar, hayvan postlarını deriye dönüştürmede ıslatma, kireçleme, kıldan arındırma, yünden arındırma ve ayırma aşamalarında sıklıkla kullanılmakta ve yapılan araştırmalara göre kimyasal maddelere göre daha yüksek aktivite göstermektedirler. Geleneksel sama işlemleri, deri üretim proseslerinden kireç giderme işlemi sonrasında alkali proteazların kullanımı ile gerçekleştirilmektedir [35].

Proteaz enzimleri ilaç endüstrisinde geniş uygulama alanına sahiptir. Vücuttaki çeşitli ihtiyaçları gidermek veya eksik enzim ihtiyacını karşılamak için enzim takviyeleri üretilmektedir. Sindirim sistemini desteklemek için üretilen ilaçlarda proteazlar kullanılmaktadır [4].

Kozmetik endüstrisinde kozmetikte saç bakımı ürünlerinde, diş macunlarında, istenmeyen tüylerin yok edilmesini sağlayan ürünlerde ve kontak lens solüsyonlarında kullanılmaktadır.

Gıda endüstrisinde proteaz enzimleri geniş bir alanda pay sahibidir. Soya fasulyesi zengin içerikli proteinlerinden dolayı gıda endüstrisi için zengin bir kaynak oluşturmaktadır. Soya sosu ve soya ürünleri eldesinde proteazlar çok eski çağlardan beri kullanılmaktadır. Soya sosu oluşturmada proteaz enzimleri en çok tercih edilen enzimlerdir. Soya proteinlerinin proteolitik modifikasyonu fonksiyonel özelliklerini arttırmaya yardımcı olmaktadır. Soya proteinlerinin pH 8'de alkalaz ile muamelesi ile daha az acı olan yüksek çözünürlüğe sahip protein hidrolizatlarının oluşumu sağlanır. Oluşan hidrolizatlar birçok amaç için gıda endüstrisinde ve sert olamayan içeceklerde kullanılmaktadırlar [36].

Süt teknolojisinde önemli bir kaynaktır. Süt endüstrisinde proteazların en büyük uygulaması peynir üretimindedir. Proteaz enzimi peynir üretiminde sütün kesilmesi veya pıhtılaşması için kullanılmaktadır. Günümüzde peynirlerin hızlı olgunlaştırılmasında; lipaz, proteaz ve  $\beta$ -galaktosidaz enzimleri ayrı ayrı veya kombinasyonlar halinde başarı ile kullanılmaktadır. *Bacillus subtilis*'den elde edilen fungal bir proteaz olan nötraz'ın cheddar peynirinin tekstürünü bozarak benekli ve zayıf bir bünye ile acı bir tat geliştirdiği, cheddar peynirinde nötraz'ın az bir miktarının lezzeti geliştirdiği, yüksek dozların ise acı tat oluşturduğu ve peynirin yapısını bozduğu belirlenmiştir. İsveç peynirinde nötraz'ın tek başına kullanıldığı zaman acı tat

ortaya çıktığı, ancak *Lactobacillus helveticus* ile birlikte ilave edildiğinde bu etkinin *Lactobacillus helveticus* tarafından absorbe edildiği ve suda eriyebilir protein oranında arttığı belirtilmiştir. Peynirlerin hızlı olgunlaştırılmasında proteazlar içinde en uygun olanının nötral proteazlar olduğu, asit proteazların acı çeşni geliştirmeleri nedeniyle istenmeyen ve fazla kullanılmayan proteaz grubunu oluşturduğu belirlenmiştir [37].

Tekstil endüstrisinde ipek elde edilmesinde serisin; ham ipeğin toplam ağırlığının % 25'ini oluşturan, ham ipek iplikleri kaplayan ve ipliklerin pürüzlü bir yapıya sahip olmalarına sebep olan yapışkan bir maddedir. Serisin ipliklerden konvensiyonel olarak nişasta kullanılarak uzaklaştırılır. Ancak bu yöntem oldukça maliyetlidir. Bu işleme alternatif yöntem proteazların uygulanmasıdır. Proteazlar ile serisinin uzaklaştırılması maliyeti ve işlem süresi azalmaktadır [36].

Alkalin proteazlar X-ışını ya da fotoğraf filmlerden gümüş geri kazanımında kullanılmaktadır. Atık filmlerin jelatin tabakalarının ağırlıklarının %1,5–2'sini gümüş oluşturmaktadır. Gümüş, jelatin ile bağ yapabildiğinden proteolitik uygulamalarla geri kazanılabilmektedir. Jelatinin enzimatik hidrolizi ile sadece gümüş geri kazanılmış olmaya aynı zamanda polyster filmlerin de geri dönüşümü sağlanmış olur [30].

Yapılan bir çalışmada *Rhizopus oryzae* izolatından alkali proteaz elde etmek için kültür koşullarını optimize edilmiştir. Çalışmada, organik ve inorganik azot kaynakları, metal iyonları, surfaktanlar ve mantar öldürücü ilaçların proteaz üretimi ve ürünleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Organik azot kaynaklarının proteaz üretimini olumlu etkilediği saptanmıştır. Ekonomik boyut gözetilerek endüstriyel proteaz üretimi için inorganik tuzlar tercih edilmiştir. İnorganik azot kaynağı olarak % 0,2 Sodyum nitrat çözeltisinin en etkili olduğu saptanmıştır [38].

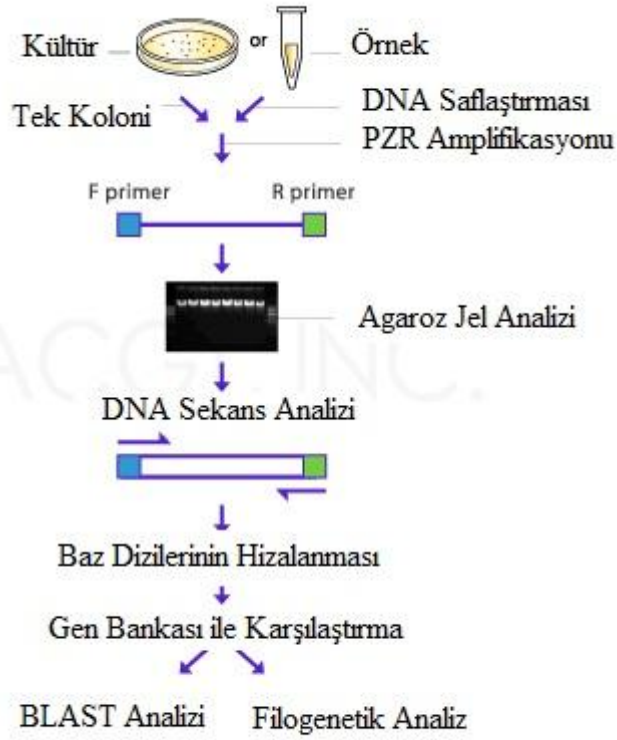
#### **1.1.8. 16S rDNA Dizi Analizi**

Günümüzde kullanılan mikrobiyal türlerin belirlenmesinde kültürün hangi bakterilerden oluştuğunu belirlemek amacıyla 16S rDNA genlerinin incelenmesine dayanan moleküler metotlar kullanılmaktadır. 16S rDNA gen dizisi, tüm canlılarda yüksek derecede korunmuşluk göstermektedir. Genomda bu rDNA bölgesi hem

bakteriye özgü çok iyi saklanmış dizileri içermekte, hem de türe göre değişken olan dizileri barındırmaktadır. Bu değişken diziler genellikle araştırmacılar tarafından heterojen fenotipe sahip veya konvensiyonel bakteriyolojik testlerle kültürü zor olan bakterilerin PZR ile tanısı için primer bölgelerinin tasarlanmasında kullanılmaktadır. 16S rDNA örneği birleştirilmiş zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması sayesinde tür tayini mümkün olabilmektedir [39].

16S rDNA kodlayan gen dizisinin özellikle bakteriler arasındaki akrabalık ilişkilerinin çıkarılmasında kullanımı oldukça yaygındır. Bu evrensel molekülün taşıdığı nükleotit dizileri, filogenetik gruplar arasında gösterdiği benzerliklere göre, evrimsel yakınlığın bulunmasında etkin rol oynamaktadır. Günümüzde bilinmeyen bir bakterinin cins hatta tür seviyesine kadar tanımlanabilmesi 16S rDNA geni sayesinde mümkün olabilmektedir [40].

Sekans analizi, etken DNA'nın belirli bir bölgesinin nükleotid dizilerinin bulunmasında geliştirilen bir tekniktir. DNA dizi analizi, bir ucu aynı olan ve bir nükleotid farkı ile uzunlukları değişen oligonükleotidleri ayırabilme tekniğine dayanır [41]. Bir oligonükleotidi dizilemek için iki farklı yöntem geliştirilmiştir. Sanger ve arkadaşlarının [41] geliştirdikleri yöntemde, DNA nükleotid dizisinin belirlenmesi için enzimatik teknikler ve sentezin 2,3-dideoksinükleotid trifosfatlar (ddNTP) kullanılarak belli bazlar'da sonlandırılması prensibine dayanır. Buna karşılık Maxam ve Gilbert ise kimyasal bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu teknikte kullanılan kimyasal maddeler oldukça toksik maddelerdir. Ayırım gücü yüksek, fakat uygulama kolaylığı olmayan ve değerlendirme aşaması son derece uzun bir yöntemdir [42] (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. 16S rDNA Sekans Analizi [43]

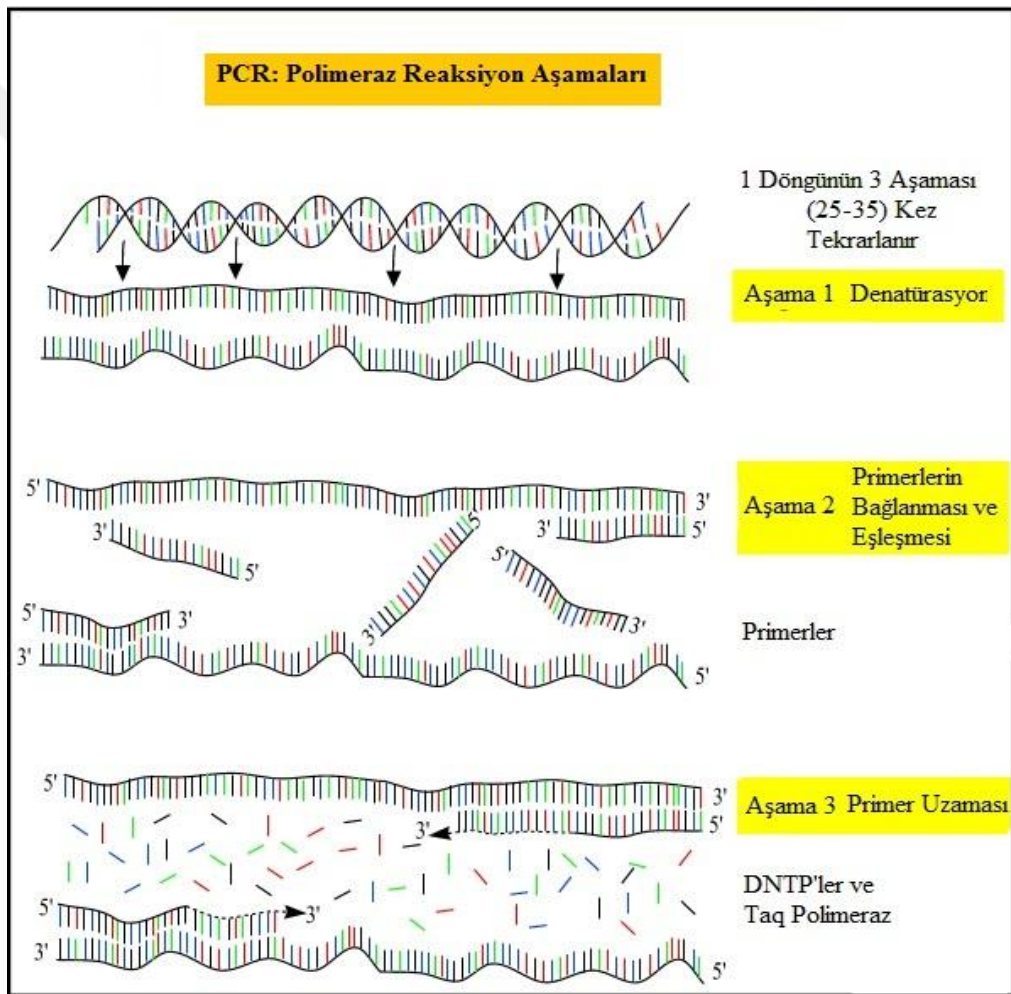
### 1.1.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Belirli bir nükleik asit dizisinin in vitro şartlarda, enzimatik olarak çoğaltılma işlemi olan PZR ilk kez 1983 yılında Kary Mullis tarafından tanımlanmıştır. PZR, bakterilerin moleküler düzeyde tanımlanması için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Uygulaması kolay ve çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamasıdır [44].

PZR tekniği bir bakteriye ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin primerler aracılığı ile amplifikasyonunu gerçekleştiren in vitro DNA sentezi yöntemidir. PZR ile tüp içerisinde DNA replikasyonu taklit olarak gerçekleştirilmektedir. PZR tekniğinde replikasyonun başlaması için gerekli olan iki DNA zincirinin birbirlerinden ayrılması, ortam sıcaklığının 94°C'ye kadar yükseltilebilmesi ve böylece iki zincir arasındaki hidrojen bağlarının kırılması ile gerçekleştirilebilmektedir.



Taq DNA polimeraz enzimi *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilmektedir. Bu bakteri kaplıca veya jeotermal bölgelerde yaşar. Bu Enzim yüksek sıcaklıklara dayanıklı olması sebebi ile tercih edilmektedir. PZR için belirlenen nükleik asit kısmının her bir zincirinin 3' ucuna tutunacak ve 5' yönünde uzayacak iki kısa nükleotid dizisi (primer), uzamayı sağlayacak olan DNA polimeraz enzimi, yeni zincirlerin yapısında yer alacak oligonükleotidler, reaksiyon için gerekli tuzu içeren tampon solüsyonlar ve reaksiyonun gerçekleşmesi için Taq DNA polimeraz enzimine ihtiyacı vardır [44, 45] (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. PZR Aşamaları [46]

PZR'de 3 basamak bir döngüyü oluşturur. Bu döngü 25-35 kez tekrarlanır ve her tekrar sayısında iki primer arasında kalan DNA parçasının, her iki zincirinden de birer kopyası çıkartılmış olur. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülmektedir [47].

#### **1.1.10. 16S rDNA Analizinin Avantajları ve Dezavantajları**

Tüm bakterilerde ortak genlerin bulunması bilinen bir gerçektir ve bu genlerin baz dizilerinde türden türe değişen farklı kısımlar bulunur. 16S rDNA molekülü yaşayan tüm canlılarda bulunmaktadır ve evrim süreci boyunca korunmuştur. Bu özellik organizmaların karşılaştırılmasına, hatta aynı türdeki farklılaşmaların (strain) tespitine imkân vermektedir. Dahası gen dizilimi ile ilave istatistikî olarak ilgili verilerin elde edilmesi mümkün olabilmektedir [48]. Tüm organizmalarda çok miktarda bulunan ribozomların üretilmesinden sorumlu 16S ve 23S rRNA genleri moleküler teknikler yardımıyla yapılan araştırmalarda en çok tercih edilen genlerdir. Bununla birlikte, pek çok mikroorganizmanın 16S rDNA geninin dizi analizi bilgilerini içeren ve günden güne genişleyen bir veri gen bankasının bulunması da bu geni hedef alan moleküler tekniklerin kullanım alanının artmasını sağlamıştır [49]. 16S rDNA dizini bilinmeyen bakterilerin tanımlanmasında dünyada geniş bir yelpazede uygulanan bir biyo belirleyicidir. Ayrıca farklı 16S gen dizilimi olan organizmaların istatistiki olarak karşılaştırılmasına da olanak sağlar. Buna rağmen nispeten pahalı olabilir, hassas çalışma gerekir ve sekans lama sonucunda türler arası yüksek benzerlik çıkabilmektedir [50].

