

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BORLU TOPRAKTAN PROTEAZ ÜRETEN TÜRLERİN İZOLASYONU VE  
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Tayfun ÇOŞKUN

EKİM 2016

**Biyoloji Anabilim Dalında** Tayfun ÇOŞKUN tarafından hazırlanan BORLU TOPRAKTAN PROTEAZ ÜRETEN 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

### BORLU TOPRAKTAN PROTEAZ ÜRETEN TÜRLERİN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

ÇOŞKUN, Tayfun

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Ekim, 2016, 117 sayfa

Bu tez çalışmasının amacı, Balıkesir ilinin Bigadiç ilçesinde bulunan bor madeninin atık havuz alanından ve bor kalıntılarının bırakıldığı noktadan alınan toprak örneklerinden izole edilen bakterilerin spesifik özelliklerini, optimal üreme ve proteaz üretme koşullarını belirlemektir. Bu amaçla bakterilerinin proteaz enzimini artırmak için farklı besi ortamları denenmiş, karbon kaynakları, pH ve sıcaklık değerleri gibi önemli etmenler değiştirilerek test edilmiştir. Elde edilen bakterilerin gen dizilimleri incelenmiş ve 16S rDNA sekans analizi kullanılarak bu bakterilerin moleküler karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. pH, sıcaklık ve inkübasyon süresiyle ilgili yapılmış olan çalışmalarla da TK2 izolatının pH 12.0 25 °C sıcaklıkta ve 48. saatte 90.648 U/ g/mL ile en yüksek aktiviteye TK3 izolatı ise pH 7.0, 25 °C sıcaklıkta 48. saatte 93.347 U/ g/mL ile en yüksek proteaz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. TK2 ve TK3 izolatları ile yapılan moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda TK2 suşunun *Bacillus toyonensis* strain BCT-7112 türüne % 100' e yakın oranda homoloji gösterdiği belirlenmiştir. TK3 suşu ise *Bacillus cereus* ATCC 14579 türüne % 100' e yakın oranda homoloji gösterdiği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Proteaz, 16S rDNA, Bor, Bakteri İzalasyonu, Moleküler Karakterizasyon

## ABSTRACT

### ISOLATION OF PROTEASE PRODUCING SPECIES FROM BORON SOIL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION

ÇOŞKUN, Tayfun

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M.Sc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Aysun ERGENE

October 2016, 117 pages

The aim of this study, to determine optimal growth, protease production conditions and specific characteristics of the bacteria isolated from boron residue and boron in the district waste pool area at Balıkesir province Bigadic. For this purpose different media tested to improve the protease enzyme, carbon sources, pH and temperature values. Molecular characterization of these bacteria were examined using the obtained gene sequences of bacteria and 16S rDNA sequence analysis was performed. The highest protease activity found 90.648 U/g/mL to pH 12.0 at 25 ° C and 48 hours of TK2 isolates and 93.347 U/g/mL pH 7.0, at 25 ° C and 48 hours of TK3 isolates. TK2 strain show that 100% homology to *Bacillus toyonensis* strain BCT-7112 and TK3 strain show that 100% homology to *Bacillus cereus* ATCC 14579.

**Keywords:** Protease, 16S rDNA, Boron, Bacterial Isolation, Molecular Characterization

## TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım sũresince tecrũbesiyle ve bilgisiyle bana yol gũsteren ve bana her zaman destek ve emek veren tez danıŐmanım Sayın. Prof. Dr. Aysun ERGENE' ye sonsuz teŐekkũrlerimi sunarım.

Laboratuvar da çalıŐmalarım boyunca bilgisini ve yardımını benden esirgemeyen Nebahat Aytuna ERİ' ye çok teŐekkũr ederim.

Yũksek lisansım boyunca her an beraber olduğum, tezim esnasında sũrekli yanımda olan ve her konuda bana yardım eden Murat ÇAKMAK' a en içten dileklerle teŐekkũr ederim.

Bana tezim esnasında her konuda yardım eden Salih Batuhan SALIK' a, tez çalıŐmalarım sũresince bilgi ve yardım aldığım Karcan IŞIK ve Őeyma DUMAN' a, çalıŐmalarım sırasında teknik konularda bana yardım eden Gũkhan ŐZKAN' a teŐekkũrũ borç bilirim.

Hayatım boyunca maddi manevi benden desteklerini esirgemeyen, sonsuz sevgileriyle benim her zaman yanımda olan canım aileme baŐta annem Őaziye ÇOŞKUN'a, babam Őũkrũ ÇOŞKUN'a ve kardeŐim İnci ÇOŞKUN'a tũm kalbimle sonsuz teŐekkũr ederim.

Yũksek lisansım esnasında kaybettiğim ve beni bugũne kadar yetiŐtiren, var eden canım annem Őaziye ÇOŞKUN'u rahmetle ve Őzlemle anıyorum.

Tayfun ÇOŞKUN  
Ekim 2016

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	x
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xi
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. ENZİMLER .....	1
1.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması .....	1
1.1.1.1. Oksidoredüktazlar.....	2
1.1.1.2. Transferazlar .....	2
1.1.1.3. Hidrolazlar .....	2
1.1.1.4. Liyazlar .....	3
1.1.1.5. İzomerazlar .....	3
1.1.1.6. Ligazlar .....	3
1.1.2. Enzimlerin Kaynakları .....	4
1.2. PROTEAZLAR.....	4
1.2.1. Proteazların Sınıflandırılması .....	5
1.2.1.1. Kaynaklarına Göre Proteazlar.....	6
1.2.1.1.1. Hayvansal Proteazlar .....	6
1.2.1.1.2. Bitkisel Proteazlar.....	7
1.2.1.1.2.1. Papain .....	8
1.2.1.1.2.2. Bromelain .....	8
1.2.1.1.2.3. Keratinaz.....	8
1.2.1.1.2.4. Fisın .....	8
1.2.1.1.3. Mikrobiyal Proteazlar .....	9
1.2.1.1.3.1. Bakteriyal Proteazlar .....	9
1.2.1.1.3.2. Fungal Proteazlar .....	11
1.2.1.1.3.3. Viral Proteazlar .....	11
1.2.2. Mikrobiyal Alkalen Proteazların Özellikleri .....	12

1.2.3. Mikrobiyal Alkalen Proteazlarında pH ve Sıcaklık .....	12
1.2.4. Mikrobiyal Alkalen Proteazlarda Moleküler Ağırlık .....	12
1.2.5. Mikrobiyal Alkalen Proteazların Substrat Özgünlüğü .....	13
1.2.6. Mikrobiyal Alkalen Proteazların Üretim Safhası .....	13
1.2.7. Mikrobiyal Alkalen Proteazlarda Beslenme .....	13
1.2.7.1. Makronütrientler .....	15
1.2.7.2. Minör Elementler .....	15
1.2.7.3. İz Elementler .....	16
1.2.1.2. Katalitik Aktifliklerine Göre Proteazlar .....	16
1.2.1.2.1. Ekzopeptidazlar .....	16
1.2.1.2.1.1. Aminopeptidazlar .....	17
1.2.1.2.1.2. Karboksipeptidazlar .....	18
1.2.1.2.2. Endopeptidazlar .....	19
1.2.1.2.2.1. Serin Proteazlar .....	20
1.2.1.2.2.1.1. Serin Alkalen Proteazlar .....	20
1.2.1.2.2.1.2. Subtilisinler .....	21
1.2.1.2.2.2. Sistein (Tiol) Proteazlar .....	21
1.2.1.2.2.3. Aspartik Proteazlar .....	21
1.2.1.2.2.4. Metallo Proteazlar .....	22
1.2.8. Alkalen Proteaz Üretimi İçin Gerekli Etmenler .....	22
1.2.9. Endüstride Proteazların Kullanıldığı Alanlar .....	23
1.2.9.1. Deterjan Endüstrisinde Kullanılan Proteazlar .....	25
1.2.9.2. Deri Sanayisinde Kullanılan Proteazlar .....	26
1.2.9.3. İlaç Endüstrisinde Kullanılan Proteazlar .....	27
1.2.9.4. Gıda Endüstrisinde Kullanılan Proteazlar .....	27
1.2.9.5. Kozmetik Sanayisinde Kullanılan Proteazlar .....	28
1.2.9.6. Tekstil Sanayisinde Kullanılan Proteazlar .....	28
1.2.9.7. Atık İşleme Sanayisinde Kullanılan Proteazlar .....	29
1.2.9.8. Fotoğraf Endüstrisinde Kullanılan Proteazlar .....	29
1.3. PROTEAZ ÜRETEN BAKTERİLERDE BORUN YERİ .....	30
<b>2. MATERYAL VE METOD</b> .....	32
2.1. Materyal .....	32
2.1.1. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar .....	32

2.1.2. Proteaz Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Çözelti ve Tamponlar .	33
2.1.3. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar .....	35
2.1.4. Kullanılan Besiyerleri .....	37
2.2. Metod .....	41
2.2.1. Bakterilerin İzolasyonu .....	41
2.2.2. Proteaz Üretimini İçin En Uygun Bakterilerin Belirlenmesi .....	41
2.2.3. Bakterilerin Üreme Zamanları ve Bakterilerin Üreme Eğrileri.....	42
2.2.4. Bakterilerin En İyi Proteolitik Aktivite Gösterdiği pH Aralıklarının Saptanması.....	42
2.2.5. Bakterilerin En İyi Proteolitik Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerinin Saptanması .....	42
2.2.6. Seçilen İzolatların Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi .....	43
2.2.7. Proteaz Üretimi.....	46
2.2.8. Proteaz Aktivite Tayini .....	46
2.2.9. Tirozin Grafiğinin Hazırlanması.....	47
2.2.10. Üretim Yapılan Ortamın Başlangıç pH Değerinin Proteaz Enzim Üretimine Etkisinin Belirlenmesi .....	47
2.2.11. Proteaz Enzim Üretiminde İnkübasyon Sıcaklık Değerinin Proteaz Enzim Üretimine Etkisinin Belirlenmesi .....	47
2.2.12. Proteaz Enzim Üretiminde İnkübasyon Süresinin Etkisinin Belirlenmesi.....	48
2.2.13. Sodyum Tetraborat Dekahidrat' ın Proteaz Üretimine Etkisi .....	48
2.2.14. Farklı Karbon Kaynaklarının Proteaz Enzimi Üretimine Etkisi .....	48
2.2.15. Kromozomal DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayinin Belirlenmesi.....	49
2.2.16. 16S rDNA Geninin PCR ile Çoğaltılması.....	49
2.2.17. Agaroz Jel Elektrofrezisi.....	50
2.2.16. 16S rDNA Sekans Analizi ile Bakterilerin Tanımlanması ve Filogenetik Analizleri.....	50
<b>3. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>51</b>
3.1. Bakterilerin İzolasyonu .....	51
3.2. Proteaz Üretimini İçin En Uygun Bakterilerin Belirlenmesi .....	51
3.3. Bakterilerin Üreme Zamanları ve Bakterilerin Üreme Eğrileri.....	52