#### **1.1.11. Bu Tez Çalışmasının Amacı**

- 1- Kırıkkale- Keskin ilindeki mağaradan alınan örneklerin izole edilmesi ve saflaştırılması,
- 2- İzole edilen bakterilerin proteaz üretim yeteneklerinin belirlenmesi ve moleküler teknikler kullanılarak tanımlanması,
- 3- Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, proteaz üreticisi bakterilerin üretimi ve kapasitelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2. 1. MATERYAL

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizmalar, ülkemizin Kırıkkale ili Keskin ilçesinde bulunan bir mağaranın yarasaların yoğun olarak yaşadığı bölgelerin toprak kısmında çeşitli derinliklerde örnekler alınmıştır. Yapılan izolasyon çalışmaları ile mikroorganizmalar saf olarak elde edilmiştir. Bu mikroorganizmalar içeriği farklı ortamlarda üretilerek en yüksek enzim üretim aktivitesine ulaşılmaya çalışılmıştır.

#### 2.1.1. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

##### 2.1.1.1. NaOH Çözeltisi ( 2 N NaOH Çözeltisi )

Besiyerlerinin pH'ının ayarlanmasında 2 N NaOH tampon çözeltisi kullanılmıştır.

##### 2.1.1.2. Sodyum Fosfat Tamponu

Proteaz enziminin pH 7.0' deki aktivitesinin ölçülmesinde kullanılmıştır. 6.77g  $K_2HPO_4$  1 L distile su içerisinde çözülmüştür (A çözeltisi). 8.85g  $Na_2HPO_4$  1L distile su içerisinde çözülmüştür (B çözeltisi). A çözeltisinden 413 ml ve B çözeltisinden 587 mL alınarak karıştırılarak elde edilmiştir [51].

##### 2.1.1.3. $Na_2CO_3$ Çözeltisi ( % 10' luk $Na_2CO_3$ Çözeltisi )

Kullanılan besiyerlerinin ve tampon çözeltilerin pH 7.0, 8.0, 9.0 ve pH 10.0' a ayarlanmasında kullanılmıştır.

$Na_2CO_3$	10g	
Distile su	100 mL	karıştırılarak hazırlanmıştır.

#### 2.1.1.4. HCl Çözeltisi ( 0.1 M HCl Çözeltisi )

Besiyerleri ve tampon çözeltilerin pH değerinin yüksek değerlerden istenilen düşük değerlere düşürülmesinde kullanılmıştır.

HCl	3.6 g	
Distile su	1000 mL	karıştırılarak elde edilmiştir.

#### 2.1.1.5. Serum Fizyolojik Çözeltisi

Toprak örneklerinin dilüsyon aşamasında ve spektrofotometrede örneklerin optik yoğunlukları (OD) ölçülürken bir standart elde etmek için kullanılmıştır.

NaCl	9g	
Distile su	1000 mL	karışımından elde edilmiştir.

#### 2.1.2. Proteaz Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

##### 2.1.2.1. Glisin – NaOH Tamponu ( 50 mM Glisin – NaOH Tamponu )

Proteaz enziminin pH 9.0 – pH 12.0 aralığındaki aktivitesinin saptanması için kullanılmıştır [51, 52].

50 mM Glisin	0.375 g	
1 N NaOH	8.4 g	
Distile su	100 mL	

Öncelikle 50 mM Glisin 90 mL distile su içerisinde çözünmüştür. İstenilen pH değeri 1 N'lik NaOH çözeltisi ayarlanıp, hacmi 100 mL' ye gelecek şekilde distile su eklenmiştir.

### **2.1.2.2. Sodyum Karbonat Tamponu ( 0.5 M Sodyum Karbonat Tamponu )**

Proteaz enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılmıştır [52].

0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>            5.3 g

Distile su                    100 mL

100 mL distile su içerisinde 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> karıştırılarak hazırlanmıştır.

### **2.1.2.3. TCA ( Trichloro asetic asit ) Çözeltisi**

Enzim ve substrat çözeltilerinde reaksiyonu durdurmak için kullanılmıştır [52].

TCA ( 0.1 M )                    1.633 g / 100 mL

Sodyum Asetat ( 0.22 M )        2.993 g / 100 mL

Asetik Asit ( 0.33 M )            1.891 mL / 100 mL

Distile su                        98 mL

0.1 M TCA ile 0.22 M sodyum asetat 98 mL distile su içinde çözülmüş ve son hacim 100 mL olana kadar 0.33 M asetik asit ilave edilmiştir.

### **2.1.2.4. Folin Reaktifi ( 2 N Folin Reaktifi )**

1:1 oranında olacak şekilde distile su ve folin reaktifi karıştırılarak elde edilmiştir [52].

### **2.1.3. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler**

#### **2.1.3.1. Tris / EDTA Tamponu(250mL)**

0.3 g Tris ve 0.008 g EDTA tartılarak 250 mL distile suyla (pH 8.0) tamamlanmıştır.

#### **2.1.3.2. % 10'luk SDS Tamponu (100mL)**

10 g SDS tartılarak 100 mL distile suda çözülmüştür.

#### **2.1.3.3. Proteinaz-K'nın Hazırlanması (10mL)**

0.0384 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  tartılarak 5 mL gliserol ve 100  $\mu$ L 1M Tris-HCl (Ph 8.0 ) ile çözülmüştür. Son hacim 10 mL oluncaya kadar distile su konmuştur. Hazırlanan bu çözeltiden 10 mL alınarak 100 mg proteinaz-K çözülmüştür.

#### **2.1.3.4. NaCl Tamponu (5M, 100 mL)**

20 g NaCl tartılarak, 100 mL distile su ile çözülmüştür.

#### **2.1.3.5. CTAB/NaCl Tamponu (100 mL)**

4.1 g NaCl tartılarak 90 mL distile suda çözülmüştür ve 10 g CTAB yavaşça solüsyona eklenerek 65°C' ye kadar ısıtılmıştır. Son hacim 100 mL oluncaya kadar distile su ile tamamlanmıştır.

#### **2.1.3.6. Kloroform / İzoamil Alkol Tamponu ( 100 mL)**

96 mL kloroform 4 mL izoamil alkol ile karıştırılarak 100 mL tampon hazırlanmıştır.

#### **2.1.3.7. Kloroform / İzoamil Alkol / Fenol Tamponu (100 mL)**

48mL kloroform 2mL izoamil alkol ve 50 mL Fenol ile karıştırılarak 100 mL tampon hazırlanmıştır.

#### **2.1.3.8. İzopropanol Alkol (100 mL)**

İzopropanol alkolden 100 mL alınarak Kromozomal DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

#### **2.1.3.9. %70'lik Etil Alkol (100 mL)**

70 mL %100' lük etil alkol ile 30 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

#### **2.1.3.10. Tris- HCl Tamponu ( 50 mM, 100 mL)**

0.78 Tris-HCl tartılarak 50 mL steril suda çözünüp pH: 8.0 ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL oluncaya kadar steril su ile tamamlanmıştır.

#### **2.1.3.11. Tris-HCl Tamponu (1 M, 100 mL)**

0.12 g Tris-HCl tartılarak 100 mL distile suyla karıştırılmıştır.

### 2.1.3.12. Elektroforez Tamponu ( 50x TAE ) Hazırlanması

242 g Tris, 37.2 g  $NA_2EDTA.2H_2O$  tartılarak 57.1 mL glasiyel asetik asit ile çözülmüştür. Son hacim 1000 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

### 2.1.3.14. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Suşların Tanımlanmasında Kullanılan Primerler ve Özellikleri

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan primerler ve özellikleri

Primer Dizi(5'-3')	Özellik	Tm(°C)	Referans
27F AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Öbakteriyal, düz	48	[53]
1492R ACCTTGTTACGACTT	Üniversal, ters	43	[54]

### 2.1.4. Kullanılan Besiyerleri

#### 2.1.4.1. Nutrient Broth ( MERCK 1.05443 )

Proteaz enzim aktivitesinin belirlenme işlemlerinde ve DNA izolasyonu aşamalarında mikroorganizmaların aktifleştirilmesi için kullanılmıştır.

#### Bileşimi                      g / lt

Pepton                              5

Et Özütü                            3

Hazırlanan besiyeri çalışmada 121°C 1.0 Atm basınçta otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır.



#### **2.1.4.2. Nutrient Agar ( MERCK 1.05450 )**

Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların petriker halinde stok kültür olarak saklanması için kullanılmıştır.

<b><u>Bileşimi</u></b>	<b><u>g / lt</u></b>
Pepton	5
Et Özü	3
Agar	12

Hazırlanan besiyeri çalışmada 121°C 1.0 Atm basınçta otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır.

#### **2.1.4.3. N1 Agar**

Çalışmadaki mikroorganizmaların yatık olarak stok kültür halinde saklanması için kullanılmıştır [55].

<b><u>Bileşimi</u></b>	<b><u>g / lt</u></b>
Pepton	10
Et Özü	10
Maya Özü	5
Glikoz	1
Agar	15

Hazırlanan besiyeri çalışmada 121°C 1.0 Atm basınçta otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır.

#### **2.1.4.4. Skimmilk Besiyeri**

Mikroorganizmaların proteaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır [56]. Singh ve arkadaşlarının belirlediği besiyeri çalışmada modifiye edilerek kullanılmıştır.

<b><u>Bileşimi</u></b>	<b><u>g / lt</u></b>
Pepton	10
Et Özütü	3
NaCl	5
Skimmilk	11
Agar	15

İstenilen pH'a ayarlanarak steril edilmiş besiyerine ayrı olarak steril edilmiş olan skimmilk eklenmiştir.

#### **2.1.4.5. Uygun Enzim Üretim Besiyeri**

Çalışmada mikroorganizmaların en yüksek proteaz üretiminin sağlandığı enzim besiyeri modifiye edilerek kullanılmıştır.

<b><u>Bileşimi</u></b>	<b><u>g / lt</u></b>
Pepton	10
Maya Özütü	0.2
Glikoz	1
MgSO <sub>4</sub>	0.1
CaCl <sub>2</sub>	0.1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5

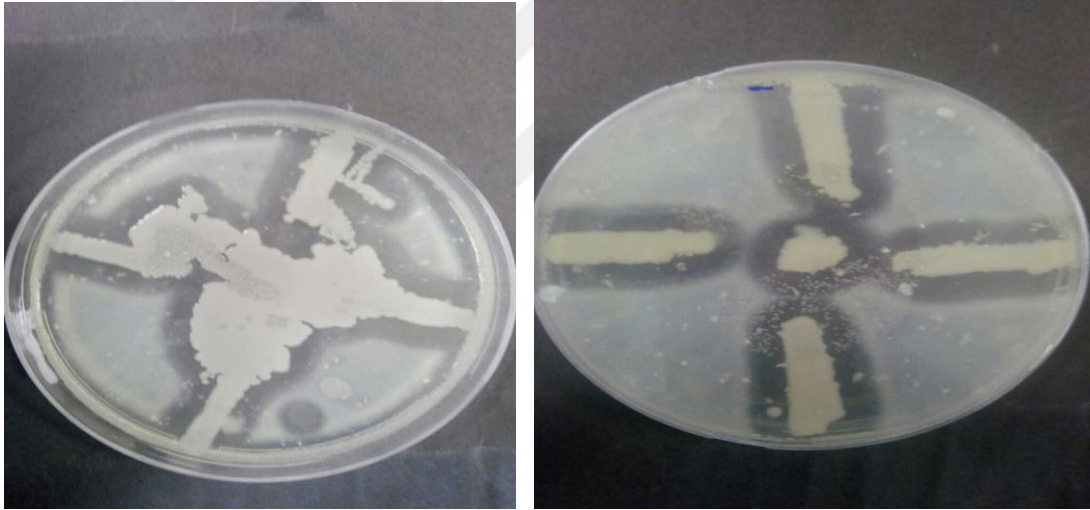
Denizci ve arkadaşlarının belirlemiş olduğu enzim besiyerine 5g kazein ilave edilerek modifiye yapılmış olarak kullanılmıştır. Hazırlanan enzim besiyerinin pH'ı ayarlanmış ve 121°C 1.0 Atm basınçta otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır [52].

## 2.2. METOD

### 2.2.1. Bakterilerin İzolasyonu

Alınan iki örnek için ayrı ayrı olarak seri sulandırma yapılarak dilüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Toprak örneklerinden 1'er g tartılıp 10 mL içerisinde serum fizyolojik bulunan tüplere konulmuş ve vorteks cihazı ile karışmaları sağlanmıştır[57].

İnkübasyon işlemi sonrasında örneklerden  $10^{-1}$  -  $10^{-6}$  olmak üzere seri dilüsyonlar yapılmış ve örneklerden 0.1 ml pipet ile alınarak petrilere eklenmiştir. Drigalski spatülü yardımıyla yayma yöntemine göre ekim yapılmıştır[51]. Ekim işlemi bitirdikten sonra petrilere  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 18 saat süre ile etüve konulmuştur.



**Şekil 2.1.** Skim Milk Agar besiyerinde izolatlarının proteolitik zonları

### 2.2.2. Bakteri Üreme Eğrisinin Belirlenmesi

Her bir örnek için taze kültürlerinden 100  $\mu\text{L}$  alınarak NB besi ortamına ekimi yapılmıştır. Bakteriyi üretmek için hazırlanan besi yerlerine ekilen bakteriler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Bakterilerin inkübasyonu sırasında 6, 24, 32, 48, 56 ve 72 saatlerde üremeye bakılmıştır. Mcfarland yöntemi esas alınarak başlangıçtaki bakteri sayısını sabitlemek için steril olarak hazırlanan serum fizyolojik ile optik yoğunlukları

(OD) 0.3 – 0.4 aralığına ayarlanmıştır. 6, 24, 32, 48, 56, 72. saatlerde örnek alınarak spektrofotometrede optik yoğunlukları ölçülerek bakterilerin gösterdikleri üreme miktarı belirlenmiştir. Buna göre elde edilen değerler ile üreme eğrileri oluşturulmuştur.

### **2.2.3. Proteaz Pozitif Bakterilerin Belirlenmesi**

18 saatlik inkübasyon işleminin sonunda koloniler etrafında oluşan zonlar tespit edilmiştir. Bu koloniler proteaz pozitif olarak seçilmiş ve bu çalışmada kullanılmıştır [59]. Proteaz pozitif olan koloniler tek koloni ekim yöntemine göre N1 agar besiyerine ekilerek daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere saf kültür şeklinde +4°C’de saklanmıştır [55].

### **2.2.4. İzolatların Ekstraselüler Proteaz Enzim Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi**

Enzimi üreten izolatlar proteaz üretimi için 3.1.4.4. de anlatılan besiyerine ekimi yapılarak 24, 48, 72 saat süresince sıvı besiyerinde 15°C, 25°C, 37°C, 50°C sıcaklıklarında pH 7.0, 9.0, 10.0 12.0 aralıklarında çalkalamalı inkübatöre bırakılarak üretildi [60].

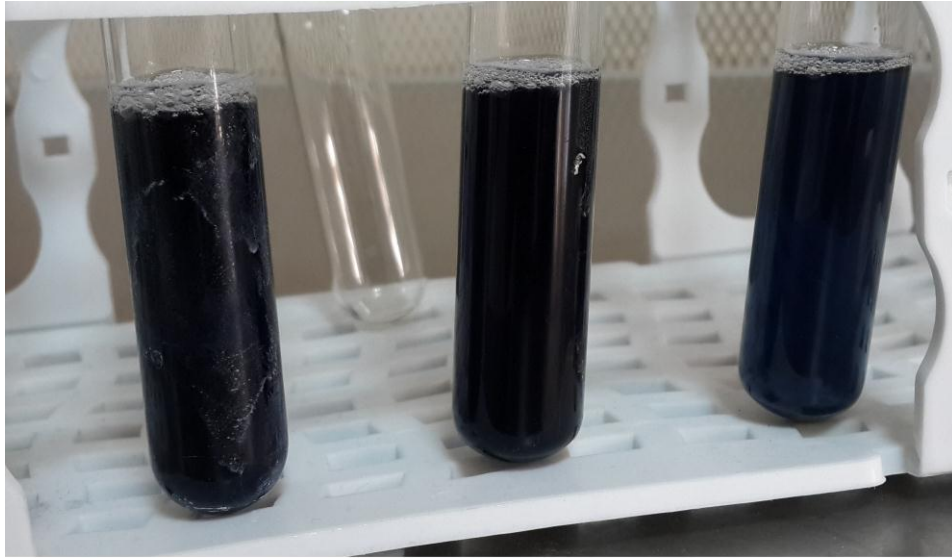
### **2.2.5. Proteaz Üretimi**

Stok kültür halinde N1 agarda sakladığımız bakteriler steril öze ile alınarak 250 mL’lik içerisinde 100 mL Nutrient Broth besiyeri bulunan erlenlere aşılama yapılmıştır ve 37°C 150 devir/dk çalkalama hızına ayarlanmış etüve inkübasyon işlemi için 18 saat süre ile konulmuştur.

Örneklerin proteaz aktivitesi belirlenirken 24, 48, 72 saat aralıklarında Proteaz Üretim ortamında inkübasyona bırakılan bakteriler, süre sonunda soğutmalı santrifuj cihazında 6000 rpm de 15 dak. çöktürülme işlemine tabi tutulmuştur. Üretim

ortamından alınan örnekler yerine, aynı miktarda taze besiyeri, steril şartlarda üretim ortamına eklenmiştir. Bu işlem sonunda üst sıvı ve çöken pelet birbirinden ayrılıp, üst sıvı (süpernatant) miktarı ölçülerek aktivite belirlemek amacıyla buzdolabında korunmaya alınmıştır. 0,5 ml süpernatant çözeltisi 50 mM Glisin-NaOH tamponunda hazırlanan %0,6'lık kazein çözeltisinin 2,5 mL'si ile muamele edilerek su banyosunda 36°C'de 20 dak. inkübasyona bırakılmıştır [60].

İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak amacı ile reaksiyon ortamına 2,5 mL trikloroasetik asit çözeltisi (TCA) (0,11 M trikloroasetik asit, 0,22 M sodyum asetat, 0,33M asetik asit) ilave edildikten sonra su banyosunda 30°C'de 30 dak. inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra karışım kurutma kâğıdı ile süzümüştür. İçerisinden 0,5 mL alınmış ve bu süzüntünün üzerine 0,5 M 2,5 mL sodyum karbonat çözeltisi ilave edilmiş ve karışıma saf su ile ½ oranında seyreltilmiş 0,5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilerek karışım 30 dak. oda sıcaklığında bekletilmiştir. (Folin reaktifinin ilavesi ile ortam asidik olduğundan; (fosfomolibdat ve tungstat içeriğinden dolayı) sodyum karbonat ilavesi reaksiyon ortamının pH'nın yeniden 10 civarına çekilmesi için gereklidir.) 30 dakikalık bu süre sonunda çözeltinin optik yoğunluğu, enzim aktivitesinin belirlenmesi için 660 nm'de köre karşı okunmuştur [52, 61]. Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.2.** Folin reaktifi sonrası görüntüsü

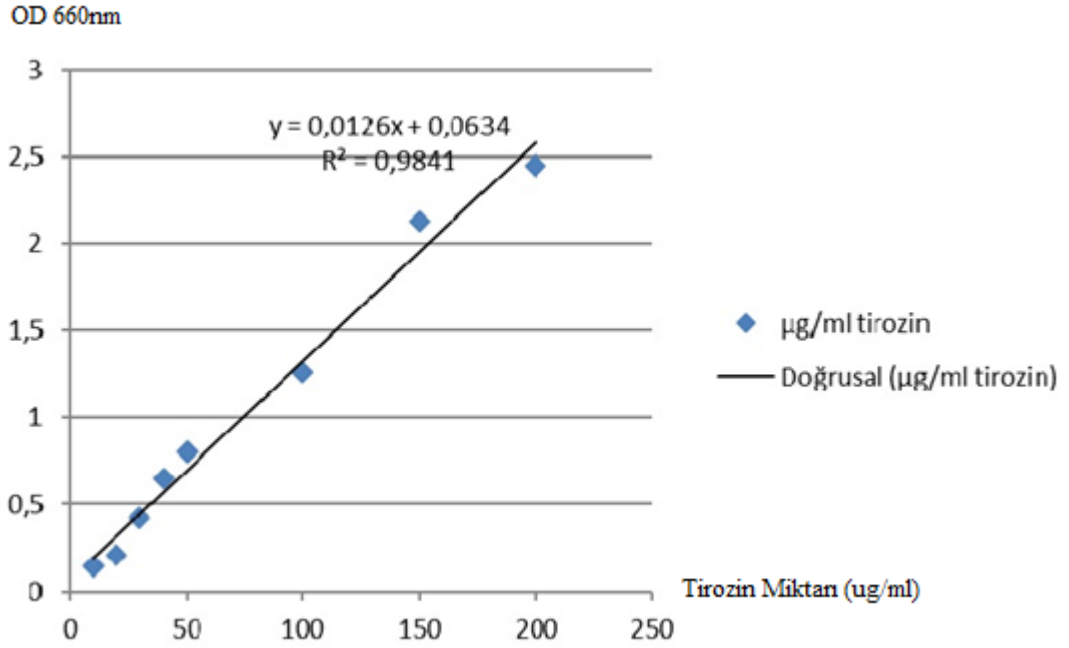
### 2.2.6. Proteaz Aktivite Tayini

Protein aktivitesi tayini [52] metoduna göre yapılmıştır. Enzim aktivitesi önceden oluşturulmuş tirozin standart grafiğinin eğimi kullanılarak, aşağıdaki formülde belirtildiği gibi hesaplanmıştır. Bir ünite (U/ml) enzim aktivitesi, dakikada 1 µg tirozinin ortaya çıkması için gerekli enzim miktarı olarak belirtilmiştir [60].

$$\text{Enzim Aktivitesi} \frac{U(ml)}{dk} = \frac{\frac{OD}{Eğim} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times \text{Toplam Hacim (ml)}}{\text{Enzim Hacmi (ml)} \times \text{İnkübasyon Süresi (dk)}}$$

### 2.2.7. Tirozin Standart Grafiğinin Oluşturulması

Tirozin standart grafiği proteaz aktivitesi hesaplamasında kullanılmak üzere 100 mM pH 8,5 Tris-HCl tamponu ile 1 mg/mL tirozin çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden tüplere 10, 20, 30, 40, 50 µl hacimlerde alınıp son hacim 100 mM pH 8,5 Tris-HCl tamponu ile 0,5 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra 2,5 mL 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 0,5 mL folin reaktifi ilave edildi ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilip spektrofotometrede 660 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Kör olarak 0 µg/mL tirozin içeren 100 mM pH 8,5 Tris-HCl tamponu kullanılmış ve elde edilen sonuçlara göre 660 nm'deki absorbans değerinde meydana gelen değişimi gösteren tirozin standart grafiği çizilmiştir. Çizilen tirozin standart grafiğindeki doğrunun eğimi belirlenerek alkalın proteaz aktivitesinin hesaplanmasında kullanılmıştır [34] (Şekil 2.3.).



**Şekil 2.3.** Tirozin Standart Grafiği

### 2.2.8. Seçilen İzolatların Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi amacıyla gram boyama, katalaz testi, oksidaz testi ve IMViC testi uygulanmıştır.

#### 2.2.8.1. Gram Boyama

Gram boyama işlemi [62]'in belirlediği yönteme göre yapılmıştır. Bu metoda göre bakterilerin 24 saatlik genç kültürlerinden, steril öze ile alınarak 1 damla distile su ile yayma preparat hazırlanmış ve preparatlar havada kurutmaya bırakılmıştır. Kuruma tamamlandıktan sonra 3 defa alevden geçirilerek tespit işlemi yapılmıştır. Daha sonra lamaların üzerine mikrobiyal film tabakasını kaplayacak şekilde, bol miktarda kristal viyole damlatılarak 1 dakika bekletilmiştir. Kristal viyole yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra lamaların üzerine lugol dökülerek yine 1 dakika bekletilmiştir. Boya suyla uzaklaştırılmış ve lamalar %95' lik alkol ile 15 - 20 saniye yıkanmıştır.

Arındırılan film tabakasını üzerine safranin eklenerek 30 saniye bekletildikten sonra boya yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar, havada kurutularak immersiyon yağı ile 100X' likobjektifte, ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Koyu mor (menekşe renkli olan mikroorganizmalar Gram (+), açık pembe renkli olanlar ise Gram (-) olarak tanımlanmıştır.

#### **2.2.8.2. Katalaz Testi**

Katalaz testi mikroorganizmaların katalaz enzimi taşıyıp taşımadığının gösterilmesi amacıyla kullanılır. Bu enzimi taşıyanlar katalaz pozitif olarak adlandırılır. Yapılışında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> % 3 ' lük hazırlanıp örneğin üstüne 2 damla (%30 luk yoğun çözeltilen) koyulur [63]. Sonuçları yorumlarken hava kabarcıklarının oluşması pozitif sonuç verirken, hava kabarcığı oluşmaması veya 20 saniye sonradan oluşması negatif olarak yorumlanır.

#### **2.2.8.3. Oksidaz Testi**

Nutrient agarda saf kültürü hazırlanan izolat 60°C' de 120 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda saf kültür üzerine tetrametil-p-fenilendiaminin %0,5' lik çözeltilen ilave edilmiştir. 1-2 dakikalık bakleme süresi sonunda mavi renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir [64].

#### **2.2.8.4. IMVIC Test**

İndol, metilen kırmızısı, voges-prokauer ve sitrat testlerinden oluşmaktadır.



#### 2.2.8.4.1. İndol Test

İndol testi mikroorganizmaların triptofanaz enziminin varlığını tespit etmede kullanılır. Mikroorganizmalar sıvı besi yerine veya peptonlu sıvıya ekildikten sonra 37 °C de 1-5 gün inkubasyona bırakılır.

Kültürlerin üzerine kovacs ayıracından 0.5 mL ilave edilir ve iyice karıştırılır. Tüplerin üst kısmında bir iki dakika içinde kırmızı bir halkanın oluşması pozitif, sarımsı halka oluşması negatif indolun oluşmadığını gösterir [62, 65].

#### 2.2.8.4.2. Metil kırmızısı ve Voges-Proskauer (MR-VP) testleri

**Metil kırmızısı** testi glikozun fermentatif metobolize olması sonucu besi yerinde organik asitlerin meydana geldiğini ve pH'nın düştüğünü ortaya koymak için yapılır. Üremiş kültürden besiyerine ekimi yapılır ve tüpler 37 °C de 2-7 gün inkubasyona bırakılır. Üzerine metil kırmızısı solüsyonunun'dan 4-5 damla damlatılır ve iyice karıştırılır. Metil kırmızısı besi yerine damlatıldıktan sonra üstte kırmızı renkli bir halkanın meydana gelişi pozitif metil kırmızısı testi olarak kabul edilir.

**VP testi** ise bir bakterinin glikoz fermentasyonu ile nötral son ürünler meydana getirip getirmediğini saptamak için kullanılır. İçinde glikoz bulunan besi yerine kültürlerden ekilir ve 37°C de 2-7 gün inkube edilir. Bu sürenin sonunda kültürlerle ve ekilmemiş tüplere ayıraçtan (O'Meara) 1 mL ilave edilerek hafifçe çalkalanır ve su banyosunda (37°C de) 4 saat tutulur. Besiyerinin üstünde 2-5 dakika içinde pembe rengin oluşu, acetoin varlığını ortaya koyduğundan pozitif reaksiyon olarak kabul edilir. Eğer sarı renk meydana gelirse negatif olarak değerlendirilir [66, 67].

#### 2.2.8.4.3. Sitrat Testi

Bakterilerin karbon kaynağı olarak sitratı, azot kaynağı olarak da amonyum tuzlarını kullanabildiğini gösteren testtir. Test için saf kültürden Simons Sitrat besiyerine çizgi ekim yapılır. 24 saatlik enkübasyon sonucunda besiyerinin mavi/lacivert renk alması

testin pozitif sonuç verdiđini, yeşil olarak kalması da negatif sonuç verdiđini gösterir [68].

## **2.2.9. Proteaz Üretimi İçin En Uygun Koşulların Belirlenmesi**

### **2.2.9.1. İnkübasyon Sıcaklığının Proteaz Üretimini Belirlenmesi**

Proteaz pozitif olan bakteriler farklı pH aralıklarında hazırlanan katı skimmilk besiyerine ekimi yapılarak 15°C, 25°C, 37°C, 50°C 'ye ayarlanmış etüvlerde 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır [69].

### **2.2.9.2. İnkübasyon Süresinin Proteaz Üretimini Belirlenmesi**

Proteaz pozitif bakteriler farklı sıcaklık aralıklarında hazırlanan katı skimmilk besiyerine ekimi yapılarak 72 saatlik süre sonunda (24,48,72) proteaz pozitif olarak tanımladığımız bakterilerin üreyebilmesi ve en iyi enzim süresinin belirlenmesi tespit edilmiştir.

## **2.2.10. Üretilen Proteaz Enziminin Karakterizasyonu**

### **2.2.10.1. Proteaz Enziminin Optimum reaksiyon pH Aralıklarının Saptanması**

Proteaz pozitif olarak tanımladığımız bakterilerimizi pH 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 12.0 olarak ayarladığımız enzim besiyerine ekimi yapılmıştır. Daha sonra ekim işlemi bittikten sonra petrilere 37°C 24 saat süre ile inkübasyon için etüve konulmuştur. 24. saatin sonucunda proteaz pozitif olarak tanımladığımız bakterilerin üreyebilmesi ve en iyi enzim üretebilmesi için gerekli olan pH değeri tespit edilmiştir [70].

### **2.2.10.2. Proteaz Enziminin Optimum reaksiyon Süresinin Belirlenmesi**

Proteaz pozitif bakteriler farklı sıcaklık aralıklarında hazırlanan enzim besiyerine ekimi yapılarak 72 saatlik süre sonunda (24,48,72) proteaz pozitif olarak tanımladığımız bakterilerin üreyebilmesi ve en iyi enzim süresinin belirlenmesi tespit edilmiştir.

### **2.2.10.3. Proteaz Enziminin Optimum reaksiyon Sıcaklığının Belirlenmesi**

Proteaz pozitif olarak tanımladığımız bakterilerimizi enzim besiyerine ekimi yapılmıştır. Erlenlere hazırlanan besiyeri (15°C,25°C,37°C,50°C) sıcaklık aralıklarında ayarlanmıştır. Etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

### **2.2.11. Kromozomal DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini**

İzole edilen MH1 ve MB2 suşları Cutting ve Horn tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır.

İzole edilen MH1 ve MB2 suşlarının kromozomal DNA izolasyonu Cutting ve Horn tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır [71] [72]. 15 mL'lık kültür 5000 rpm 10 dak. Santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine 5.7 µL TE tamponu eklenmiştir ve çalkalanmıştır. Daha sonra 30 µL % 10 SDS, 30 µL proteinaz K ve 30 µL RNAaz eklenip 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 100 µL 5 M NACI eklenerek karıştırılmıştır. 800 µL CTAB/NACI tamponu karışımın üstüne eklenmiş 10 dak. 65°C sıcak su banyosunda bırakılmıştır. Aynı hacimde kloroform/izoamil alkol solüsyonu eklenerek 5 dak. 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı yeni tüpe alınarak eşit hacimde fenol/kloroform/izoamil alkol tamponu eklenerek 5 dak. 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine 5 mL % 70'lik etanol eklenmiş ve 10 dak. 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Son olarak etanol steril bir ortamda uzaklaştırılmıştır ve pellet üzerine 200 µL TE tamponu eklenmiş ve -20°C'de saklamıştır. İzolatlardan elde edilen genomik DNA'lar bütünlükleri bakımından agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir.