3.4. Bakterilerin En İyi Proteolitik Aktivite Gösterdiği pH	
Değerlerinin Saptanması .....	53
3.5. Bakterilerin En İyi Proteolitik Aktivite Gösterdiği Sıcaklık	
Değerlerinin Saptanması .....	53
3.6. İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları .....	53
3.7. Proteaz Aktivite Tayini .....	58
3.8. Tirozin Grafiğinin Hazırlanması .....	61
3.9. Proteaz Enzim Üretimine İnkübasyon Sıcaklığının ve Ortam	
Başlangıç pH Değerinin Etkisi .....	62
3.10. Proteaz Enzim Üretiminde İnkübasyon Süresinin Etkilerinin	
Sonuçları.....	67
3.11. Sodyum Tetraborat Dekahidrat' ın Proteaz Üretimine Etkisinin	
Sonuçları.....	68
3.12. Farklı Karbon Kaynaklarının Proteaz Enzimi Üretimine Etki	
Sonuçları.....	69
3.13. TK2 Adlı Suşun PCR ve 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması .....	71
3.14. TK2 Adlı Suşun Tanımlanması ve Filogenetik Analiz Sonuçları.....	72
3.15. TK3 Adlı Suşun PCR ve 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması .....	75
3.16. TK3 Adlı Suşun Tanımlanması ve Filogenetik Analiz Sonuçları.....	76
<b>4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>79</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>86</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Ekzopeptidazlar da etki sistemi.....	17
1.2. Aminopeptidazların sınıflandırılması ve etkileme yöntemleri.....	17
1.3. Karboksipeptidazların gruplandırılması ve etkileme yöntemleri.....	18
1.4. Endopeptidazların etki etme yöntemleri .....	19
1.5. Endüstride kullanılan proteazların oranları.....	24
3.1. (a) TK2 İzolatı Skimmilk Zon Görüntüsü.....	51
3.1. (b) TK3 İzolatı Skimmilk Zon Görüntüsü .....	51
3.2. (a) TK2 Üreme Eğrisi .....	52
3.2. (b) TK3 Üreme Eğrisi .....	52
3.3. (a) TK2 Gram Boyama .....	54
3.3. (b) TK3 Gram Boyama .....	54
3.4. Katalaz Testi.....	55
3.5. İndol Testi .....	55
3.6. Metil Kırmızısı Testi .....	56
3.7. Voges – Proskauer Testi .....	57
3.8. Sitrat Testi .....	57
3.9. Tirozin Standartı.....	61
3.10. (a,b,c,d) TK2’ de İnkübasyon Sıcaklığının ve Başlangıç pH Değerlerinin Proteaz Enzim Üretimine Etkileri.....	63
3.11. (a,b,c,d) TK3’ de İnkübasyon Sıcaklığının ve Başlangıç pH Değerlerinin Proteaz Enzim Üretimine Etkileri.....	65
3.12. (a) TK2 izolatının inkübasyon süresi – enzim ilişkisi.....	67
3.12. (b) TK3 izolatının inkübasyon süresi – enzim ilişkisi .....	68
3.13. TK2 Adlı Suşa Ait PCR Ürünlerinin Primer Bağlanma Sıcaklıkları.....	71
3.14. TK2 Adlı Suşa Ait PCR Ürünlerinin Farklı MgCl <sub>2</sub> Konsantrasyonları.....	72
3.15. TK2 Suşuna Ait Neighbour-Joining Yöntemiyle Oluşturulan Dendrogram.....	73

3.16. 16S rDNA Dizi Verileri Yardımıyla TK2 Suşu için Oluşturulan Türlerin Eşleştirme Değerleri.....	74
3.17. TK3 Adlı Suşa Ait PCR Ürünlerinin Primer Bağlanma Sıcaklıkları.....	75
3.18. TK3 Adlı Suşa Ait PCR Ürünlerinin Farklı MgCl <sub>2</sub> Konsantrasyonları.....	75
3.19. TK3 Suşuna Ait Neighbour-Joining Yöntemiyle Oluşturulan Dendrogram.....	77
3.20. 16S rDNA Dizi Verileri Yardımıyla TK3 Suşu için Oluşturulan Türlerin Eşleştirme Değerleri.....	78



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Enzimlerin Reaksiyonlarına Göre Sınıflandırılması .....	2
1.2. Enzimlerin Kullanım Alanları ve Oranlar .....	3
1.3. Alkalen Proteaz Üretilen Bazı <i>Bacillus</i> Türleri .....	10
1.4. Mikroorganizmaların Besin Kaynakları.....	14
1.5. Bir Mikroorganizmanın Bileşenleri .....	15
1.6. Endopeptidazların Sınıflandırılması .....	19
1.7. Dünya Üzerinde Deterjanlar için Elde Edilen Enzimler ve Kaynakları .....	26
1.8. Dünya Bor Rezervleri.....	30
3.1. Biyokimyasal Testler .....	53
3.2.(a) TK2 Proteaz Aktivitesi .....	59
3.2.(b) TK3 Proteaz Aktivitesi .....	60
3.3. Tirozin Grafiğinde Kullanılan Değerler.....	61
3.4. Sodyum Tetraborat Dekahidrat' ın Proteaz Üretimi Sonuçları.....	69
3.5. (a) Karbon Kaynağı Olarak Nişasta Kullanılan Besi Yerinin Proteaz Üretimine Etkisi .....	70
3.5. (b) Karbon Kaynağı Olarak Sakkaroz Kullanılan Besi Yerinin Proteaz Üretimine Etkisi .....	70

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
Asp	Aspartik asit
Atm	Atmosfer
ATP	Adenozin trifosfat
B	Bor
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Baz Çifti
C	Karbon
Ca <sup>2+</sup>	Kalsiyum
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum Klorür
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DFP	Diizopropilflorofosfat
dNTP	Deoksinükleotit Trifosfat
EC	Enzim Kod Numarası
EC-IUB	Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FSIS	Food Safety and Inspection Service
g	Gram
GRAS	Generally Recognized as Safe
HCl	Hidroklorik asit
HCN	Hidrosiyamik asit
His	Histidin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
IMVIC	Koliform grup bakterilerin ayrımı için kullanılan

	test sistemi
kDa	Kilo Dalton
$K_2HPO_4$	Dipotasyum Fosfat
KOH	Potasyum Hidroksil
MEGA	Molecular Evolutionary Genetic Analysis
$MgSO_4$	Magnezyum Sülfat
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MR	Metil Red Testi
N	Azot
N	Normalite
nm	Nanometre
N1	Kültürlerin Saklanmasıda Kullanılan Besi Yeri
NaCl	Sodyum Klorür
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksil
$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	Sodyum Tetraborat Dekahidrat
$Na_2CO_3$	Sodyum Karbonat
$Na_2HPO_4$	Sodyum Fosfat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	Optik Yoğunluk
PCR	Polymerase Chain Reaction - Polimeraz Zincirleme Tepkimesi
pmol	Pikomol
PMSF	Fenilmetilsulfonylflorid
rpm	Revolution per minute - Dakikadaki devir sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
Ser	Serin
TCA	Trichloro asetic asit
TE	Tris – EDTA
TLCK	Tosil-L-lizinkloro metil keton

vb	Ve benzeri
VP	Voges - Proskauer
3,4-DCI	3,4-dikloroizokumarin
$\mu$ l	Mikrolitre
$\mu$ g	Mikrogram



# 1. GİRİŞ

## 1.1. Enzimler

Enzimler protein yapılı olup canlıların vücut metabolizmasında gerçekleşen bütün kimyasal reaksiyonları düzenleyen katalizörlerdir. Enzimler peptid bağıyla bağlanmış olan aminoasitlerden oluşmuşlardır (Mahmoud et al. , 2005).

Tamamı proteinden oluşmuş enzimler olduğu kadar bir kısmı protein ve protein yapıda olmayan kofaktör veya koenzim olan enzimler de vardır. Bu grup enzimlere apoenzim denir. Kofaktör kısmı bazı metal iyonlarından (demir, çinko, kalsiyum vb.) oluşur. Koenzim ise  $NAD^+$  (nikotinamid adenin dinükleotit ) ya da  $NADP^+$  (nikotinamid adenin dinükleotit fosfat ) gibi organik yapılı moleküllerden meydana gelir. Apoenzim koenzim ya da kofaktör olmadan işlem yapamaz, ancak birlikte olurlarsa enzim faaliyetlerini uygulayabilirler. Eğer apoenzim kofaktör veya koenzimle birleşmiş halde aktiflik gösteriyorsa bunlara holoenzim denir (Tortora, 2009).

### 1.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimlerin tanımlanması ve gruplandırılması Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu (EC-IUB) tarafından enzimin katalizleme yaptığı reaksiyona göre düzenli bir numara ve adlandırma sistemi geliştirmiştir (Boyce and Tipton, 2005). Enzimler aşağıdaki Çizelge 1.1. Enzimlerin Reaksiyonlarına Göre Sınıflandırılması' nda olduğu gibi katalizledikleri reaksiyon tiplerine göre altıya ayrılır (Telefoncu ve Pazarlıoğlu 2010).