## 2.2.12. PZR ve Optimizasyonu

16S rDNA örneklerini amplifiye etmek için standart 16S rDNA gen sekansına (GenBank) göre sentezlenmiş olan iki evrensel oligonükleotid primer çifti, 27 F primer: '5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' [53] ve 1492 R primer: '5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' [54] kullanılmıştır. Primerlerin T<sub>m</sub> özellikleri ve literatür verileri baz alınarak bir PZR programı belirlenmiş ve bu program kullanılarak PZR reaksiyonun genomik DNA, MgCl<sub>2</sub> miktarı ve farklı annealing sıcaklıkları denenerek optimizasyon yapılmıştır. Optimum PZR reaksiyon içeriği ve programları aşağıdaki gibidir. PZR amplifikasyonunda toplam hacmi 100 µL PZR karışımı için 10 µL kromozomal DNA (100 ng), 5 µL 16S forward primer (20 pmol), 5 µL 16S reverse primer (20 pmol), 4 µL 5 mM 4 dNTP karışımı, 4 µL 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µL 10x Taq Buffer, 61.5 µL saf su 0.5 µL (2.5U) Taq DNA polimeraz santrifüjlenecektir. Tüplerin thermal cyclers da 30 döngü için izlenen prosedür şu şekildedir. 5 dak 95°C de ön ısıtma, 95°C'de 30 saniye 30 döngü denatürasyon, 30 saniye 55°C'de primerlerin bağlanması, 2 dak. 72°C'de uzama ve 10 dakika 72°C'de zincir sentezinin gerçekleştirilmesi şeklindedir. Suşların 16S rDNA bölgeleri PZR'de çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. 1000 bp ThermoFisher™ DNA Ladder marker olarak kullanılmıştır. PZR ürünleri jelde görüntülendikten sonra sekans analizi yapılana kadar -20°C'de buzdolabında saklamıştır [73].

### 2.2.12.1. PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

% 1'lik agaroz jel hazırlamak için 0.5 g agaroz tartıp 50 mL 1x TAE Tamponu ile çözüldükten sonra mikrodalga fırında ısıtılmıştır. Çözelti yaklaşık 40-45°C'ye soğutulurken içine 4 µL Etidyum Bromür ilave edilmiş ve jel yatağına terazisi düzgün olacak şekilde elektroforez tankına dökülmüştür. Üzerine koyulan taraklar jel soğuduktan sonra kuyucukları bozmayacak şekilde alınmıştır. Her bir örnek 8 µL alınarak 2 µL 6X Bromphenol Mavisi yükleme boyası ile boyanmıştır. DNA örnekleri mikropipet yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir. Örneklerin moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla kuyucuklardan birine ThermoFisher™ 1000 bp DNA Ladder

yüklenmiştir. Elektroforez tankının seviyesine göre yürütme tamponu eklenmiştir. 85 V/cm' voltaj ve 40 mA uygulanarak yaklaşık 40 dakikada yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR ürünlerinin elektroforez ile yürütüldüğü jel daha sonra jel görüntüleme cihazında belirlenmesi için resimleri çekilmiştir [74].

#### **2.2.12.2. 16s rDNA Sekans Analizi**

İzole edilen MH1 ve MB2 suşlarının 16s rDNA gen sekansları yapılacaktır. Saflaştırılmış PZR ürünlerinin en iyi sıcaklık ve MgSO<sub>4</sub> konsantrasyonunu DNA sekans analizi için MEDSANTEK firmasına (İSTANBUL, TÜRKİYE) gönderilmiştir. Gelen sonuçları 16S rDNA sekanslarının NCBI Gen Bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri belirtilmiştir [75].

#### **2.2.12.3. Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması**

İzole edilen suşların 16S rDNA gen sekans dizileri Clustal Multiple Aligment Program (ClustalW 2.0) kullanılarak dizinler oluşturulmuştur. Filogenetik ağaçları Mega 7.0 programında (neighbour-joining) metodu ile çizilmiştir [75].

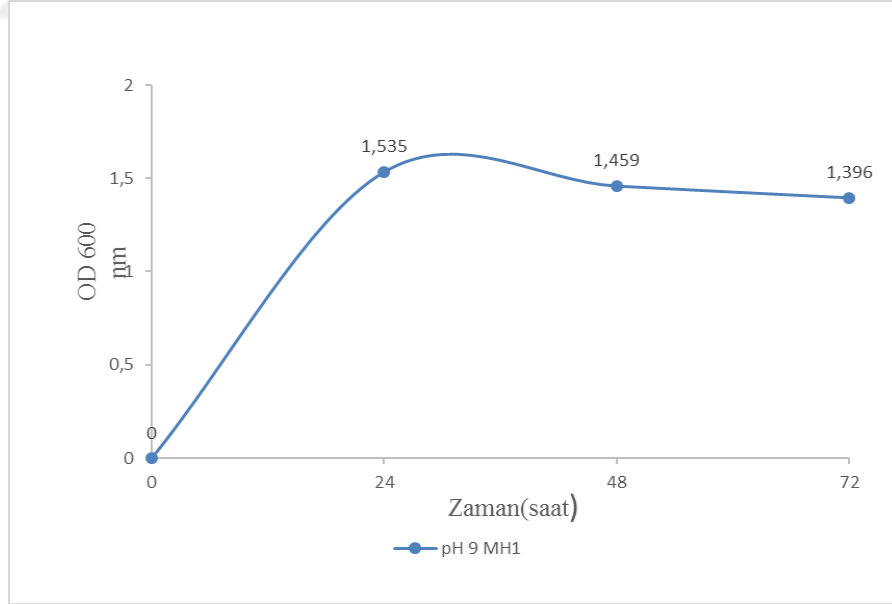
### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3.1. İzolasyon Çalışmaları ve Proteaz Üreticisi Etkin İzolatın Seçilmesi

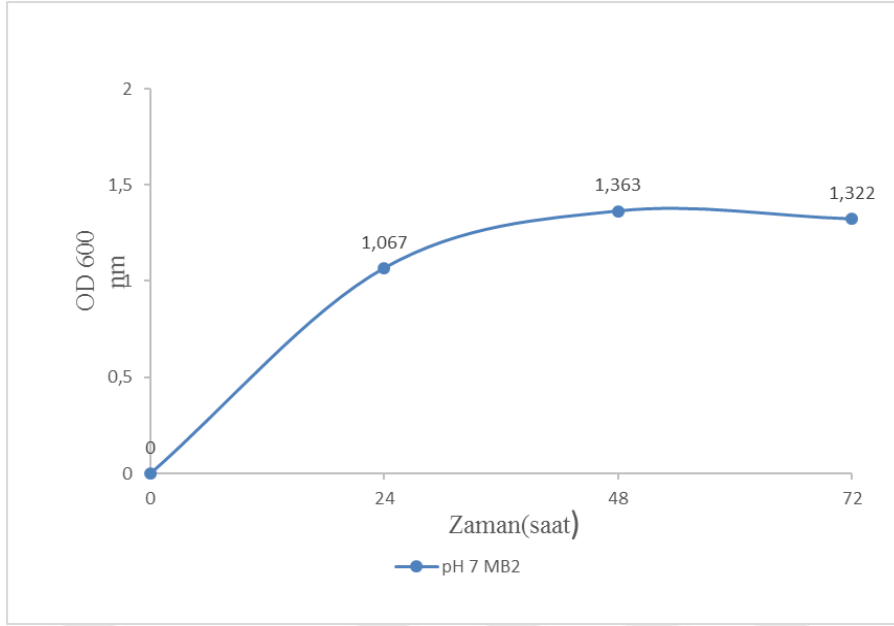
Mağaradan alınan toprak örneğinden seri dilusyon yapılarak bakteriler izole edilmiş sıcaklık, pH, proteaz yeteneklerine göre en iyi proteaz üreticisi 2 örnek seçilmiştir. Diğer aşamalarda aktif proteaz üreticisi olan bu iki örnek üzerinden çalışmalara devam edilmiştir. İzole edildikleri lokasyonu temsil edecek şekilde kodlanarak kültüre alınmışlardır. MH1 ve MB2 suşları olarak kodlanmıştır.

#### 3.2. Bakterilerin Üreme Eğrisinin Belirlenmesi

MH1 ve MB2 suşları'nın iyi optimum sıcaklık ve pH şartlarındaki bakteri üreme grafikleri şekil 3.1 de verilmiştir



Şekil 3.1. MH1 in pH 9.0 daki üreme grafiği



Şekil 3.2. MB2 in pH 7.0 deki üreme grafiği

### 3.3. İzolatların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

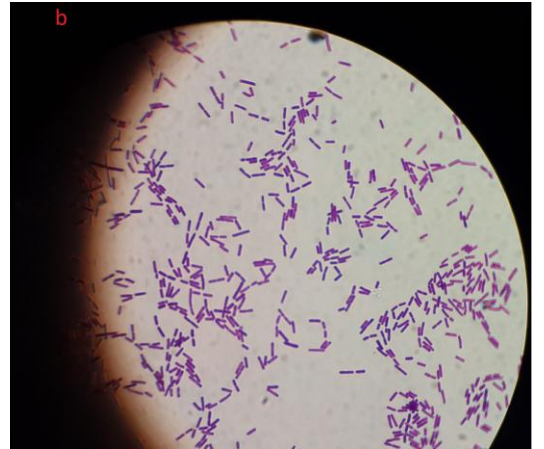
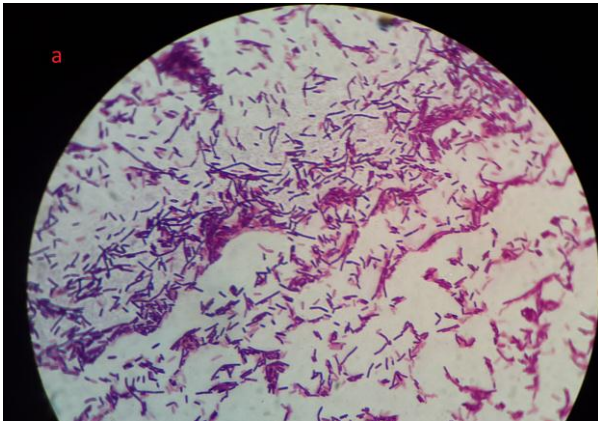
Seçilen MH1 ve MB2 izolatlarının tanımlaması amacıyla Gram boyama, katalaz, oksidaz ve IMViC testleri yapılmıştır. Bölüm 3.2.8.'de anlatılan yöntemle göre yapılan biyokimyasal testlerden elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1. 'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** MH1 ve MB2 suşunun biyokimyasal özellikleri

Uygulanan Test	MH1	MB2
Gram Boyama	(+)	(+)
Katalaz Testi	(+)	(+)
Oksidaz Testi	(-)	(-)
İndol Testi	(-)	(-)
Metil Testi	(-)	(-)
Sitrat Testi	(-)	(-)
VP Testi	(+)	(+)

### 3.3.1. Gram Boyama

MH1 ve MB2 suşları için yapılan gram boyamada sonuçların gram (+) olduğu belirlenmiştir.(Şekil 3.3.).

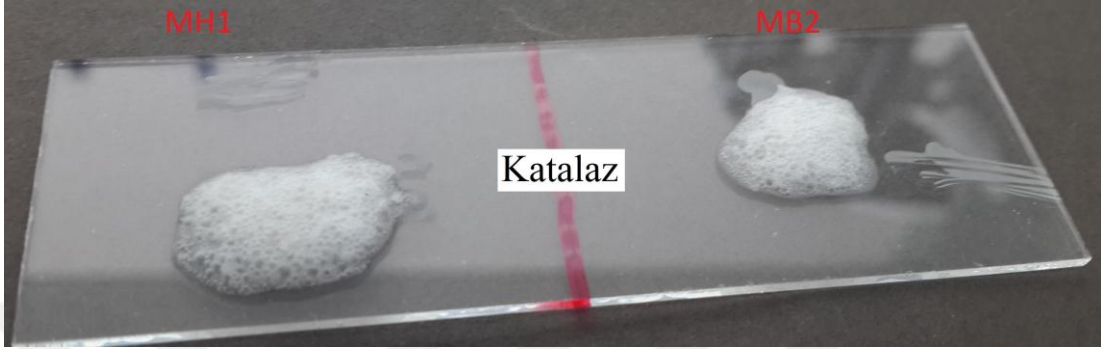


**Şekil 3.3.** Gram Boyama Sonucu MH1 (a)  
MB2 (b) ile gösterilmiştir.



### 3.3.2. Katalaz Testi

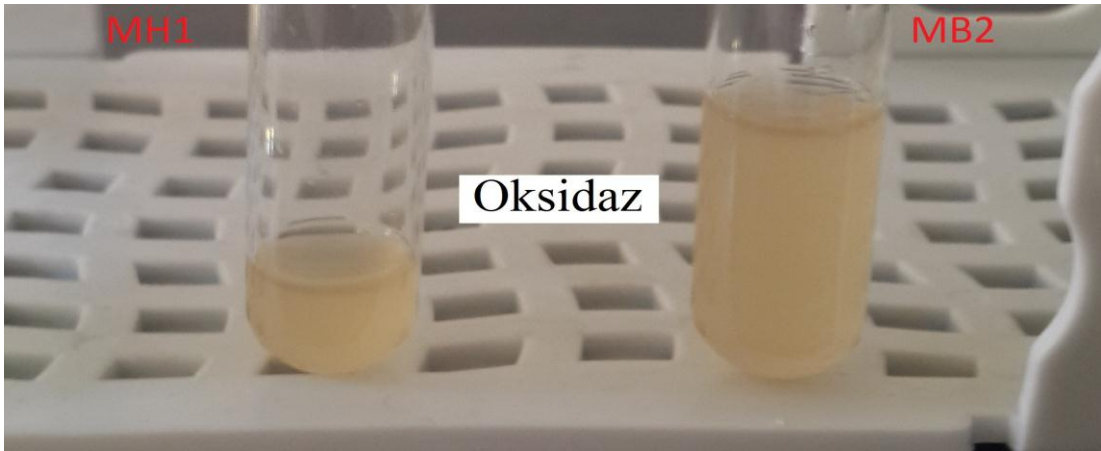
MH1 ve MB2 suşlarında güçlü şekilde hava kabarcığı oluşmuş katalaz testi sonucunda katalaz pozitif olarak belirlenmiştir. (Şekil 3.4)



Şekil 3.4. Katalaz Testi

### 3.3.3. Oksidaz Testi

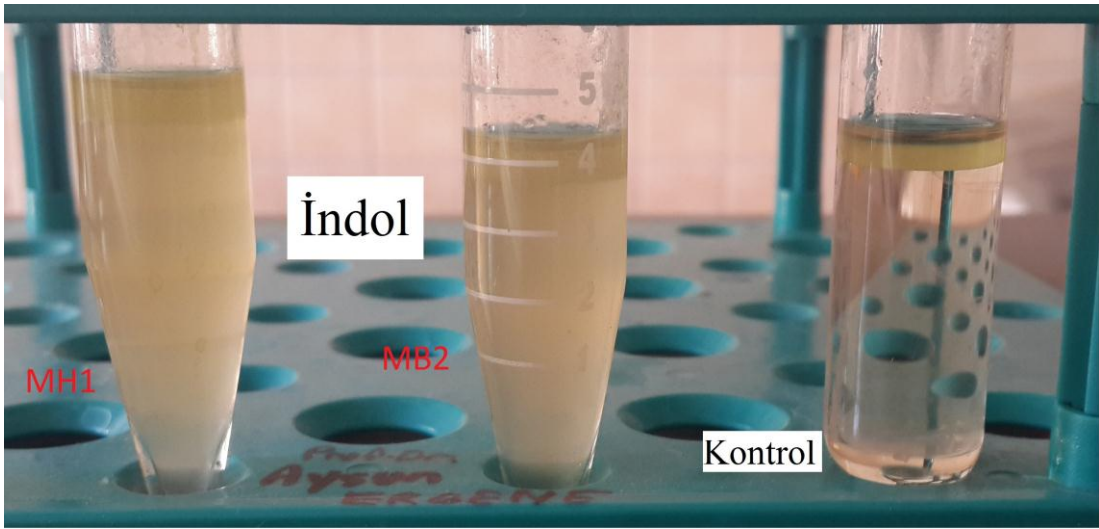
MH1 ve MB2 suşlarının mavi renk oluşumu gözlenmemiştir sonuç negatif olarak belirlenmiştir. (Şekil 3.5)



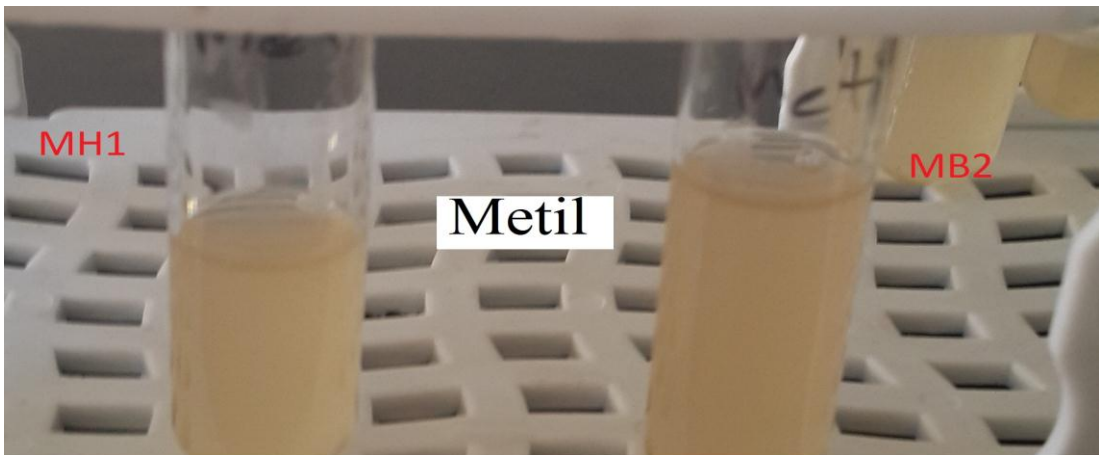
Şekil 3.5. Oksidaz testi

### 3.3.4. IMVIC Testleri

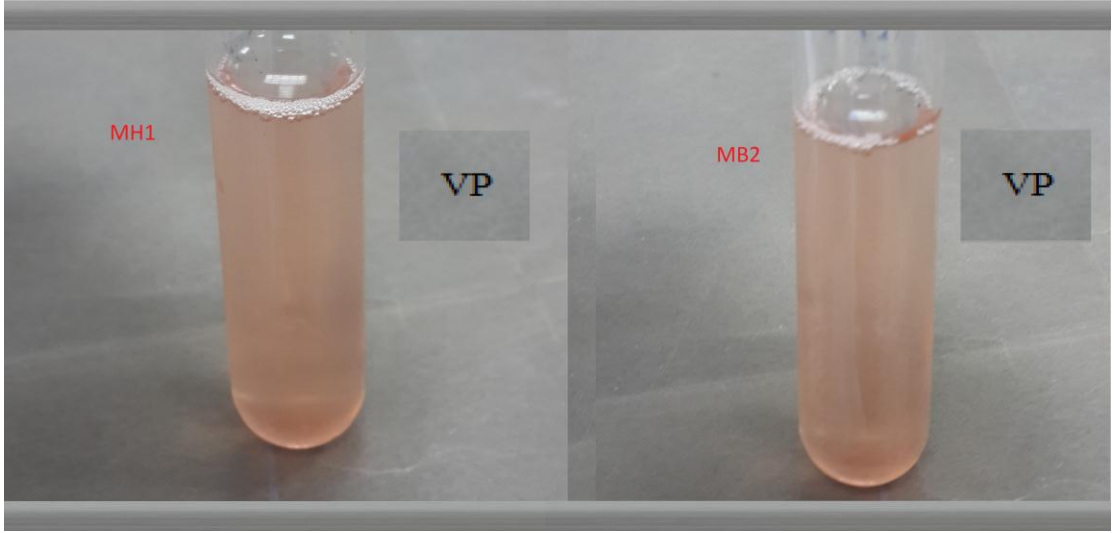
IMVIC testlerinden İndol testi tüplerin üst kısmında bir iki dakika içinde kırmızı bir halkanın oluşmaması sebebi ile negatif belirlenmiştir. Şekil 3.6 da Metil Kırmızısı testinde üst tarafta sarı bir halka görüldü sonuç negatif belirlenmiştir. Şekil 3.7 de Voges Proskauer testi pembe rengin oluşu, acetoin varlığını ortaya koyduğundan pozitif sonuç belirlenmiştir. Şekil 3.8 de Sitrat testi yeşil olarak kalmıştır, sonuç negatif belirlenmiştir. Şekil 3.9 da gösterilmiştir.



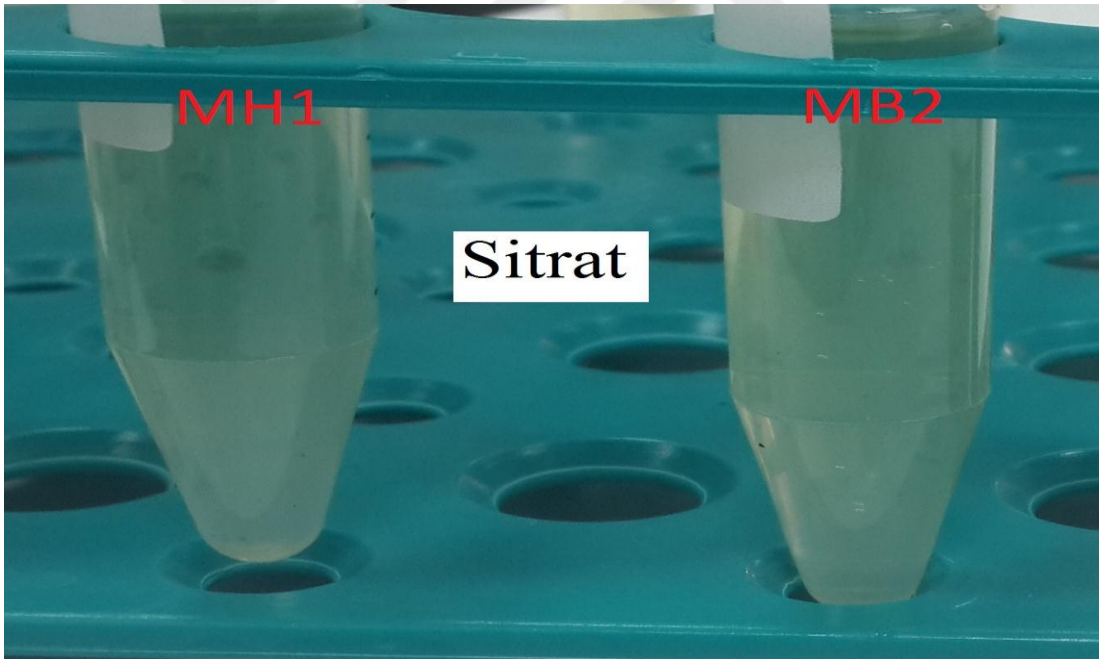
Şekil 3.6. İndol testi görüntüsü



Şekil 3.7. Metil testi görüntüsü



**Şekil 3.8.** Voges Proskauer testi görüntüsü



**Şekil 3.9.** Sitrat testi görüntüsü

### **3.4. Proteaz Üretimi İçin En Uygun Koşulun Belirlenmesi**

En uygun koşulların belirlenmesi amacıyla bölüm 3.2.9. ve 3.2.10 belirtilen yöntemler uygulanmıştır. MH1 ve MB2 suşlarının en uygun proteaz üretim ortamı belirlenmiştir. Çizelge 3.2 deki tabloda veriler belirtilmiştir.

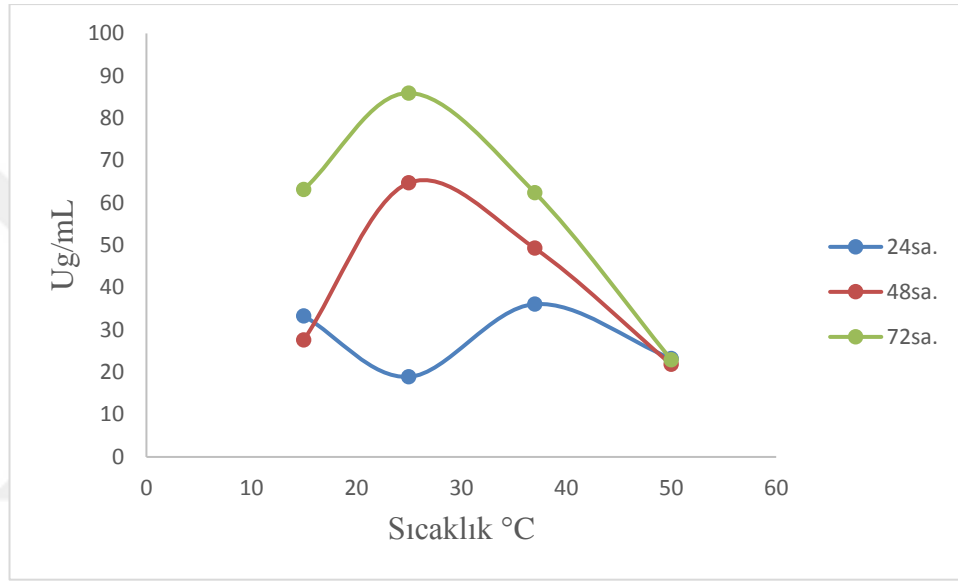


Çizelge 3.2. MH1 ve MB2 Proteaz Aktivite Tablosu ( $\mu\text{g/ml}$ )

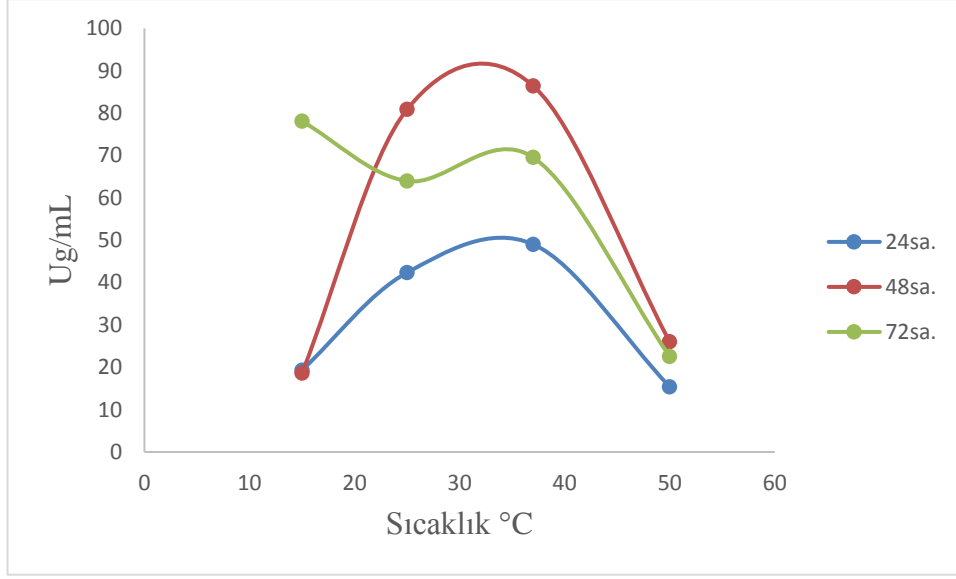
		pH 7			pH 9			pH 10			pH 12		
		24 sa.	48 sa.	72 sa.	24 sa.	48 sa.	72 sa.	24 sa.	48 sa.	72 sa.	24 sa.	48 sa.	72 sa.
MH1	15°C	33,303	27,636	63,169	19,323	18,643	78,098	30,968	20,802	67,977	27,415	25,029	60,962
	25°C	18,915	64,698	85,925	42,347	80,889	63,978	70,546	79,090	71,300	78,910	86,150	69,645
	37°C	36,083	49,272	62,404	49,047	<b>86,465</b>	69,556	70,320	78,550	75,852	70,994	85,566	76,481
	50°C	23,233	21,833	22,964	15,407	26,021	22,558	11,854	25,079	41,897	14,597	25,568	20,141
MB2	15°C	31,325	28,000	47,158	29,302	29,308	<b>93,120</b>	21,794	23,681	53,045	39,060	19,363	59,658
	25°C	56,738	61,595	75,357	22,063	57,997	83,947	23,817	69,825	53,781	65,957	54,354	61,190
	37°C	67,127	78,550	85,746	26,831	56,783	64,473	70,994	89,613	71,084	65,418	81,428	68,431
	50°C	12,529	28,492	25,391	13,788	25,301	24,717	13,203	24,984	24,312	14,912	26,184	29,844

### 3.4.1. MH1 Suşunun Sıcaklık, İnkübasyon Süresi, ve pH Değerinin Proteaz Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

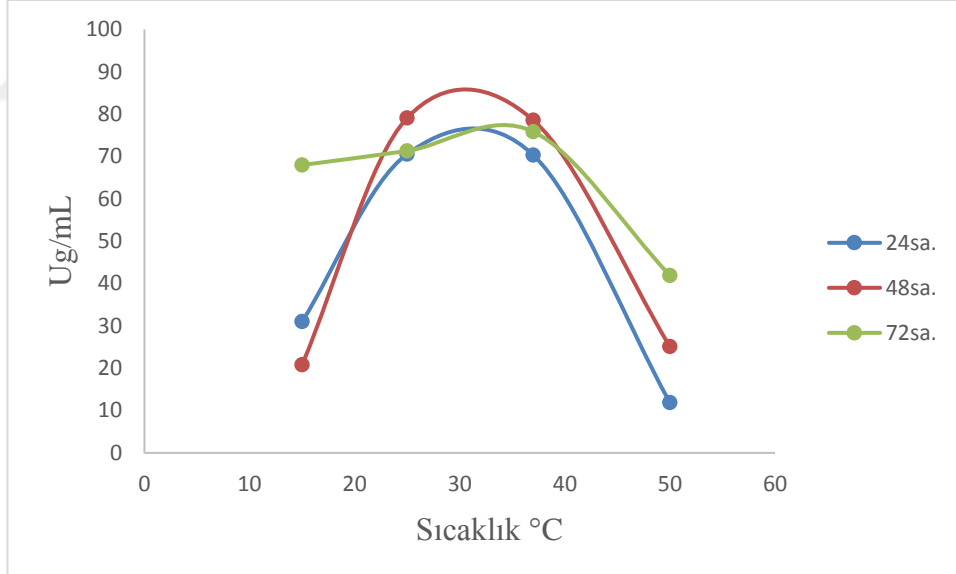
MH1 suşunun belirlenmesi amacıyla bölüm 3.2.5. de belirtilen yöntemle göre farklı pH (7.0, 9.0, 10.0, 12.0) farklı sıcaklık (15°C, 25°C, 37°C, 50°C) farklı sürelerde (24, 48, 72 saat) enzim aktiviteleri ölçülmüştür. MH1 suşunun en yüksek enzim aktivitesi 48 saatte, pH 9.0 ve 37°C 1 U aktivite 86,465 µg/mL olarak ölçülmüştür.