**Çizelge 1.1.** Enzimlerin Reaksiyonlarına Göre Sınıflandırılması

<b>Katalitik Reaksiyon</b>	<b>Grubunun Adı</b>
Oksidasyon-Redoks	Oksidoredüktazlar
Fonksiyonel Grup Transferi	Transferazlar
Hidroliz Reaksiyonları	Hidrolazlar
Grup Ayırma	Liyazlar
İzomerleşme	İzomerazlar
Sentezleme Reaksiyonları	Ligazlar

#### **1.1.1.1. Oksidoredüktazlar**

Oksidasyon fonksiyonlarını ve redoks reaksiyonlarını gerçekleştiren enzimlerdir.

#### **1.1.1.2. Transferazlar**

Bir substratta bulunan fonksiyonel grubun diğer substrata aktarılması işlemi yapan enzimlerdir.

#### **1.1.1.3. Hidrolazlar**

Kimyasal yapıları birbirine bağlayan ester, peptid ve glikozid vb. gibi bağların hidrolizini gerçekleştiren enzimlerdir. Amilaz, proteaz, lipaz ve fosfatazlar birer hidrolazdır.

#### 1.1.1.4. Liyazlar

Bir yapıda çift bağıın oluşmasında ve oluşun çift bağıa ek moleküllerin bağılanma reaksiyonlarını katalizlemekle görevli enzimlerdir. Karboksilazlar, dekarboksilazlar ve dehidratazlar bu sınıfın örnekleridir.

#### 1.1.1.5. İzomerazlar

Moleküllerin düzenlenmesinde, moleküllerin geometrilerinde ve yapılarında değışimleri uygulayan enzimleridir.

#### 1.1.1.6. Ligazlar

Moleküller arasında bulunan ATP' nin parçalanması sonucu ortaya çıkan enerji ile bağıları oluşturan enzimlerdir.

Enzimlerin kullanıldığı alanlar günümüzde çok geniştir. Yapılan çalışmalarla üretilen enzimlerin daha ekonomik olması ve daha etkili olabilmesi sağlanmaya çalışılmaktadır. Aşağıdaki enzimlerin Çizelge 1.2.' de kullanıldıkları alanların oranları belirtilmiştir.

**Çizelge 1.2.** Enzimlerin Kullanım Alanları ve Oranları

<b>Kullanılan Alanlar</b>	<b>Bulunma Oranları (%)</b>
Gıda	45
Deterjan	34
Tekstil	11
Deri	3
Kağıt	1
Diğer Alanlar	6

### 1.1.2. Enzimlerin Kaynakları

Enzimlerin kaynaklarını hayvanlar, bitkiler, mantarlar, algler ve mikroorganizmalar gibi bütün canlı grupları enzimlerin kaynağını oluştururlar (Sengupta, S. and Dasgupta, M., 2006).

Hayvanlardan üretilen enzimler genellikle domuzların ve geviş getirenlerin midesinden, karaciğer ve pankreas gibi organlarından elde edilir (Kaul-Hatti, 2004; Bulut, 2007). Bitkilerin ise dokularından ve özellikle özsu kısımlarından üretilen enzimler kullanılmaktadır. En geniş kullanılan enzim kaynağı mikrobiyal kaynaklardan elde edilir. Çünkü mikrobiyal kaynaklardan elde edilen enzimler diğer enzim kaynaklarından hem daha hızlı üreme hem daha fazla miktarlarda hem de ekonomi açısından daha avantajlıdır. Ayrıca yapılan çalışmalar göstermiştir ki mikrobiyal kaynaklı enzimlerin diğer enzim elde edilen kaynaklara göre daha yüksek aktivite değerlerine ulaştığı belirlenmiştir (Kaul-Hatti, 2004). En fazla üretilen ve kullanılan mikrobiyal kaynaklı enzimler arasında proteaz, lipaz, glikoamilaz, glikoizomeraz ve  $\alpha$ -amilaz gösterilebilir. Dünyada endüstriyel olarak uygulanan en önemli enzim sınıfı % 60 civarında kullanılan proteolitik enzim grubudur. İkinci olarak % 28 pay ile karbohidratazlar, %3 oranla lipazlar ve %9 ile diğer enzimler kullanılmaktadır (Wiseman, 1987).

### 1.2. Proteazlar

Diğer adları proteolitik enzimler olan proteazlar proteinlerin yapıtaşı olan aminoasitleri birbirine bağlayan peptit bağlarının parçalanmasında görevli enzim grubudur. Bütün canlı organizmalarının genlerinin genellikle % 2'si proteazlar tarafından kodlanır ve canlıların yaşamlarını devam ettirmelerinde önemli role sahiptirler (Southan, 2001).

Proteazlar proteinleri parçalayarak hücre içine alınabilecek kadar küçük moleküllerin oluşmasını sağlarlar (Salleh *et al.* 2006; Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2009).

Genel olarak proteazlar yiyeceklerde bulunan proteinlerin parçalanarak sindiriminde, hücre içinde bulunan proteinlerin geri dönüşümünün sağlanmasında, kanın pıhtılaşması olayında, vücut savunması için gerekli olan antijenlerin oluşturulmasında ve birçok çeşitli proteinin aktifleştirilmesi gibi biyolojik işlemlerde önemli görevleri üstlenir (Polaina J., MacCabe A. P., 2007.).

Proteaz terimi 'IUBMB' (Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği) tarafından enzimlerin isimlendirilmesi oluşturulmuş olan 6 sınıftan oluşan EC (Enzim Kod Numarası) sistemine göre EC 3 (HİDROLAZLAR) sınıfında ve proteinlerdeki peptid bağlarını parçaladıkları içinde EC 3.4 (PROTEAZLAR) alt sınıfında belirtilmiştir (Mahler, R.H., H., Cordes, 1966) (Tekin, 2008). Fakat proteazlar diğer enzimler gibi sınıflandırılmamaktadır. Bunun nedeni de etki mekanizmalarının diğer enzim gruplarına göre çok geniş olması ve yapılarının çok çeşitlilik göstermesidir. Bu yüzden proteazlar üç ana etmene göre göre sınıflandırmaya tabi tutulmuştur. Bunlar;

Katalizledikleri bölgelerin kimyasal yapıları,  
Katalizleme yaptıkları farklı reaksiyon tiplerine ve  
Proteazların yapılarının geçmiş bilgilerle ilişkisine göre (Tekin, 2008).

### **1.2.1. Proteazların Sınıflandırılması**

Proteazlar oluştukları kaynaklara göre, gösterdikleri katalitik aktifliklerine göre ve aktifliği sağlayan aktif bölgelere göre üçe ayrılır. Kaynaklarına göre bakıldığında hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklı proteazlar olarak üçe ayrılır. Katalitik aktifliğine göre de endo - ekzoproteazlar diye ikiye ayrılır. Ekzoproteazlar da kendi içinde amino - karboksipeptidaz şeklinde ikiye ayrılır. Endoproteazlar ise serin, sistein, aspartik, metallo ve katalitik mekanizma sistemi bilinmeyenler şeklinde kendi içinde beşe ayrılır (Chaplin et al, 1990.Rao et al, 1998, Tanksale, 2001).

### **1.2.1.1. Kaynaklarına Göre Proteazlar**

Proteazlar kaynaklarına göre 3'e ayrılır:

- 1- Hayvansal Proteazlar
- 2- Bitkisel Proteazlar
- 3- Mikrobiyal Proteazlar

#### **1.2.1.1.1. Hayvansal Proteazlar**

Hayvansal proteaz sınıfı enzimlerin öğrenildiği ilk günden bugüne kadar bilinmektedir. İlk bilinen hayvansal proteazlar ise proteinleri parçalama özellikleri tespit edilen pepsin ve pankreas proteazlarıdır. Bugün ise en çok bilinen hayvansal proteazlar; pepsin, renin, kimotripsin ve pankreatik tripsin'dir. Hayvansal kaynaklı proteazlar genel olarak protein hidrolizatlarının üretiminde, et ve balık türevlerinin atıklarının temizlenmesinde, deri sanayisinde, gıda endüstrisinde ve tıp alanında kullanıldıkları görülmektedir (Rao et al, 1998).

Pepsin, gıdalarda bulunan proteinlerin peptit bağlarını parçalayarak sindirilmesini sağlayan ve canlıların midelerindeki hücreler tarafından sentezlenen bir proteaz çeşididir. (<https://tr.wikipedia.org/wiki/Pepsin>, 2016)

Tripsin, canlıların ince bağırsağında proteinleri parçalayan ve pankreastan salgılanan bir proteaz enzimidir. Bazı tıp uygulamalarında ve bakteri ortamlarının oluşturulmasında kullanılır.

Kimotripsin, genelde pankreatik ekstraktlarda bulunur ve proteoliz olayında görevlidir. Ayrıca kimotripsin bir serin proteazdır. Peptit bağlarını karboksil gruplarından hidroliz eder. Pahalı bir enzim grubu olduğu için sadece sütlerdeki proteinlerin hidrolizatlarının parçalanmasında kullanılır (Rao et al, 1998).

Renin, bütün memelilerin midesinde doğal olarak üretilen, görevi anne sütünün sindirilmesi ve sütün pıhtılaştırılması olan proteaz enzim grubudur. Renin enzimi için

en bilinen kaynak olarak yeni doğmuş ve sütle beslenmiş olan bir buzağının midesinde bulunan şirden bölümüdür (Fankhauser, 2007). Süt üretiminde genelde kazeinin çöktürülmesi işlevinde ve lor peynirinin üretim aşamasında kullanılır (Rao et al, 1998).

#### **1.2.1.1.2. Bitkisel Proteazlar**

Bir bitkinin proteaz kaynağı olarak kullanılabilmesi için yetiştiği toprağın enzim üretimi için uygunluğu ve bitkinin yetiştiği iklim koşulları gibi etmenler önem kazanır. Bu proteazlar aktif merkezlerinde bulunan sülfidril grupları ile diğer enzimlerden ayırt edilir. Bitkisel kaynaklı proteazların aktivitesinden bu sülfidril grupları görevlidir (Uhlig, 1998).

Genellikle bu proteazlar tropikal bitkilerden elde edilir. En bilinen bitki kaynakları ise; Papaya (*Carica papaya*), enginar (*Cynera cardunculus*), ananas (*Anana sativa*), soya fasulyesi (*Soya hispida*) (Ward, 1985).