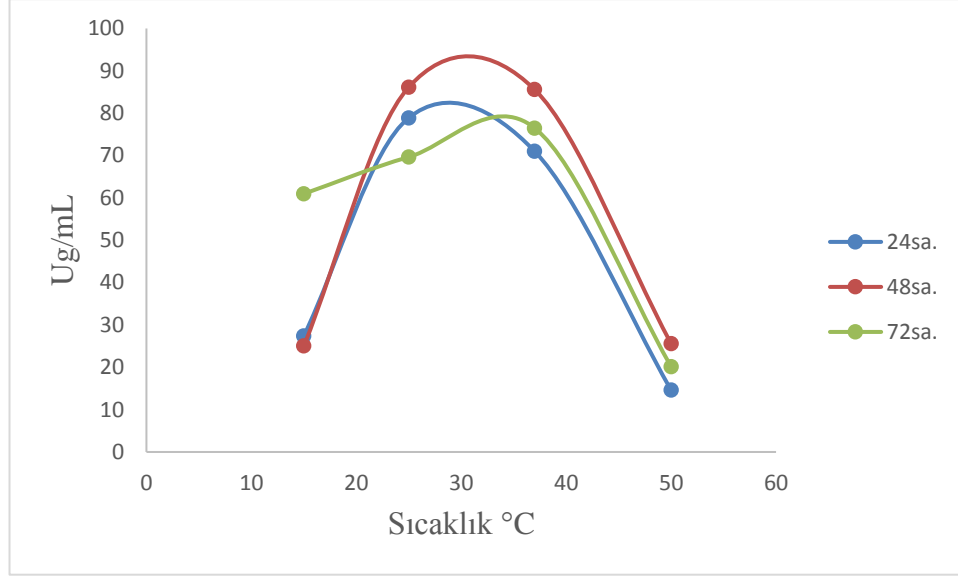
Şekil 3.10. MH1 suşu pH 7 için proteaz enzim aktivite grafiği



**Şekil 3.11.** MH1 suşu, pH 9 için proteaz enzim aktivite grafiği



**Şekil 3.12.** MH1 suşu pH 10 için proteaz enzim aktivite grafiği

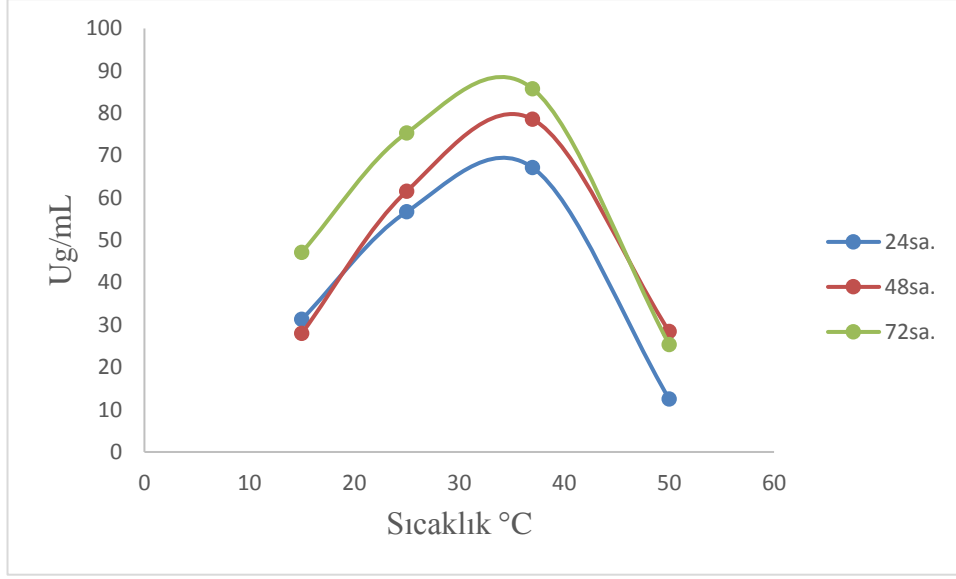


**Şekil 3.13.** MH1 suşu pH 12 için proteaz enzim aktivite grafiği

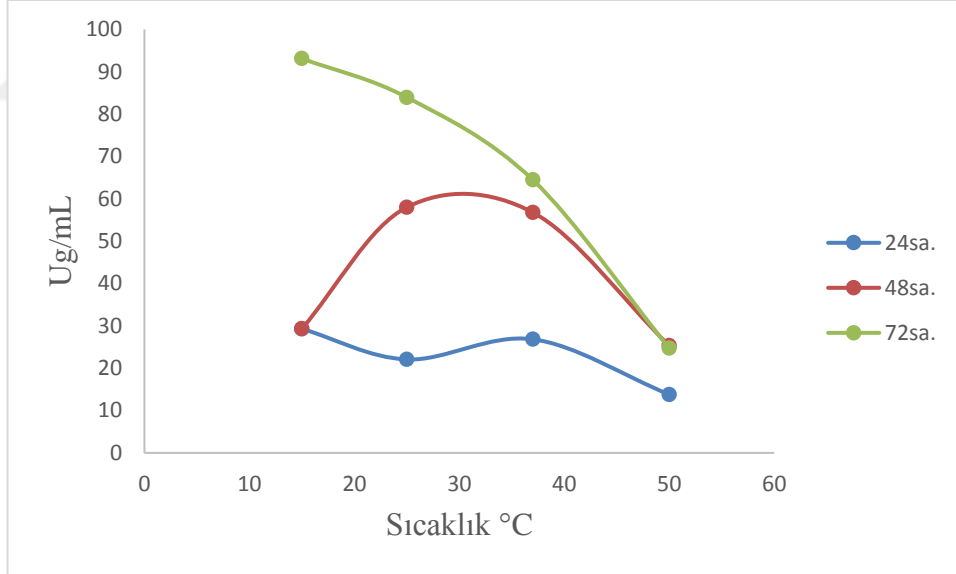
### 3.4.2. MB2 kodlu suşun Sıcaklık, İnkübasyon Süresi ve Ph Değerinin Proteaz Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

MB2 suşunun belirlenmesi amacıyla bölüm 3.2.5. de belirtilen yöntemle göre farklı pH (7.0, 9.0, 10.0, 12.0) farklı sıcaklık (15°C, 25°C, 37°C, 50°C) farklı sürelerde (24, 48, 72 saat) enzim aktiviteleri ölçülmüştür. MB2 suşunun en yüksek enzim aktivitesi 72 saatte, pH 9.0 ve 15°C’de 1 U aktivite 93,120 µg/mL olarak ölçülmüştür.

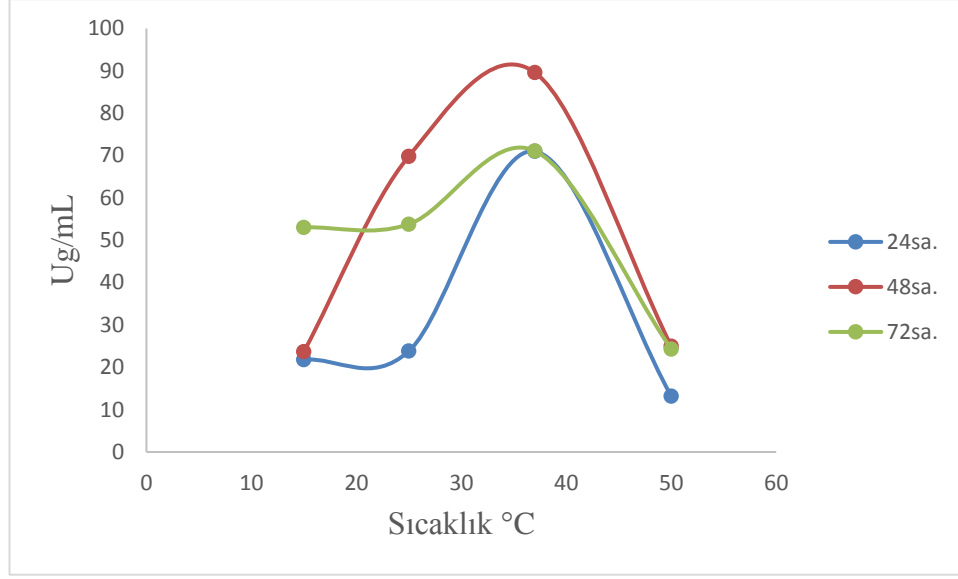




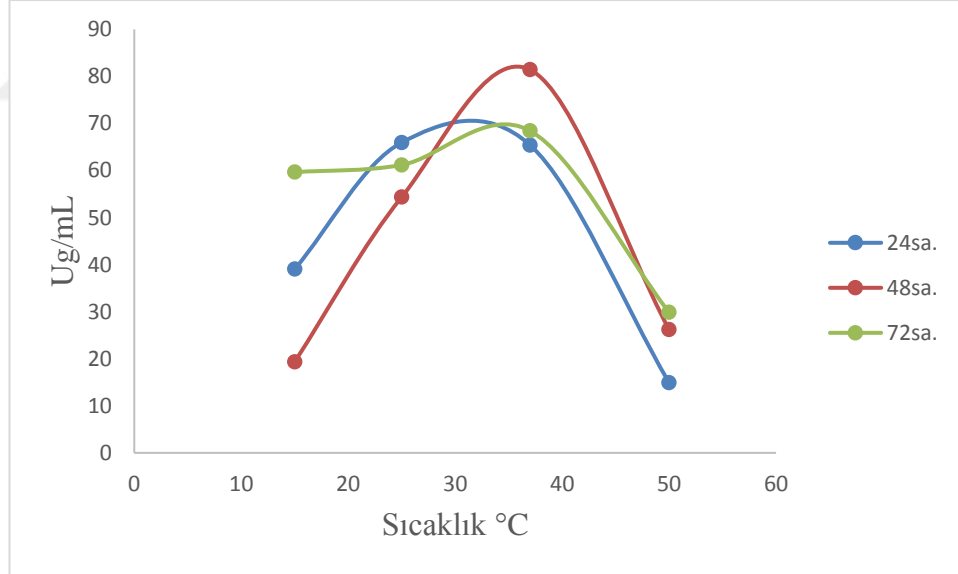
Şekil 3.14. MB2 suşu pH 7 için proteaz enzim aktivite grafiği



Şekil 3.15. MB2 suşu pH 9 için proteaz enzim aktivite grafiği



**Şekil 3.16.** MB2 suşu pH 10 için proteaz enzim aktivite grafiği



**Şekil 3.17.** MB2 suşu pH 12 için proteaz enzim aktivite grafiği

### 3.6. 16S rDNA Sekans Analizi ile Tanımlama

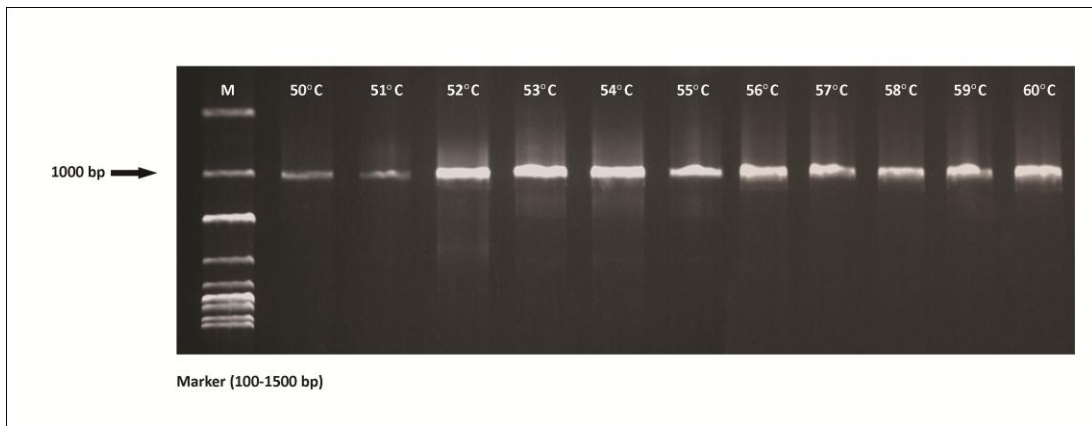
Bakteriler 16 S rDNA sekans analizi kullanılarak da tanımlanmıştır. MH1 ve MB2 kodlu suşların kromozomal DNA ları izole edilmiştir. PZR optimizasyonları yapılmış DNA sekans analizi için kullanılmıştır. 16 s rDNA sekans analizi sonuçları BLAST programı kullanılarak bakteriyel tanımlaması yapılmıştır.

#### 3.6.1. Kromozomal DNA İzolasyonu

PZR amplikasyonuna öncesinde izole edilmiş suşlardan kromozomal DNA izolasyonu yapılmış ve %1 lik agaroz jelde yürütülerek belirlenmiştir.

#### 3.6.2. MH1 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması

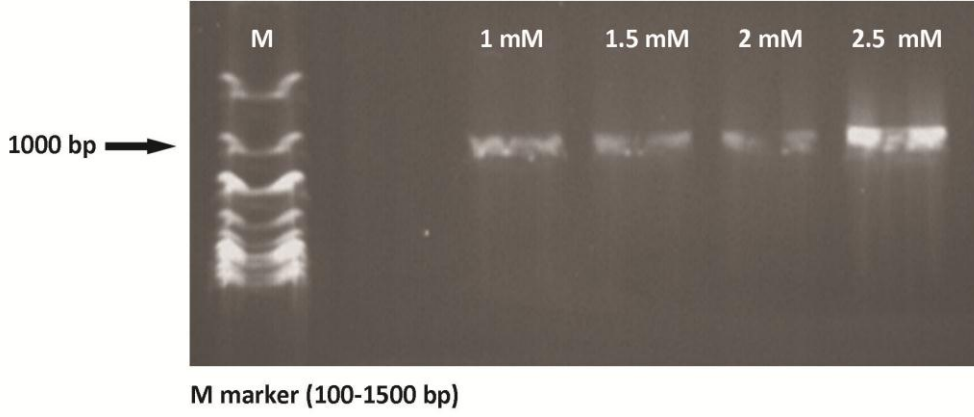
16S rDNA bölgeleri PZR'de çoğaltılıp daha sonra %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1000 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.18. de MH1 kodlu suşa ait farklı sıcaklıklarda primer PZR ürünleri gösterilmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 54°C olduğu görülmektedir.



**Şekil 3.18.** Farklı primer bağlanma şekillerinde MH1 kodlu PZR ürünleri

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra farklı MgCl<sub>2</sub> yoğunluklarındaki konsantrasyonları denenmiştir. MH1 kodlu örneğe ait farklı MgCl<sub>2</sub>

konsantrasyonlar'da PZR ürünleri şekil 3.19. da gösterilmiştir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu olan 2.5 mM belirtilmiştir

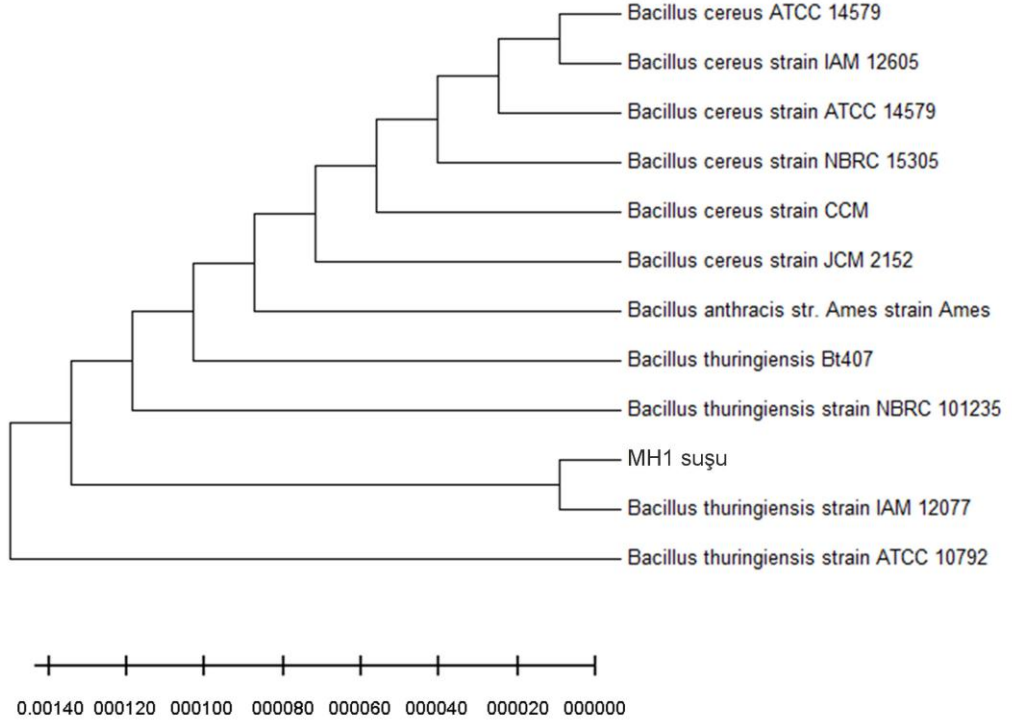


**Şekil 3.19.** Farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarında MH1 suşuna ait PZR ürünleri

### 3.6.3. MH1 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması

Filogeniyi oluştururken uzaklık matrisi (Distance Matrix) metodu kullanılmış ve ağaç oluşturulmuştur. Çalışmada veriler MEGA 7 programına veri şeklinde yüklenerek MH1 kodlu suşuna en yakın olan homoloji gösteren türler arasındaki genetik varyasyon ve filogenetik ilişki gösterilmiştir. (Çizelge 3.3.) Gen bankasına yüklenen verilerin BLAST analizlerine göre MH1 kodlu suş % 99 oranında *Bacillus anthracis* (Ames strain Ames), *Bacillus thuringiensis* ile homoloji gösterdiği saptanmıştır.

16S rDNA bölgelerine göre sıralanan diziler MEGA 7 programında uzaklık matrisine dayalı olarak neighbour-joining tree oluşturulmuştur (Şekil 3.20.) Suşların soy ağacında birbirlerine olan uzaklığı evrimsel akrabalıklarını göstermektedir. Buna göre MH1 kodlu suş evrimsel açıdan *Bacillus thuringiensis* ile yakın akraba olduğu görülmüştür.



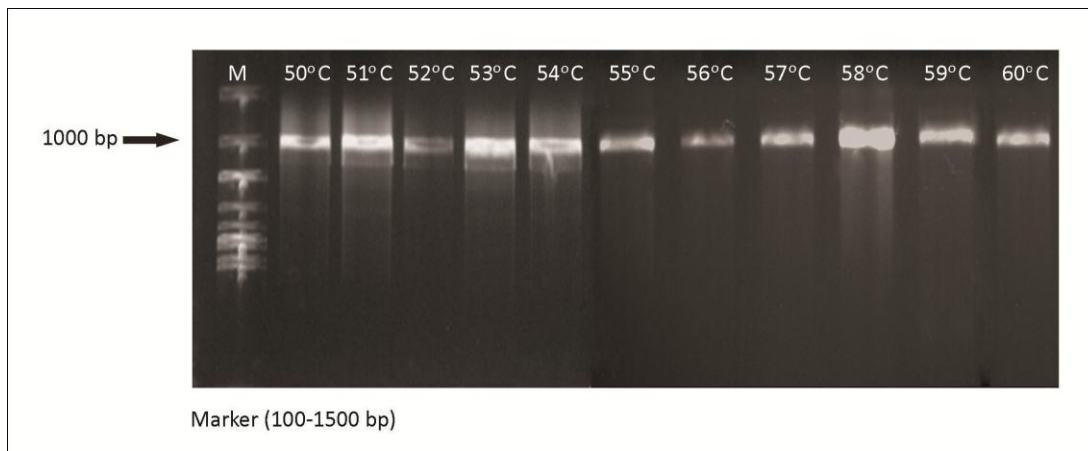
**Şekil 3.20.** MH1 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendrogram (İki gen arasındaki uzaklık cetveli)

**Çizelge 3.3.** MH1 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. MH1												
2. <i>Bacillus toyonensis</i>	0.003											
3. <i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407	0.003	0.001										
4. <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	0.000	0.003	0.003									
5. <i>Bacillus cereus</i> strain JCM 2152	0.000	0.003	0.003	0.000								
6. <i>Bacillus thuringiensis</i> strain NBRC 101235	0.003	0.001	0.000	0.003	0.003							
7. <i>Bacillus cereus</i> strain CCM	0.000	0.003	0.003	0.000	0.000	0.003						
8. <i>Bacillus cereus</i> strain NBRC 15305	0.000	0.003	0.003	0.000	0.000	0.003	0.000					
9. <i>Bacillus cereus</i> strain ATCC 14579	0.000	0.003	0.003	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000				
10. <i>Bacillus thuringiensis</i> strain ATCC 10792	0.003	0.001	0.000	0.003	0.003	0.000	0.003	0.003	0.003			
11. <i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077	0.003	0.001	0.000	0.003	0.003	0.000	0.003	0.003	0.003	0.000		
12. <i>Bacillus cereus</i> strain IAM 12605	0.000	0.003	0.003	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.003	0.003	

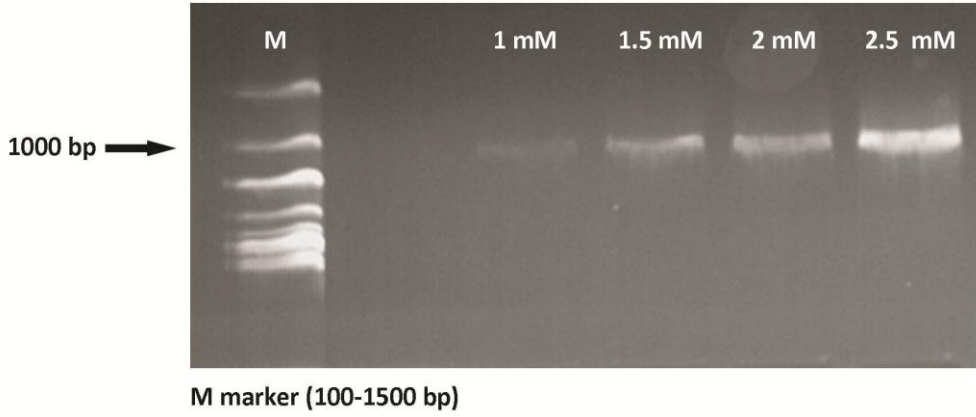
### 3.6.4. MB2 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması

16S rDNA bölgeleri PZR'de çoğaltılıp daha sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1000 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.21.'de MB2 kodlu suşa ait farklı sıcaklıklarda primer PZR ürünleri gösterilmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 58°C olduğu görülmektedir.



**Şekil 3.21.** Farklı primer bağlanma şekillerinde MB2 kodlu PZR ürünleri

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra farklı  $MgCl_2$  yoğunluklarındaki konsantrasyonları denenmiştir. MH1 kodlu örneğe ait farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonları da PZR ürünleri şekil 3.22.'de gösterilmiştir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu  $MgCl_2$  konsantrasyonu olan 2.5 mM belirtilmiştir



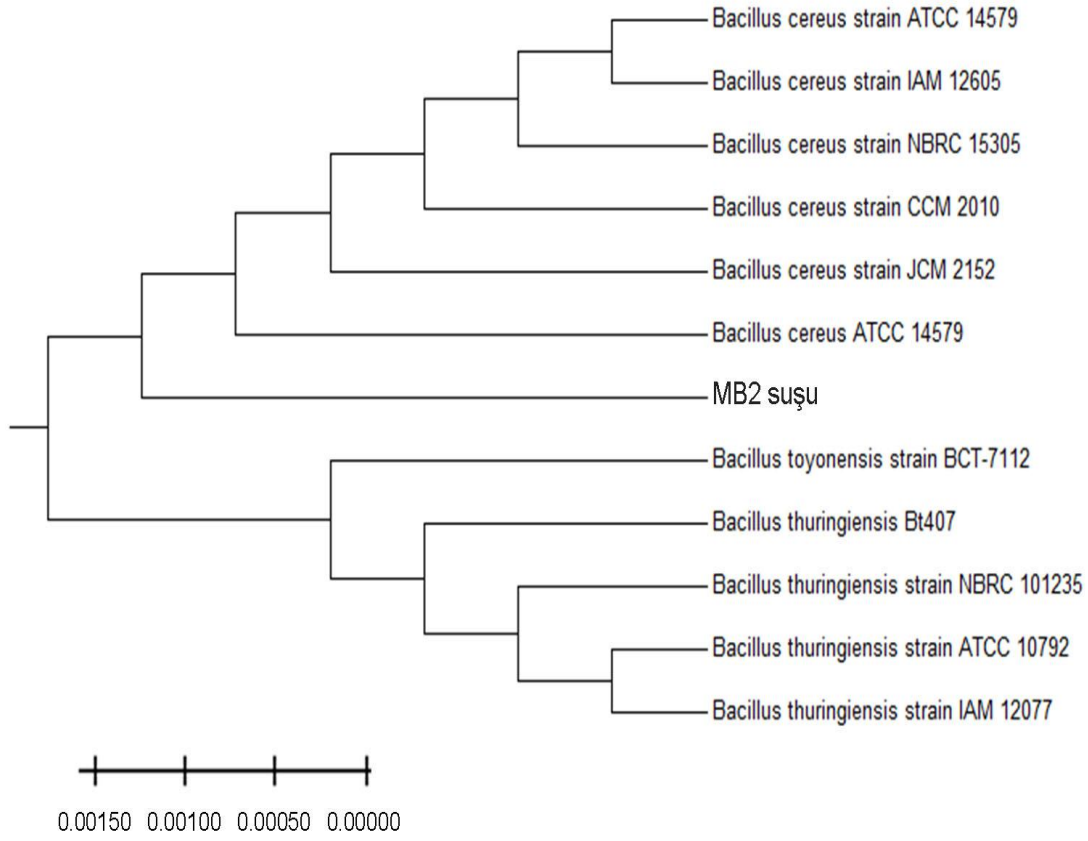
**Şekil 3.22.** Farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarında MB2 suşuna ait PZR ürünleri

### 3.6.5. MB2 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması

Filogeniyi oluştururken uzaklık matrisi (Distance Matrix) metodu kullanılmış ve ağaç oluşturulmuştur. Çalışmada veriler MEGA 7 programına veri şeklinde yüklenerek MH1 kodlu suşuna en yakın olan homoloji gösteren türler arasındaki genetik varyasyon ve filogenetik ilişki gösterilmiştir. (Çizelge 3.4.) Gen bankasına yüklenen verilerin BLAST analizlerine göre MH1 kodlu suş % 100 oranında *Bacillus cereus* ile %99 oranında ise *Bacillus thuringiensis* homoloji gösterdiği saptanmıştır.

16S rDNA bölgelerine göre sıralanan diziler MEGA 7 programında uzaklık matrisine dayalı olarak neighbour-joining tree oluşturulmuştur (Şekil 3.23.) Suşların soy ağacında birbirlerine olan uzaklığı evrimsel akrabalıklarını göstermektedir. Buna göre MB2 kodlu suş evrimsel açıdan *Bacillus cereus* ile yakın akraba olduğu görülmüştür.





**Şekil 3.23.** MB2 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendrogram (İki gen arasındaki uzaklık cetveli)

**Çizelge 3.4.** MB2 kodlu suş için 16S rDNA dizi veriler

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. MB2												
2. <i>Bacillus cereus</i> strain NBRC 15305	0.000											
3. <i>Bacillus cereus</i> strain CCM 2010	0.000	0.000										
4. <i>Bacillus cereus</i> strain IAM 12605	0.000	0.000	0.000									
5. <i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077	0.003	0.003	0.003	0.003								
6. <i>Bacillus thuringiensis</i> strain ATCC 10792	0.003	0.003	0.003	0.003	0.000							
7. <i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407	0.003	0.003	0.003	0.003	0.000	0.000						
8. <i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	0.003	0.003	0.003	0.003	0.001	0.001	0.001					
9. SUS B <i>Bacillus anthracis</i> str. Ames strain Ames ce 1	0.001	0.001	0.001	0.001	0.004	0.004	0.004	0.005				
10. <i>Bacillus thuringiensis</i> strain NBRC 101235	0.003	0.003	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000	0.001	0.004			
11. <i>Bacillus cereus</i> strain JCM 2152	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.003	0.003	0.003	0.001	0.003		
12. <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.003	0.003	0.003	0.001	0.003	0.000	

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin yüksek olması nedeniyle, endüstriyel enzimlerle ilgili alanda yapılan çeşitli araştırmalar, giderek daha da önem kazanmaktadır [76].

Bugüne kadar tanımlanan enzimlerin büyük çoğunluğu düşük sıcaklıkta ve dar bir pH aralığında çalışmaktadır, bu nedenle bu enzimler endüstrinin tercih ettiği geniş pH aralığı ve yüksek sıcaklık koşullarında kullanılamamaktadır. Bu durum da endüstriyel talebi karşılayabilecek nitelikte yeni enzimlerin ve bu enzimleri üretebilecek mikroorganizmaların bulunmasını teşvik etmektedir [77].

Enzimler, tekstil, deri, gıda, deterjan sanayinde ve çevre uygulamalarında her geçen gün artan bir oranda kullanılmaktadır. Ekstrem koşullarda aktivite gösterebilen enzimlere endüstri kollarının büyük gereksinimi vardır. Özellikle alkalen koşullarda yüksek aktiviteye ve kararlılığa sahip proteaz enzimine deterjan endüstrisi tarafından gereksinim duyulmaktadır ve dünya enzim pazarının % 60' ını proteaz enzimi oluşturmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada mağaradan izole edilen bakterilerin ekstraselüler proteaz üretim yetenekleri belirlenmiştir. Proteaz üretim ortamı [52] yöntemi kullanılarak proteaz aktivite tayinleri yapılmıştır. En yüksek aktiviteyi gösteren izolatin enzim aktivitesinin artırılması amacı ile kültür koşulları optimize edilmiş ve enzimin sıcaklık, süre ve pH profili çıkartılıp belirtilmiştir.

Bu tez kapsamında Kırıkkale ilinin Keskin ilçesindeki mağaradan izole edilen organizmalar proteaz üretim yetenekleri belirlenmiştir. MH1 ve MB2 suşları proteaz üretim yetenekleri bakımından seçilmiştir. MH1 suşunun en yüksek proteaz enzim aktivitesi 48 saatte, pH 9.0 ve 37°C'de 1 U enzim aktivitesi 86,465 µg/mL olarak ölçülmüştür.. MB2 suşunun en yüksek proteaz enzim aktivitesi 72 saatte, pH 9.0 ve 15°C'de 1 U enzim aktivitesi 93,120 µg/mL olarak ölçülmüştür

Annamalai ve ark. (2014) *Bacillus alveayuensis* CAS 5 ile yaptıkları çalışmada, alkalen proteaz üretimi için optimum pH değerinin 9 olduğunu rapor etmiştir [78]. Başka bir örnekte NB-16 suşu kullanılmıştır. Tekin ve ark. (2012) *Bacillus* sp. NB-16

suşundan izole edilen proteaz enzimi optimum aktivitesini pH 12.0 ve 25°C'de göstermiştir [79].

Joshi ve ark. (2007) yaptığı çalışmada, *Bacillus cereus* MTCC 6840 suşundan izole edilen proteaz enziminin optimum aktivitesini pH 9.0 ve 20°C'de gösterdiğini belirtmişlerdir [12]. Bununla birlikte, Shi ve ark. (2006) enzimin 15°C'deki relatif aktivitesinin %82 olduğunu bulmuşlardır [80]. *Bacillus cereus* SYP-A2-3 suşundan izole edilen proteaz enziminin 0°C'de % 6, 25 °C'de % 60 relatif aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Düşük sıcaklıktaki bu özelliğin soğukta adaptif enzimler için karakteristik olduğu bildirilmiştir.

Bakterilerin üreme grafiği hazırlanırken çoğu koşuldan en uygun üreme koşulları MH1 suşun pH 7.0 37°C de 24 saatte üreyip logaritmik fazın sonlarına doğru, üremeye paralel olarak 72 saatte maksimum üreme azaldığı görülmüştür. MB2 suşun pH 9.0 48 saatte de 37°C'de zirvede logaritmik fazın sonlarına doğru, üremeye paralel olarak 72 saatte maksimum üreme azaldığı görülmüştür. Araştırmacılar, *Bacillus sp.* proteazlarının genellikle bakterilerin logaritmik gelişme evresinden sonra maksimum verime ulaştığını bildirmişlerdir [81] [82].

Azot kaynaklarının bakteri ve enzim üretimi üzerine etkilerini araştırmak üzere yapılan çalışmada organik azot kaynakları içerisinde en yüksek verim %43 ile kazein ile sağlanır. Kazeinin enzim aktivitesini arttırdığı görülmüştür. İnorganik azot kaynaklarının varlığında ise, proteaz üretiminin yok denecek kadar az olduğu belirlenmiştir. Çalışmalarda, organik azot kaynaklarının, inorganik azot kaynaklarına nazaran daha etkili olduğu ifade edilmiştir [83]. Benzer sonuçlar diğer bilim adamları tarafından da ifade edilmiştir. Bunlardan *Flavobacterium pectinovorum* üzerine yaptıkları araştırmada en yüksek aktiviteyi skimmilk varlığında olduğunu saptamışlardır [23]. Nascimento and Martins (2004) *Bacillus licheniformis* üzerine yaptıkları araştırmada, kazeinin enzim üretiminde uyarıcı etkisi olduğunu ve kazeinin bakteri tarafından hem azot hem de karbon kaynağı olarak kullanılabileceğini saptamıştır [84]. [85] *Bacillus horikoshii*'nin alkalen proteaz üretimini en çok soya unu ve kazeinin arttırdığını bildirmiştir [85]. Shaheen ve ark. (2008), *Bacillus subtilis* üzerinde yaptığı proteaz üretiminin artırılması çalışmalarında, aynı şekilde kazein ve soya unu varlığında yüksek aktivite elde ettiğini belirtmişlerdir [83]. Ahmed ve ark. (2008) alkalen proteaz üreten bir *Streptomyces avermectinus* ile yaptıkları araştırmada,

enzim üretimini arttıran azot kaynağının soya ve buğday unu olduğunu saptarlarken, soya ununun proteaz üretiminde %37 oranında aktivite kaybına neden olduğu bulunmuştur [86].