Bitkisel kaynaklı proteazların en iyi bilinenleri ise papain, bromelain, keratinaz ve fisin'dir (Rao et al, 1998).

Bitkisel kaynaklı enzimler gıda endüstrisinde birçok uygulamada kullanılmaktadır. Günümüzde FSIS (Food Safety and Inspection Service) tarafından onaylanan ve GRAS (Generally Recognized as Safe) 'a göre uygunluğu kabul edilen hücre dışı kaynaklı beş enzim bulunmaktadır ve bu enzimlerin tamamına yakını bitkisel kaynaklıdır (Katsaros et al, 2010; Zhao et al, 2012).

Aktinidin ve zingibain enzimleri de şuan da üzerinde çalışma yapılan diğer bitkisel enzimlerdir. Papain papaya bitkisinin lateks kısmından, fisin incir meyvesinden, aktinidin enzimi kividenden, zingibain zencefilin rizom kısmından, bromelain enzimi de ananas ve ananasın kökünden elde edilir (Ha et al, 2012; Katsaros et al, 2009; Zare et al, 2013).

#### **1.2.1.1.2.1. Papain**

En iyi bilinen ve uzun zamandır kullanılan bitkisel kaynaklı proteazdır. Ana vatanı olarak Hindistan, Güney Meksika, Orta Amerika ve Afrika'nın bazı ülkeleri kabul edilir. (<https://tr.wikipedia.org/wiki/Papaya>,2016) Papain enzimi genel olarak pH 5.0 - 9.0 aralığında aktivite gösterir ve 80-90 °C'a kadar kararlılık gösterir.1879 yılında ilk olarak tespit edilmiş ve izole edilerek kültür işlemleri yapılmaya başlamıştır (Drenth et al, 1968), (Kamphuis et al. 1984), (Rao et al, 1998).

#### **1.2.1.1.2.2. Bromelain**

Bu enzim ananas ağacının kendisinden, öz suyundan ve kökünden elde edilen bir proteaz'dır. Bromelain enzimi sistein proteazı olarak ayırt edilmiştir. Bu enzimin görevleri arasında mide asidine yardım etmek, hazımı kolaylaştırmak ve bağırsaklarda uygun ortamın sağlanmasında olumlu etkiler oluşturmak yer alır. En iyi aktiviteyi pH 5.0 – 9.0 aralığında göstermektedir. Sıcaklık kararlılığı papainden daha düşüktür. Sıcaklık 70 °C'a ulaştığında bromelain enzimi inaktif olur. Bromelain enziminin en büyük üreticisi Great Food Biochem. (Bangkok, Thailand)'tir (Rao et al, 1998).

#### **1.2.1.1.2.3. Keratinaz**

Atık su kanallarının temizlenme işleminde, yapısı keratin olan kıl, tüy vb. maddelerin uzaklaştırılmasında ve temel aminoasitlerin üretiminde görev alır (Rao et al, 1998).

#### **1.2.1.1.2.4. Fisın**

İncir meyvesinden elde edilir. Diğer bitkisel kaynaklı enzimlerle karşılaştırıldığında daha fazla proteaz aktivitesine sahiptir (Uhlig, 1998).Ancak enzimin eldesinde uygulanan kurutma işlemi proteaz aktivitesinin büyük bölümünün kaybedilmesine

neden olur. Fisın enziminin genellikle etkili olduğu bağlar yükü olmayan ve aromatik aminoasitler ierenleridir. Fisın enzimi aktivite gösterdiği pH aralığı genellikle 4.0 - 9.5 arasındadır. En iyi aktif olduğu pH ise 6.5' tur.

#### **1.2.1.1.3. Mikrobiyal Proteazlar**

Dünya da en fazla kullanılan proteaz kaynağı mikrobiyal (bakteri, fungus ve virüs) kaynaklı proteazlardır. Bunun temel nedeni de dünyada enzim endüstrisinin hammadde ihtiyacını bitkisel ve hayvansal kaynaklar tarafından karşılayamaması, kaynaklardan izolasyon sırasında sorunlarla karşılaşılması, diğer kaynaklara göre mikrobiyal kaynaklı proteazların daha saf olarak elde edilmesi, üretim için gerekli kültür ortamının daha kolay sağlanabilmesi ve mikrobiyal proteazların genetik çalışmalarla aktivitelerinin artırılabilmesi gibi nedenler mikrobiyal proteazların daha fazla kullanılmasında tercih edilmelerinin sebebidir (Rao et al, 1998, Mathew, 1999, Kıran ve ark. 2006). Bu gibi nedenlerle dünyada enzim pazarının % 40' nı mikrobiyal kaynaklı proteazlar oluşturur (Rao et al, 1998, Sarı, 2011).

Mikrobiyal proteazların sınıflandırılması enzimlerin aktif merkezleri, etki sistemleri ve substratlarına (jelatinaz, keratinaz, kazeinaz vb.) göre sınıflandırılır (Sevinç, 2010).

#### **1.2.1.1.3.1. Bakteriyal Proteazlar**

Ticari olarak bakteriyal kaynaklı mikrobiyal proteazların çok azı kullanım için uygundur. Bu proteazların üretimi için en fazla *Bacillus* cinsi türleri kullanılmaktadır. *Bacillus* cinsi bakteriler genel olarak nötral ve alkalen proteaz üretiminde üretilmektedir.

Bakteriyal proteazların en iyi aktif olduğu değerler pH 5.0 – 8.0 aralığı ve düşük sıcaklıklardır. Uygulama yapılan ürüne bakılarak diğer proteaz kaynaklarına göre



daha az acı tat bırakmasından dolayı nötral proteazlar gıda endüstrisinde daha fazla kullanılmaktadır (Tekin, 2008). *Bacillus* cinsi bakterilerde serin alkalen proteaz üretilir ve bu yüzden alkali özellik gösterir (Sevinç, 2010) . Alkalen proteaz üretiminde kullanılan bazı *Bacillus* türleri aşağıdaki Çizelge 1.3.' de verilmiştir.

**Çizelge 1.3.** Alkalen Proteaz Üretilen Bazı *Bacillus* Türleri (Kumar C. G., Takagi H., 1999).

<i>Bacillus</i> spp. ve suşları
<i>Bacillus alcalophilus</i> ATCC 21522
<i>B. alcalophilus</i>
<i>B.alcalophilus</i> subsp. <i>halodurans</i> KP1239
<i>B. amyloliquefaciens</i>
<i>B.circulans</i>
<i>B.coagulans</i>
<i>B.firmus</i>
<i>B.intermedius</i>
<i>B. lentus</i>
<i>B. licheniformis</i>
<i>B. proteolitycus</i>
<i>B. pumilus</i>
<i>B. sphaericus</i>
<i>B. subtilis</i>
<i>B. subtilis</i> var. <i>Amylosacchariticus</i>
<i>B. thrungiensis</i>
<i>Bacillus</i> sp. Ya-B
<i>Bacillus</i> sp. NKS-21
<i>Bacillus</i> sp. B21-2
<i>Bacillus</i> sp. Y
<i>Bacillus</i> sp. CW-1121
<i>Bacillus</i> sp. KSM-K16
<i>Bacillus</i> sp. MK5-6

Bakteriyal kaynaklı proteaz üretiminde genellikle *Bacillus* cinsi daha fazla kullanılmakla birlikte *Alcaligenes faecalis* (Thangam and Ranjkumar, 2002), *Proteus vulgaris* (Brady et al, 1994), *Pseudomonas aeroginosa* (Bayoudh et al, 2000), *Pseudomonas fluorescens* (Kalaiarasi and Sunitha, 2009)' den de proteaz üretimi yapıldığı çalışmalarla kanıtlanmıştır.

Bakteriyal alkalen proteazlarda, alkalen proteazların belirlenmesinde kullanılan spesifik olan pH 10.0 da ve geniş substrat aralıklarında yüksek aktivite göstermeleri bakteriyal alkalen proteazların spesifikliğini tanımlar. Alkalen proteazların en uygun çalışma sıcaklığı 60 °C' tır (Deshpande et al, 1999, Rao et al, 1998).

#### **1.2.1.1.3.2. Fungal Proteazlar**

Bakteriyal kaynaklara göre enzim üretimi daha çeşitli olduğu görülür. Buna en iyi örnek *Aspergillus oryzae* verilebilir. *A. oryzae* asidik, nötral ve alkalen proteaz üretme yetenekleri vardır. Fungal proteazlar pH 4.0 – 11.0 gibi geniş aralıklarda aktif olurlar ve çok geniş substrat spesifiklikleri vardır. Fakat düşük sıcaklıklara tolerans göstermeleri ve düşük aktivitelelerinden dolayı üretim endüstrilerinde çok fazla kullanılmaktadır. Fungal asidik proteazlar genellikle dar pH aralıklarında ve düşük sıcaklık değerlerinde aktiflik gösterdiğinden dolayı çoğunlukla peynir endüstrisinde kullanılmaktadır. Fungal nötral proteazlar genellikle pH 7.0' de aktiflik gösterirler ve şelatlayıcı ajanlar (EDTA vb.) tarafından inhibe edilirler. Görevleri arasında peptid bağlarının hidrolizi, peptidaz özellikleri, gıda proteinlerinde acı tadın ortamdandan uzaklaştırılması gibi görevler yer alır. Gıda proteinleriyle ilgili çalışmalarda da fungal alkalen proteazlar kullanılmaktadır. (Deshpande et al 1999, Rao et al, 1998)

#### **1.2.1.1.3.3. Viral Proteazlar**

Viral kaynaklı proteazlar, virüs proteinlerinin işlenmesinde fonksiyonel görevlerinden dolayı oldukça önemlidirler. Genellikle virüslerin proteinlerinde replikasyon ve birleşim olaylarını yönetmek ve düzenlemekle görevlidir (Babe, L.M. , Craik C.S., 1997). Özellikle günümüzde de büyük sorunlara yol açan hatta ölümlere neden olan AIDS ve Kanser gibi ciddi ölümcül olan hastalıklara neden olan virüslerin proteinleriyle ilgili yapılan çalışmalardan dolayı viral proteazlar büyük önem kazanmıştır.