Seçilen organizmalar bazı biyokimyasal özellikleri açısından taranmıştır. Bu nedenle Gram boyama, katalaz, oksidaz, indol ve IMVIC testleri yapılmıştır. Gram boyama sonucunda izolatin mor renk aldığı belirlenmiş, gram değişken özellikte ve basil morfolojisinde olduğu tespit edilmiştir. Katalaz testi için lam üzerine öze ile saf koloni bırakılmış ve üzerine %3' lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatıldığında, hava kabarcıklarının çıktığı gözlenmiş ve bu test sonucunda izolatin katalaz pozitif olduğu belirlenmiştir. Oksidaz Testi yapılmış tetrametil-p-fenilendiaminin % 0,5' lik çözeltilen ilave edilmiştir. 1-2 dakikalık bekleme süresi sonunda MH1 ve MB2 suşlarının mavi renk oluşumu gözlenmemiştir sonuç negatif olarak belirlenmiştir. İndol testi yapılmış kültürlerin üzerine kovaks ayırıcından 0.5 mL ilave edilip ve iyice karıştırılmıştır. Tüplerin üst kısmında sarımsı halka oluşup negatif belirlenmiştir. Metil Kırmızısı testinde 37 °C de 2-7 gün inkubasyona bırakılan kültürün üzerine metil kırmızısı solüsyonunun'dan 4-5 damla damlatıldığında üst tarafta sarımsı halka gözükmesi negatif olarak belirlenmiştir. VP testinde besiyerinin üstünde 2-5 dakika içinde pembe renk oluşmuştur bunun sonucunda acetoin varlığının tespit edilmiştir. Sitrat testi için saf kültürden Simons Sitrat besiyerine çizgi ekim yapıp 24 saatlik süre sonucunda besiyeri yeşil olarak kalmıştır sonuç negatiftir.

MH1 kodlu suşun PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 54°C olduğu görülmektedir. Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra farklı MgCl<sub>2</sub> yoğunluklarındaki konsantrasyonları denenmiş MH1 kodlu örneğe ait farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları gösterilmiştir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu olan 2.5 mM belirtilmiştir. Gen bankasına yüklenen verilerin BLAST analizlerine göre MH1 kodlu suş % 99 oranında *Bacillus anthracis* (Ames strain Ames), *Bacillus thuringiensis* ile homoloji gösterdiği saptanmıştır. Buna göre MH1 kodlu suş evrimsel açıdan *Bacillus thuringiensis* ile yakın akraba olduğu görülmüştür.

MB2 kodlu suşun PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 58°C olduğu görülmektedir. Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra farklı MgCl<sub>2</sub> yoğunluklarındaki konsantrasyonları denenmiş MB2 kodlu örneğe ait farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları gösterilmiştir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu olan 2.5 mM belirtilmiştir. Gen bankasına yüklenen verilerin BLAST analizlerine göre MB2 kodlu suş % 100 oranında *Bacillus cereus* ile %99 oranında ise *Bacillus thuringiensis* homoloji gösterdiği saptanmıştır. Buna göre MB2 kodlu suş evrimsel açıdan *Bacillus cereus* ile yakın akraba olduğu görülmüştür.



## KAYNAKLAR

1. Topal, Ş., Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Rennin'in Yeri. GIDA/THE JOURNAL OF FOOD, 1985. 10(1).
2. F., K., et al., İnsan Biyokimyası, ed. A. Palme Yayıncılık. 2002. 197-221.
3. Wiseman, A., Handbook of enzyme biotechnology. Handbook of enzyme biotechnology., 1975: p. 274-373.
4. Rao, M.B., et al., Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and molecular biology reviews, 1998. 62(3).
5. Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö. İ., Biyokimya. Aktif Yayınevi, 92-118, Erzurum. 2009.
6. Telefoncu A., P.N., Biyoteknoloji Temel Prensipler ve Uygulamalar, in İzmir. 2010. p. 385-392.
7. Güngör, N., Basillus Suşlarından Elde Edilen Proteaz Enziminin Optimizasyonu ve Saflaştırılması, in Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi 2011, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi. p. 2.
8. Antranikian, G., C.E. Vorgias, and C. Bertoldo, Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts, in Marine biotechnology I. 2005, Springer. p. 219-262.
9. Chen, X.-L., et al., Effects of different buffers on the thermostability and autolysis of a cold-adapted protease MCP-01. Journal of protein chemistry, 2002. 21(8): p. 523-527.
10. Morita, Y., et al., Cold-active enzymes from cold-adapted bacteria. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1997. 74(4): p. 441-444.
11. Kulakova, L., et al., Cold-active serine alkaline protease from the psychrotrophic bacterium Shewanella strain Ac10: gene cloning and enzyme purification and characterization. Applied and environmental microbiology, 1999. 65(2): p. 611-617.
12. Joshi, G.K., S. Kumar, and V. Sharma, Production of moderately halotolerant, SDS stable alkaline protease from Bacillus cereus MTCC 6840 isolated from lake Nainital, Uttaranchal state, India. Brazilian Journal of Microbiology, 2007. 38(4): p. 773-779.
13. He, H., et al., Taste improvement of refrigerated meat treated with cold-adapted protease. Food chemistry, 2004. 84(2): p. 307-311.
14. Aehle, W., Enzymes in Industry. Willey. 2007, VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

15. Gözükara, M.E., *Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri*, Ankara. 1997.
16. Özçömlekçi, E., *Proteaz Enziminin Glutaraldehit Kullanarak Kovalent Bağlanma İle İmmobilizasyonunda Optimum Şartların Belirlenmesi*. 2015, Fen Bilimleri Enstitüsü.
17. Salleh, A.B., N.Z.R.A. Rahman, and M. Basri, *New lipases and proteases*. 2006: Nova Science Publishers.
18. Mabrouk, S., et al., *Optimization of alkaline protease productivity by Bacillus licheniformis ATCC 21415*. *Bioresource Technology*, 1999. 69(2): p. 155-159.
19. Kumar, C.G. and H. Takagi, *Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint*. *Biotechnology advances*, 1999. 17(7): p. 561-594.
20. Tanskul, S., et al., *An alkaline serine-proteinase from a bacterium isolated from bat feces: purification and characterization*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2009. 73(11): p. 2393-2398.
21. Alpan, L., *Determination of the specifications of the alkaline proteases of some extremely thermophilic anaerobic bacteria*. 2008.
22. Edwards, D.R., M.M. Handsley, and C.J. Pennington, *The ADAM metalloproteinases*. *Molecular aspects of medicine*, 2008. 29(5): p. 258-289.
23. Ward, O., *Comprehensive biotechnology*. ed. Moo-Young M, Pergamon, Oxford, 1985: p. 789-818.
24. <http://web.iyte.edu.tr/~polatbulanik/sifali%20bitkiler/Papaya.htm>. Papaya. (Erişim Tarihi : 15.05.2016)
25. Sevinç, N., *Türkiye Topraklarından İzole Edilen Bacillus Suşlarından Proteaz Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*, in *Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa*. 2010. p. 116.
26. Shankar, S., M. Rao, and R.S. Laxman, *Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of Beauveria sp*. *Process biochemistry*, 2011. 46(2): p. 579-585.
27. Kıran, Ö.E., U. ÇÖMLEKÇİOĞLU, and N. DOSTBİL, *Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları*. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2006. 9(1): p. 12-19.
28. Deshpande, V.V., et al., *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 1998. 62(3): p. 597-635.
29. Banik, R.M. and M. Prakash, *Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from Bacillus cereus*. *Microbiological research*, 2004. 159(2): p. 135-140.



30. Gupta, R., Q. Beg, and P. Lorenz, Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 2002. 59(1): p. 15-32.
31. Haddar, A., et al., Characterization of detergent stable and feather degrading serine proteases from *Bacillus mojavensis* A21. *Biochemical Engineering Journal*, 2010. 51(1): p. 53-63.
32. Uhlig, H., *Industrial enzymes and their applications*. 1998: John Wiley & Sons.
33. Horikoshi, K., T. Akiba, and H. Takami, Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1989. 30(2): p. 120-124.
34. Takami, H., T. Akiba, and K. Horikoshi, Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1989. 30(2): p. 120-124.
35. Mukhtar, H. and I. Haq, Production of alkaline protease by *Bacillus subtilis* and its application as a depilating agent in leather processing. *Pak. J. Bot*, 2008. 40(4): p. 1673-1679.
36. Duman, A., Y., *Bacillus clausii* Alkalen Proteaz'ının Su ile Karışabilen Organik Çözücüler Varlığında Kinetik ve Termodinamik Özelliklerinin İncelenmesi, in Kocaeli Üniversitesi. Doktora Tezi, Kocaeli. 2008. p. 309.
37. Cakmakci, S. and A. Caglar, Use of protease and lipase enzymes by different methods to accelerate kasar cheese ripening. II-The effect on cheese free volatile fatty acids. *Ataturk Univ., Journal of Agricultural College (Turkey)*, 1995.
38. Banerjee, R., R. Agnihotri, and B. Bhattacharyya, Purification of alkaline protease of *Rhizopus oryzae* by foam fractionation. *Bioprocess Engineering*, 1993. 9(6): p. 245-248.
39. Yigit, N. and E. Aktas, Comparison of the efficacy of different blood medium in determining the hemolytic activity of *Candida* species. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 2009. 19(2): p. 110-115.
40. Madigan, M.T., et al., *Brock Biology of Microorganisms* 13th edition. 2010: Benjamin Cummings.
41. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977. 74(12): p. 5463-5467.
42. Maxam, A.M. and W. Gilbert, A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977. 74(2): p. 560-564.

43. [http://www.acgtinc.com/specialty\\_dna\\_sequencing.htm](http://www.acgtinc.com/specialty_dna_sequencing.htm). (Erişim Tarihi: 20.08.2016).
44. Watson, J., et al., Scientific American Books. New York, 1992: p. 64-66.
45. Wiener, P., C. Müller-Graf, and V. Barcus, Bacterial evolution in modern times: Trends and implications for research. Integrative Biology: Issues, News, and Reviews, 1998. 1(4): p. 149-160.
46. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>, (Erişim Tarihi:20.08.2016.)
47. Wang, Y. and P.-Y. Qian, Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. PloS one, 2009. 4(10): p. e7401.
48. Calli, B., et al., Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate. Bioresource technology, 2006. 97(4): p. 641-647.
49. Ludwig, W. and K. Schleifer, Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. FEMS microbiology reviews, 1994. 15(2-3): p. 155-173.
50. Beyhan, Y.E., Samsun Yöresi Mandalarda Kistik Ekinokokozisin Yayınlığı Suşların PZR ve DNA Dizi Analizi ile Tesbiti. Doktora Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 2011.
51. Temizkan, G. and N. Arda, Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. Nobel Tıp Kitabevleri, 2004. 62.
52. Denizci, A., et al., Newly isolated *Bacillus clausii* GMBAE 42: an alkaline protease producer capable to grow under highly alkaline conditions. Journal of Applied Microbiology, 2004. 96(2): p. 320-327.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. Singh, J., N. Batra, and R. Sobti, Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. Process Biochemistry, 2001. 36(8): p. 781-785.

57. Lenete, Bawols, and Hausler, Manuel of clinical Microbiology. 1985: p. 1149.
58. Kahyaoğlu, Kırıkkale Kızılırmak'tan Ağır Demir Metaline Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu in Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale. 2013.
59. Adinarayana, K., P. Ellaiah, and D.S. Prasad, Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *Aaps Pharmscitech*, 2003. 4(4): p. 440-448.
60. 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.
61. Key, L., P.W. Moser, and B.S. Wildi, Proteases of the genus *Bacillus*. II. Alkaline proteases. *Biotechnology and bioengineering*, 1970. 12(2): p. 213-249.
62. Smith, A.C. and M.A. Hussey. Gram stain protocols. in American Society for Microbiology-ASM Conference for Undergraduate Educators. 2005.
63. Miller, J.M. and J.W. Wright, Spot indole test: evaluation of four reagents. *Journal of clinical microbiology*, 1982. 15(4): p. 589-592.
64. MacFaddin, J., et al., Medium for the presumptive identification of *Aeromonas hydrophila* and *Enterobacteriaceae*. *Applied and environmental microbiology*, 1979. 38(5): p. 1023-1026.
65. Isenberg, H., Identification of commonly isolated aerobic gram positive bacteria, section 1.20. 25. *Clinical microbiology procedures handbook*. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1992.
66. <https://www.mikrobiyoloji.org>, (Erişim Tarihi: 19.08.2016).
67. Shigei, J., Test methods used in the identification of commonly isolated aerobic gram-negative bacteria. *Clinical microbiology procedures handbook*, 1992. 1: p. 1-104.
68. York, M., et al., Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria: optochin susceptibility test, p. 3.17. 38.1–3.17. 38.3. *Clinical microbiology procedures handbook*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC, 2004.
69. Voget, S., H. Steele, and W. Streit, Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase. *Journal of biotechnology*, 2006. 126(1): p. 26-36.
70. Burhan, A., et al., Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 2003. 38(10): p. 1397-1403.

71. Cutting, S. and P. Vander Horn, Genetic analysis in Molecular Biological Methods for Bacillus (Harwood, CR and Cutting, SM, eds.) pp. 27-74. 1990, John Wiley and Sons Ltd, West Sussex, England.
72. Yilmaz, F., et al., Surface water-borne multidrug and heavy metal-resistant Staphylococcus isolates characterized by 16s rDNA sequencing. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 2013. 91(6): p. 697-703.
73. Kishore, L., K. Natarajan, and C. Babu, Total soluble protein and membrane lipopolysaccharide profiles in differentiating Rhizobium isolates. Microbios, 1996. 86(348): p. 143-156.
74. Kebelmann-Betzing, C., et al., Advantages of a new Taq DNA polymerase in multiplex PCR and time-release PCR. Biotechniques, 1998. 24(1): p. 154-158.
75. Şahin, Ö., Yağ Asidi ve 16S rRNA Sekans Analizleri İle tanımlanan Lityum, Mangan ve Çinko Dirençli Bakterilerin Biyosorpsiyon Yeteneklerinin Belirlenmesi, in Fen Bilimleri Enstitüsü. 2013, Kırıkkale Üniversitesi.
76. GÖZÜKARA, F., Termofil Bacillus sp. Bakterisinden Lichenaz (B-1, 3 Ve 1, 4 Glucanase) Enzimi Üretimi, Karakterizasyonu Ve Biyoteknolojik Kullanılabilirliği. ÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2009.
77. Anwar, A. and M. Saleemuddin, Alkaline proteases: a review. Bioresource Technology, 1998. 64(3): p. 175-183.
78. Annamalai, N., M.V. Rajeswari, and T. Balasubramanian, Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from Bacillus alveayuensis CAS 5 using marine wastes. Food and Bioproducts Processing, 2014. 92(4): p. 335-342.
79. Tekin, N., et al., Alkaline protease production of Bacillus cohnii APT5. Turkish Journal of Biology, 2012. 36(4): p. 430-440.
80. Shi, J., et al., Purification and characterization of cold-adapted protease produced by psychrotroph of glacier environment. CHINESE JOURNAL OF APPLIED AND ENVIRONMENTAL BIOLOGY, 2006. 12(1): p. 72.
81. Keay, L., et al., Production and isolation of microbial proteases. BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, 1972: p. 63-&.
82. Manachini, P.L., M.G. Fortina, and C. Parini, Thermostable alkaline protease produced by Bacillus thermoruber—a new species of Bacillus. Applied microbiology and biotechnology, 1988. 28(4-5): p. 409-413.
83. Shaheen, M., et al., Influence of culture conditions on production and activity of protease from Bacillus subtilis BS1. Pak. J. Bot, 2008. 40(5): p. 2161-2169.

84. Nascimento, W.C.A.d. and M.L.L. Martins, Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian journal of microbiology*, 2004. 35(1-2): p. 91-96.
85. Joo, H.-S., et al., Bleach-resistant alkaline protease produced by a *Bacillus* sp. isolated from the Korean polychaete, *Periserrula leucophryna*. *Process Biochemistry*, 2004. 39(11): p. 1441-1447.
86. Ahmed, S.A., et al., Optimization, immobilization of extracellular alkaline protease and characterization of its enzymatic properties. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 2008. 4(5): p. 434-446.