Birçok virüsün içerisinde serin, aspartik ve sistein peptidazlar bulunduğu bilinmektedir. Viral proteazların önemini proteazların üç boyutlu yapıları ve sentetik inhibitör ajanlarla etkileşime girmesi daha iyi açıklamaktadır (Babe, L.M. , Craik C.S., 1997, Rao et al, 1998, Deshpande et al, 1999).

### **1.2.2. Mikrobiyal Alkalen Proteazların Özellikleri**

Bugüne kadar yapılan mikroorganizmalarla ilgili çalışmalar ile mikrobiyal proteazların özellikleri ve enzimatik işlevleri gösterilmeye çalışılmıştır.

### **1.2.3. Mikrobiyal Alkalen Proteazlarda Optimum pH ve Sıcaklık**

pH olarak genellikle 9.0 – 11.0 aralıklarında en iyi aktiviteyi gösterir alkalen proteazlar. Farklı pH' larda çalışmakta olan enzimlerin de var olduğu bilinmektedir. pH 6.0 – 12.0 aralığında genelde kararlılık gösterirler ve izoelektrik noktaları yüksektir.

Çalışma sıcaklıkları ise 50 - 70 °C arasında değişmektedir. Bunların dışında daha yüksek sıcaklıklarda aktifliğini kaybetmeden çalışmaya devam eden alkalen proteazlar da bulunmaktadır. Örnek olarak, *Bacillus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Thermus sp.* verilebilir. Bu türler oldukça yüksek sıcaklıklarda kararlılıklarını korumaktadırlar ve buldukları ortama her  $Ca^{2+}$  ile sıcaklık kararlılıkları giderek artar (Kumar C. G., Takagi H., 1999).

### **1.2.4. Mikrobiyal Alkalen Proteazlarda Moleküler Ağırlık**

Molekül ağırlıkları çoğunlukla farklılıklar göstermektedir. Çoğu 15-30 kDa aralığındadırlar. Fakat yapılan çalışmalarda molekül ağırlıklarının 31.6 kDa (Freeman et al., 1993), 33 kDa (Larcher et al., 1996), 36 kDa (Tsuji et al., 1990)

ve 45 kDa (Kwon et al., 1994) olabildiği gösterilmiştir. (Kumar C. G., Takagi H., 1999). Yapılan bir çalışmada da *Kurthia spiroforme*' den elde edilen bir proteolitik enzimin molekül ağırlığı 8 kDa olarak tespit edilmiştir (Steele et al, 1992).

#### **1.2.5. Mikrobiyal Alkalen Proteazlarda Substrat Özgüllüğü**

Mikrobiyal alkalen proteazlar hem doğal proteinlere hem de sentetik olarak elde edilen proteinler üzerine etkilidir ancak bu etkilerin reaksiyon hızları birbirinden farklıdır. Örnek olarak alkalen proteazın kazeine karşı gösterdiği aktivite hemoglobinin veya serum albümine göre daha fazladır (Tsai et al, 1988).

#### **1.2.6. Mikrobiyal Alkalen Proteazların Üretim Safhası**

Endüstride kullanılmak istenen mikrobiyal kaynaklı enzimlerin elde etmek için ilk önce gerekli mikroorganizmayı doğal ortamından izole etmektir. Daha sonra izole edilmiş olan mikroorganizmalar agar plak yöntemlerine göre mikroorganizmanın protein parçalama yeteneklerini incelenir. Bu işlem esnasında besi ortamında enzimin aktivitesini düşürebilecek etmenlerin ve ajanların olmaması gerekir. Mikroorganizmaların bu besi ortamlarında aktivitesini artırmak için substrat olarak kazein, hemoglobin, bovin serum albümin gibi proteinler eklenebilir (Sumantha et al, 2006).

#### **1.2.7. Mikrobiyal Alkalen Proteaz Beslenme**

Bir hücrenin büyüebilmesi ve çoğalabilmesi için besine ve enerjiye ihtiyaç duyar. Mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu bu besin ve enerji alındığı kaynaklara göre gruplara ayrılır (Çizelge 1. 4.) (Waites et al, 2001).

**Çizelge 1. 4.** Mikroorganizmaların Besin Kaynakları

<b>FİZYOLOJİSİ</b>	<b>ENERJİ KAYNAĞI</b>	<b>ELEKTRON KAYNAĞI</b>	<b>KARBON KAYNAĞI</b>
<b>Fotoototrof</b>	Işık		
<b>Kemoototrof</b>	Kimyasal Enerji		
<b>Organotrof</b>		Organik Bileşikler	
<b>Litotrof</b>		İnorganik Bileşikler	
<b>Ototrof</b>			CO <sub>2</sub>
<b>Heterotrof</b>			Organik Bileşikler
<b>Kemoorganotrof</b>	Organik Bileşikler	Organik Bileşikler	Organik Bileşikler
<b>Fotoorganotrof</b>	Işık	Organik Bileşikler	Organik Bileşikler
<b>Fotolitotrof</b>	Işık	İnorganik Moleküller	CO <sub>2</sub>
<b>Kemolitotrof</b>		İnorganik Moleküller	CO <sub>2</sub>

Mikroorganizmalar besinlerini bazı kimyasal elementlerden de alabilmektedir. Hidrojen, oksijen, karbon ve azot olarak bilinen makronütrientler mikroorganizmanın bulunduğu besi ortamı içerisinde litreye göre gram olarak bulunmalıdır. Makronütrientlerin yanında fosfor ve kükürt ile proteinler, nükleik asitler, lipidler ve polisakkarit gibi temel polimerlerin bileşenlerini oluştururlar (Waites et al, 2001).

**Çizelge 1. 5.** Bir Mikroorganizmanın Bileşenleri

<b>Su</b>	<b>% 70-80</b>
<b>Protein</b>	<b>% 15-18</b>
<b>Polisakkarit</b>	<b>% 1-3</b>
<b>Lipid</b>	<b>% 1-2</b>
<b>Nükleik Asitler</b>	<b>% 3-7</b>

#### **1.2.7.1. Makronütrientler**

Endüstriyel fermantasyon işlemleri heterotrofik özellikli mikroorganizmalar ile uygulanır. Heterotrofik fermantasyonlar da enerji kaynağı olarak fermantasyonlarda önemli yere sahip olan karbonlar kullanılır. Bu nedenle fermantasyon işleminde karbona sürekli ihtiyaç gereksinimi vardır. Genellikle enerji ve karbon kaynağı olarak şeker kullanılır.

Mikroorganizmalar diğer önemli olan makronütrientlerden oksijen ve hidrojen gereksinimlerini sudan ve organik bileşiklerden elde ederler. Bir diğer makronütrient ise azotdur ve bir mikroorganizmanın yaklaşık %15' ni oluşturur.

Genel olarak proteinler ve nükleik asitlerin yapısında yer alırlar. Mikroorganizmanın bir besi ortamında yaklaşık litrede 1-2 g azot kaynağına ihtiyaç duyar. Besi ortamlarında kullanılan azot kaynakları ise amonyum tuzları, amino asitler, nitrat ve üre kullanılmaktadır (Waites et al, 2001).

#### **1.2.7.2. Minor Elementler**

Minor elementlerden olan fosfor fermantasyon sürecine pH tamponu ile fosfat iyonları halinde ilave olurlar. Fosfor elementi karbon olaylarında gerekli ürünlerin, nükleik asitlerin, ATP VE NADP gibi bileşiklerin oluşumunda görevlidir. Diğer minor element kükürt ise içerisinde kükürte sahip olan sistein ve metiyonin gibi

amino asitler ve vitaminlerin bir kısmının üretiminde görevlidir. Kükürt fermantasyon işlemlerine kükürt tuzu ya da sülfat halinde dahil olur.

Mikroorganizmanın daha az gereksinim duyduğu minor elementler kalsiyum, potasyum, demir, magnezyum'dur. Potasyum elementi proteinlerin sentez işlemlerinde, demir elementi sitokromlar için ve magnezyum elementi de ribozomların denge seviyelerine ulaşmasında görevi olan enzimler için özgül görevleri vardır (Waites et al, 2001).

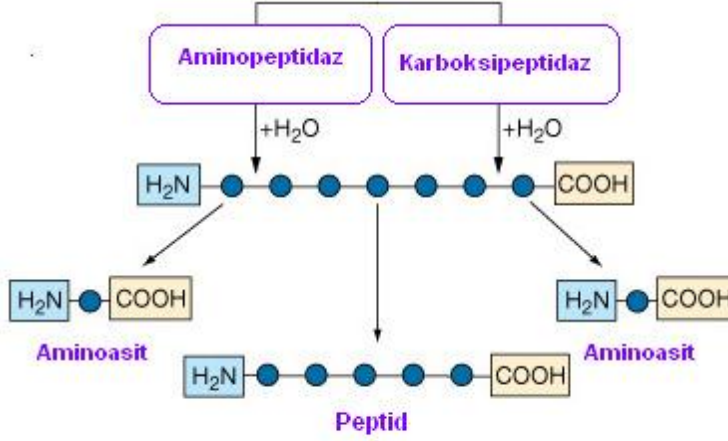
### **1.2.7.3. İz Elementler**

Besi ortamlarında mikroorganizma için çok çok az miktarda fakat kesin gerekli olan bakır, çinko, kobalt, molibden, mangan, nikel, selenyum gibi elementler iz elementidir. Her mikroorganizma farklı besinlere ihtiyaç gösterir.

### **1.2.1.2. Katalitik Aktifliklerine Göre Proteazlar**

#### **1.2.1.2.1. Ekzopeptidazlar**

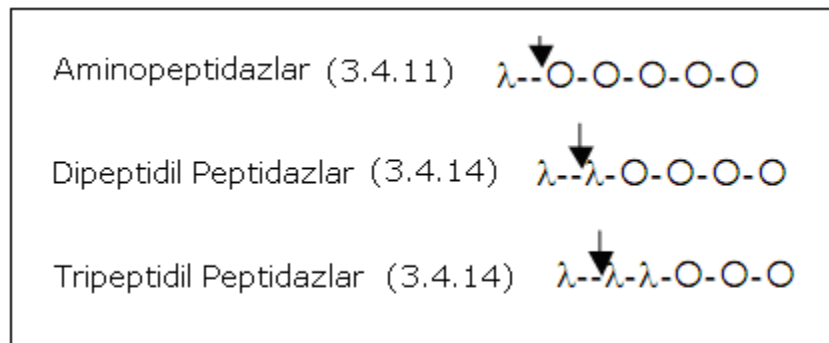
Ekzopeptidazlar proteinlerdeki peptid bağlarının sonundaki bölgeleri etkiler. Amino grubu ve karboksil grubuna etki etmesine göre aminopeptidaz ve karboksipeptidaz olarak iki bölüme ayrılır.



Şekil 1.1. Ekzopeptidazlar da etki sistemi (Silverthorn, 2004).

#### 1.2.1.2.1.1. Aminopeptidazlar

Aminopeptidazlar peptid zincirlerinde N (amino) ucunu etkiler. Bu enzimler katalizledikleri bir tek aminoasite, dipeptid zincire veya tripeptid zincire göre isimlendirilir ve aminopeptidaz, dipeptidil peptidaz ve tripeptidil peptidaz isimlerini alırlar. *A.oryzae* bakterisinin ürettiği aminopeptidaz hariç olmak üzere diğer bütün aminopeptidazlar hücre içinde üretilmektedir (Rao et al, 1998).



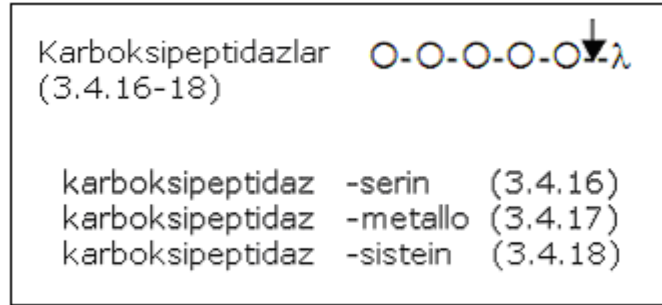
Şekil 1.2. Aminopeptidazların sınıflandırılması ve etkileme yöntemleri (Tanksale, 2001).



### 1.2.1.2.1.2. Karboksipeptidazlar

Bir polipeptid zinciri üzerinde bulunan C (karboksil) ucunu etkileyerek bu bölgede bulunan bir aminoasidi veya dipeptidin zincirden ayrıştırılmasında görevlidirler. Karboksipeptidazlar enzimde aktivite gösterdikleri bölgede bulunan amino aside göre kendi içinde serin karboksipeptidazlar, metallo karboksipeptidazlar ve sistein karboksipeptidazlar olmak üzere üçe ayrılır.

Serin karboksipeptidazlara örnek olarak *Penicillium* sp. , *Saccharomyces* sp. ve *Aspergillus* sp. verilebilir. Metallo karboksipeptidazlara örnek olarak *Saccharomyces* sp. , ve *Pseudomonas* sp. vardır. Sistein karboksipeptidazlar ise aktivite gösterdiği bölgede sistein aminoasidi bulundurur (Rao et al, 1998).



**Şekil 1.3.** Karboksipeptidazların gruplandırılması ve etkileme yöntemleri (Tanksale, 2001).

Ekzopeptidazlar arasında bazı etki mekanizmaları kesin olarak açıklanamayan bir alt sınıf belirtilmiştir. Omegapeptidaz ismi verilen bu gruba Uluslararası Biyokimya ve Molekuler Biyoloji Birliği Adlandırma Komitesi E.C 3.4.19 kodunu vererek alt sınıf olarak belirtmiştir.

Omegapeptidazlar genellikle polipeptit zinciri üzerindeki N ve C uçlarında bulunan peptid bağlarını hidroliz etmesiyle karakterize olmuştur (Nduvimana et al., 1995).

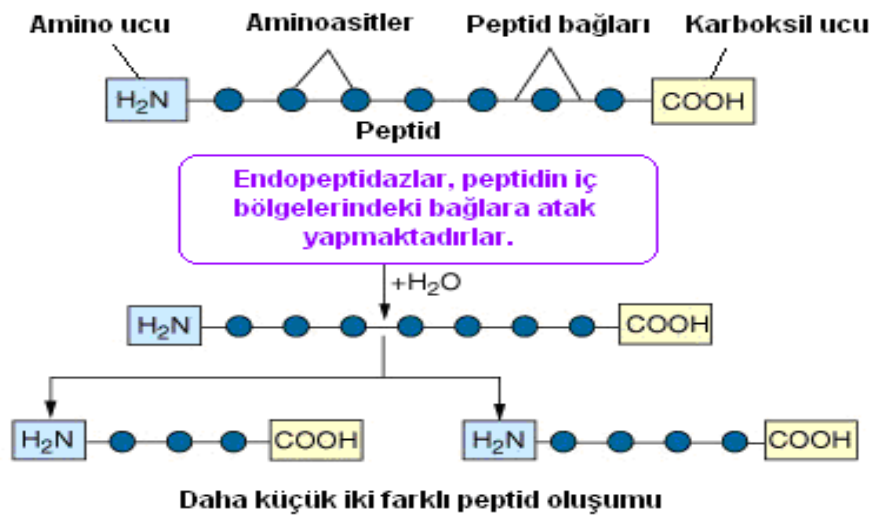
### 1.2.1.2.2. Endopeptidazlar

Endopeptidazlar bir polipeptid zincirinde bulunan amino ve karboksil uçlarının uzak kısmında ve polipeptid zincirinin iç bölgelerine etki ederler (Nduvimana et al, 1995). Endopeptidazlar katalizleme sistemlerine göre 1960 yılında Hartley tarafından yapılan sınıflandırma ile aşağıdaki gibi dört gruba ayrılır;

Çizelge 1.6. Endopeptidazların Sınıflandırılması (Hartley, 1960)

Serin	Proteazlar	(E.C. 3.4.21)
Sistein	Proteazlar	(E.C. 3.4.22)
Aspartat	Proteazlar	(E.C. 3.4.23)
Metallo	Proteazlar	(E.C. 3.4.24)

Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda katalizleme yöntemi bilinmeyen ayrı bir grup belirlenmiştir. Bu grubun ismi de Katalitik Mekanizması Bilinmeyen Endopeptidazlar olarak belirlenmiştir (Rao et al, 1998, Sevinç, 2010).



Şekil 1.4. Endopeptidazların etki etme yöntemleri (Silverthorn, 2004).

#### 1.2.1.2.2.1. Serin Proteazlar

Bu proteazlar buldukları yerdeki aktiflik gösterdikleri bölgelerde serin grubunun varlığı ile karakterize edilirler. Burada serin grubu substrat kısmı ile kovalent bağla birleşen kısımdır (Nduvimana et al, 1995).

Bu proteaz grubu pH olarak 7.0 – 11.0 aralığında değer istemesinden nötr ve alkali pH' larda aktiflik göstermesine rağmen özellikle *Bacillus* sp. bakterilerinden elde edilen serin proteazlarda ise uygun pH olarak 10-12.5 olduğu görülmektedir (Shimogaki et al, 1991).

Genellikle geniş substrat sınırlarına sahip olan serin proteazların molekül ağırlıkları genellikle 18-35 kDa arasındadır. Fakat *Bacillus* sp. bakterisiyle yapılan çalışmalarda 90 kDa molekül ağırlığı hesaplanmıştır (Kato et al, 1992, Walsh, 2002). Ayrıca *Blakeslea trispora*' dan elde edilen serin proteazların molekül ağırlıkları ise 126 kDa olarak tespit edilmiştir (Rao et al, 1998).

Serin proteazlar için DFP (diizopropilflorofosfat), TLCK (tosil-L-lizinkloro metil keton) 3,4-DCI (3,4-dikloroizokumarin) ve PMSF (fenilmetilsulfonilflorid) en iyi bilinen inhibitör ajanlarıdır. Aktiflik gösterdikleri bölgede hidrojen bağı ile bağlanmış aspartik asit (Asp), serin (Ser) ve histidin'den(His) oluşan yapıları mevcuttur. Bu üçlü yapılar ile karakterize edilirler. En iyi bilinen serin proteaz çeşitleri ise lipaz, tripsin, kimotripsin, triptaz, elastaz, trombin ve fosfolipazdır (Rao et al, 1998). Serin proteazlar iki önemli gruba ayrılır. Bunlar, serin alkalen proteazlar ve subtilisinler' dir.

##### 1.2.1.2.2.1.1. Serin Alkalen Proteazlar

Bu proteazları çok sayıda bakteri, fungus ve maya üretir. En iyi aktifliği pH 10.0' da gösterirler. pH 9.0 izoelektrik noktasına sahiptirler. Serin alkalen proteazlar bazı *Bacillus* sp., *S.cerevisiae*, *Conidobolus* spp., *Aspergillus* spp. ve *Neurospora* spp. türleri aracılığıyla üretilmektedir (Rao et al, 1998).

#### **1.2.1.2.2.1.2. Subtilisinler**

Serin proteazların ikinci grubudur. Carlsberg subtilisin ve Novo subtilisin olarak ayrı ayrı iki farklı çeşit tespit edilmiştir. Linderstrom, Lang ve Ottesen 1947' de subtilisin Carlsbergi, *Bacillus licheniformis* türünden üretmişlerdir. Subtilisin Novo ise *Bacillus amyloliquefaciens* türünden üretilmektedir. Özellikle subtilisin Carlsberg deterjan sanayisinde çok yoğun şekilde kullanılmaktadır. Ortak olarak iki subtilisin çeşidi de sıcaklık değeri 60 °C ve pH olarak da 10.0 değerinde en iyi aktiviteyi gösterir (Rao et al, 1998).

#### **1.2.1.2.2.2. Sistein(Tiol) Proteazlar**

Tiol proteazlar olarak da bilinirler. Bütün prokaryotik ve ökaryotik canlılarda bulunurlar. Bu proteazların aktif oldukları bölgede bulunan sistein, histidin, aspartik asitten oluşan bir üçlü yapı bulunur. Bu yapı ile karakterize olurlar. Sistein proteazlar hidrosiyamik asit (HCN) ve sistein varlığında aktif olurlar. Sistein proteazın en iyi bilineni papain' dir. Genel olarak nötral pH ' larda en iyi aktiviteyi gösterirler (Deshpande et al, 1998, Genckal, 2004).

#### **1.2.1.2.2.3. Aspartik Proteazlar**

Asidik proteazlar olarak adlandırılırlar. Aktivitelerini aspartik asit üzerine etki gösteren proteazlardır. Pepsin, retropepsin ve pararetrovirüslere ait enzimler ile üç ana grupta toplanmışlardır. Aspartik proteazların birçoğu optimal aktiviteyi pH 3.0-4.0 gibi minimal değerlere göre değişiklik gösterir. Aspartik proteazların molekül ağırlıkları da 30 – 45 kDa arasındadır. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Neurospora* ' nın ürettikleri pepsin gibi olan enzimler ve *Endothia* ve *Mucor spp.* ' nin ürettiği renin gibi olan enzimler olarak iki kısma ayrılırlar (Deshpande et al, 1998). En bilinenleri pepsin, renin, katepsin D ve E' dir.

#### 1.2.1.2.2.4. Metallo Proteazlar

Çinko, kobalt, manganez, bakır, nikel veya diğer metaller aracılığıyla katalizleme yapabilen endoproteazlardır (Metzler, 2001, Polaina J., MacCabe A. P., 2007). Tanımlanan yaklaşık otuz kadar sınıfı bulunmaktadır.

EDTA vb. gibi ajanlarla inhibe edilmektedirler. Kendi içerisinde nötral, alkali, myxobacter I ve II şeklinde dört bölüme ayrılır. Metallo proteazlardan en bilinenleri arasında hücre matrikslerinde bulunan serralysin, adamalysin ve hücre zarının yapısına katılan zar proteinleri olan ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) proteinler yer alır (Edwards et al, 2008, Nduvimana et al, 1995; Rao et al, 1998).

#### 1.2.8. Alkalen Proteaz Üretimi İçin Gerekli Etmenler

Proteaz enzimini elde etmek için mikroorganizmalar için oluşturulan besiyerlerinin karbon ve azot bakımından zengin olması gereklidir. Besi ortamlarında kullanılan karbonlar arasında nişasta (Sinha and Satyanarayana, 1991, Ferrero et al, 1996), glikoz (Sinha, N. and Satyanarayana, T., 1991; Gessesse, A., and Gashe. B:A., 1997) ve laktoz (Sumantha et al, 2006) yapılan çalışmalar sonucunda enzim aktivitesini artırdığı belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalar ışığında 1981 yılında Long ve arkadaşlarının çalışmalarının sonucu olarak daha kolay metabolize olabilen (glikoz vb.) karbon kaynaklarının proteaz enzimi üretiminde negatif bir etki ile enzim aktivitesini düşürdüğü ortaya çıkarılmıştır. Diğer bir çalışmada ise *Bacillus licheniformis* S40 türüyle yapılan çalışma sonunda früktoz alkalen proteaz enziminin üretiminde en elverişli kaynak olarak belirlenmiştir (Sinha, N. and Satyanarayana, T., 1991). Besi ortamlarında bulunabilecek karbonhidrat miktarının yükselmesi üretilen enzimin azalmasına neden olduğu anlaşılmaktadır (Sumantha et al, 2006).

Organik olarak elde edilen azot kaynaklarının inorganik olarak elde edilen azot kaynaklarından alkalen proteaz üretiminde daha etkili olduğu belirlenmiştir

(Mathew, 1999). Yapılan alışmalar göstermiştir ki alkalen proteaz enziminin üretim aşamalarında kullanılan yüksek inorganik azotlar üretimi baskıladığı belirlenmiştir (Heineken and O’Conner, 1972; Long et al, 1981; Fujiwara and Yamamoto, 1987). *Bacillus*’lar ile yapılan çalışmalarda da kullanılan izolösin ve prolinin proteaz enzim üretimine olumsuz etki yaptığı saptanmıştır (Sumantha et al, 2006).

Kültür ortamında enzim üretiminde ortama aşılan mikroorganizma miktarının önemli olduğu belirtilmiştir (Mathew, 1999). Sinha and Satyanarayana (1991)’ nın *Bacillus liceniformis* S40 türü ile yapmış oldukları çalışmada % 2 oranında aşılama yapmışlardır. Gaiju ve arkadaşlarının 1996 yılında *Bacillus coagulans* bakterisi ile yaptıkları deneylerde bakteri aşılmasının en uygun % 4 olarak belirlemişlerdir. Enzim üretimi için besi ortamının pH değeri üretimde önemli yere sahiptir (Mathew, 1999).

Bir enzimin kültür ortamı aracılığıyla üretilmesi ile ilgili yapılan çalışmalar da pH değerinin önemli bir etmen olduğu grlmştir (Mathew, 1999). Diğer önemli bir etmen ise kültür ortamının sıcaklığıdır. Daha önce yapılan çalışmalarda her farklı bakterinin uygun sıcaklıkta daha iyi geliştiği ve ürediği belirlenmiştir. Sinha and Satyanarayana, 1991 yılında *Bacillus liceniformis* S40 ile yaptıkları alkalen proteaz enzim deneylerinde uygun sıcaklığın 35 C olduğunu belirtmişlerdir. Chang 1988 yılında yaptığı deneylerde *Bacillus subtilis* için 37 C sıcaklığını kullanmıştır. Tusijibo 1990’ da *Nocordiopsis dassonvillei* ile Cheong’ un 1993’ de *Pseudomonas* sp. SJ320 türleriyle yapmış oldukları çalışmalarda sıcaklığın 20-27 C olduğunu göstermişlerdir. Misuzawa 1969’ da *Streptomyces rectus* var. *Proteolyticus*’ un uygun sıcaklığı olarak 50 C olarak belirlemiştir.

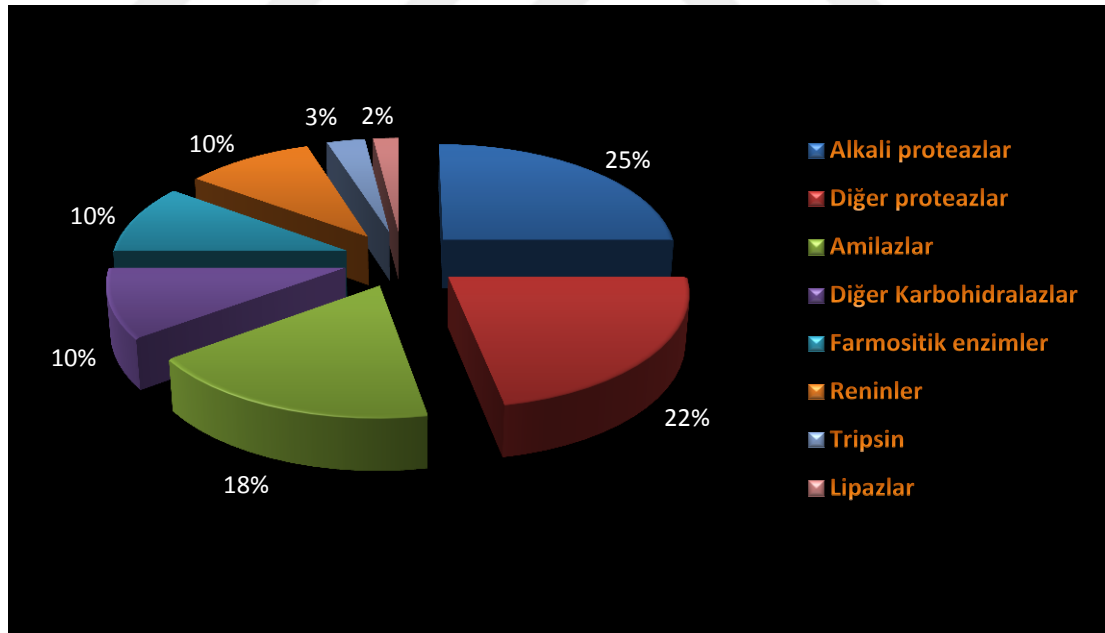
### **1.2.9. Endüstride Proteazların Kullanıldığı Alanlar**

Günümüzde proteazlar dünya genelinde ki enzimlerin yaklaşık % 60’ nı oluşturur ve bu da proteazların endüstride kullanılan enzimler arasında en önemli enzim grubu olduğu kanıtlar niteliktedir (Laxman et al, 2005). Proteazlar en geniş çalışma alanı olarak deterjan üretiminde, gıda ve besin sanayisinde, tekstil sanayisinde, deri

sanayisinde, ilaç endüstrisinde, kozmetik endüstrisinde, atık işleme sanayilerinde, bira yapımında, süt endüstrisinde, fotoğraf endüstrisinde ve tıp ta kullanılmaktadır (Gupta et al, 2002).

Bu kullanım alanlarına bakıldığı zaman bakteriyel kaynaklı proteazların diğer proteaz kaynaklarından daha etkili olduğu belirlenmiştir (Banerjee et al, 1999).

Alkalin proteazlar elde edilen kaynak olarak bakteri, maya, küf gibi mikrobiyal kaynaklar kullanılır (Singh, J. et al, 1999). Ancak biyoteknoloji de alkalin proteaz üretiminde en fazla kullanılan tür alkali *Bacillus*' tur. Bunun nedeni ise izole etmek hem çok kolay hem de izole edilen ortamının çok fazla olmasıdır. Özellikle *Bacillus*' lardan termofilik ve alkalifilik olanlarından elde edilen alkali proteazların hem yüksek sıcaklıklara hem de yüksek pH' lara dayanabilme yetenekleri çok yüksektir (Fogarty, W.M. and Kelly , 1979, Aunstrup, K., 1980, Johnvesly B., Naik, G.R , 2001).



Şekil 1.5. Endüstride kullanılan proteazların oranları (Gupta ve ark, 2002).

### 1.2.9.1. Deterjan Endüstrisinde Kullanılan Proteazlar

Üretilen enzimler arasında deterjanlar için üretilen enzimler dünyada % 30'u kapsar (Horikoshi, 1996). Deterjanlar içerisinde kullanılan proteaz enzimlerinin asıl görevi çamaşırlarda bulunan lekelerin içindeki proteinleri parçalayarak lekeleri yok etmek ya da deterjanın diğer temizleyici ajanların lekeyi parçalaması için imkan sağlamaktır (Celik, 2006, Nilegaonkar et al, 2007).

Bakteriyal kaynaklı proteazların deterjan endüstrisinde kullanılmasının nedenleri arasında yüksek pH da üreyebilmeleri yer alır. Ayrıca lekelerin çıkarılabilmesi için yüksek sıcaklıklara dayanabilen deterjanlar içerdikleri beyazlatıcı etkili sodyum fosfat ve sodyum perboratın neden olduğu fosfat kirliliğini ortadan kaldırmak için daha düşük sıcaklıkları kullanma yetenekleri oldukları için bakteriyal proteazlar daha fazla kullanılmaya başlanmıştır ve zamanla bu maddelerin yerlerini tamamen almışlardır (Kasavi, 2006). Proteaz enzimleri bu özelliklerinden dolayı yaklaşık 30 yıldan beri önemini artırarak deterjanlarda yer almışlardır (Oberoi et al, 2001).

Son yapılan çalışmalar göstermiştir ki deterjanlarda kullanılan proteazlar *Bacillus*' lardan elde edilen alkalin proteazlar ve serin proteazlardır. Örnek olarak *Bacillus* sp., *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* türlerinden üretilen proteazlar çamaşır temizliği için üretilen deterjanlarda kullanılmaktadır (Uhlig, 1998, Uludağ, 2000, Aehle 2004). *Bacillus*' ların haricinde Hindistan'da *Conidiobolus coronatus* türünden üretilen alkalin proteaz deterjan sanayisinde kullanılmaktadır (Maurer, 2004).

Bu nedenlerden dolayı birçok ticari üretici firması alkalin proteaz kaynağı olarak bakteriyal kaynakları kullanmaktadır. Aşağıdaki Çizelge 1.7.' de dünya üzerinde deterjanlar için elde edilen enzimler ve kaynaklarından bazıları gösterilmiştir.



**Çizelge 1.7.** Dünya Üzerinde Deterjanlar için Elde Edilen Enzimler ve Kaynakları (Maurer, 2004).

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

### 1.2.9.2. Deri Sanayisinde Kullanılan Proteazlar

Derinin işleme basamakları esnasında kullanılan kimyasalların tehlikeli olması ve bu kimyasalların çevreye zarar vermesinden dolayı enzimler kullanılmaktadır (Andersen, 1998). Aynı zamanda deri sanayisinde kullanılan proteazlar deride bulunan globülinler ve albüminler gibi proteinleri parçalayarak deriden uzaklaştırmak, derinin yumuşatılması işleminde, derinin ıslatılma aşamasında, deride kireçleme işleminde, derideki kılların uzaklaştırılması işleminde, yünlerin deriden uzaklaştırılması işleminde ve derinin inceltirme işleminde kullanılmaktadır (Öztürk, M.H., 2004; Tekin, 2008; Sevinç, 2010).

### 1.2.9.3. İlaç Endüstrisinde Kullanılan Proteazlar

Bu alanda kullanılan proteazlar genellikle vücutta eksik olan enzimi karşılanmasında kullanılmaktadır. Özellikle sindirim sistemine etki etmesi için verilen ilaçlarda proteazlar daha fazla kullanılmaktadır (İsmarcı, 2014).

Proteazların tedavi etmeyle görevli ajanların gelişmesinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bazı antibiyotiklerin gelişmesinde etkili olarak yanıklar ve yaraların tedavi edilmesinde subtilisin veya kollejenaz proteazları kullanılmaktadır. Lenfositik lösemnin bazı türlerinde kan dolaşımındaki asparajini uzaklaştırmak için *E.coli*' den üretilen asparajinaz enzimi kullanılmaktadır (Kudrya, V.A. and Simonenko I.A. 1994; Rao et al, 1998; Gupta et al, 2002).

### 1.2.9.4. Gıda Endüstrisinde Kullanılan Proteazlar

Proteazlar gıda endüstrisinde genellikle proteinlerin hidrolizatlarının hazırlanmasında kullanılır. Bu hazırlanan protein hidrolizatları da daha sonra kan akışının düzenli olarak devam etmesinde, bebek mamalarının içeriklerinde, diyetlere uygun hazırlanan yiyeceklerde, meyve suyu ve bazı içecek türleri için rafta kalma ömürlerinin uzatılmasında kullanıldığı bilinmektedir (Gupta *et al* 2002a).

Şuan da günümüzde halen proteazlar devamlı olarak çeşitli peynirlerin üretilmesinde, fırınlarda üretilen unlu mamüllerde ve etlerin yumuşatılma işlemlerinde kullanılmaktadır. Genel de hidrofobik aminoasit içeren protein hidrolizatların acı bir tadı vardır. Hidrofilik aminoasit içeren protein hidrolizatlarının ise daha tatlı bir tadı vardır (Aehle, 2004).

Gıda sektöründe en çok tercih edilen alkalen proteaz ise papain' dir. Papain' in kullanıldığı alanlar bira üretiminde biralarn soğukta bekletilmesinde ve etlerin yumuşatılmasında kullanılır (Fadıloğlu ve Erkmen 2004). Fırınlarda kullanılan hamurların özelliğini içeriğinde bulunan ve suda çözünemeyen protein olan glüten belirler. Bu glüten maddesinin proteoliz ile değiştirilip geliştirilmesini sağlayan da

*Aspergillus oryzae*'den üretilen endoproteinazlar ve ekzoproteinazlardır. Bunun haricinde fungal kaynaklı proteazlarda beyaz ekmeklerin ve diğer hamur işi ürünlerinin yapımında sürekli kullanılmaktadır. Hamurlara yapılan bu enzim işlemleri ile hamurların el ile yapımını veya makineler ile yapımının kolaylaştırmaktadır. Türler arasında ise *Bacillus subtilis*' ten üretilen alkalen proteazları hamuru yumuşama sürelerini uzatarak hamurun sert halde kalmasını sağladığı için daha çok kek, kraker ve bisküvi gibi diğer fırıncılık ürünlerde kullanılır (Fadıloğlu ve Erkmen, 2004, Celik, 2006). Bir de ürünlerin tadına ve ürünün aromasına etki eden türler de vardır. Bunlar ise amilazlarla birleşerek bu görevi yapan asidik fungal mantarlardır (Uhlig, 1998, Krajewska, 2003).

Uzun yıllardır içerdiği yüksek seviyede proteinden dolayı kullanılan soya fasulyesinden yapılan sosların ve diğer soya ürünlerinin yapımında da proteazlar kullanılmaktadır (Celik, 2006).

#### **1.2.9.5. Kozmetik Sanayisinde Kullanılan Proteazlar**

Kozmetik sektöründe özellikle saç bakımıyla, diş bakımıyla, tüyleri yok eden ürünlerde, göz lenslerinin saklanması için yapılan solüsyonlarda ve cilt bakımıyla ilgili üretilen ürünlerde kullanılmaktadır (Sevinç, 2010; İsmarcı, 2014).

#### **1.2.9.6. Tekstil Sanayisinde Kullanılan Proteazlar**

Tekstil ürünlerinin üretimi için gerekli olan ham maddelerinin protein esaslı olanları işlenmesini sağlayarak ham maddenin üretim için hazır hale gelmesini sağlamakta kullanılır. Kumaşların yapımında kullanılan maddeler iki çeşit lif yapısında bulunur. Bunlardan birincisi yün, kaşmir, ipek gibi ürünlerde de bulunan doğal protein lifleridir. İkincisi ise kazein ile yenilenecek oluşmuş protein lifleridir (Duran ve ark., 2007).

İçeriği yün olan ürünlerde papain, pepsin ve pronaz gibi proteazlarla enzimatik işlemler uygulanarak ürünler daha esnek hale getirilmiş, içerdiği kirlerden arındırılmış ve ürünlerin daha beyaz hale gelmesi için kullanıldığı bilinmektedir (Karmakar, 1999).

#### **1.2.9.7. Atık İşleme Sanayisinde Kullanılan Proteazlar**

Bu alandaki proteazların temel görevi çevre ve doğa için zararlı olan atıkların yine çevre ve doğa için yararlı hale getirmektir. Dalev ve Simeonova 1992 yılında yapmış oldukları çalışmalarda *Bacillus subtilis*' ten ürettikleri proteazlarla deri sanayisinden kaynaklanan atıkları işleyerek tutkal gibi yararlı bir ürün oluşturmuşlardır.

Yine 1994 yılında Dalev *Bacillus subtilis*' ten üretmiş olduğu proteazlar ile kümeslerdeki tüyleri ve kümes hayvanlarının kesildiği alanlardaki tüylerin ortamdan uzaklaştırılması için kullanılmıştır. Kümesin toplam ağırlığının % 5' i kadar olan bu tüyler keratin yapılı olup tamamen parçalandığı için önemli bir protein kaynağı olarak gıda ve yem sanayisinde kullanılmıştır (Anwar ve Saleemuddin 1997, Öztürk 2004).

*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* ve *Streptomyces* sp.' ten elde edilen enzimler ve disülfiti azaltan bir madde ile atık borularda zamanla kılların birikerek oluşturduğu tıkanıklıkları, yine bu ikili sistem ile kılları parçalayarak açılması sağlanmıştır. Günümüzde bu yöntemi kullanan sistemin ticari olarak pazarlayan şirket de Genex' tir (Jacobson *et al*, 1985).

#### **1.2.9.8. Fotoğraf Endüstrisinde Kullanılan Proteazlar**

Fotoğraf endüstrisinde kullanılan filmler ve X ışını yapılı filmlerde bulunan gümüşü bu filmlerden koparmak için kullanılan proteazlardır. Bu filmler genel de jelatin bir tabaka içerisinde bulunur ve yaklaşık % 1.5- 2 gümüş içerir. Bu gümüşü geri elde edebilmek için enzimatik işlemler uygulanmadan önce jelatin yakılıp gümüş elde

edilirdi ama bu yöntemde çevre kirliliğine neden olmaktadır. Şu an ise enzimler ile bu jelatin tabaka hidroliz edilerek hem gümüş geri kazanılır hem de artık polyester filmlerinde geri kazanılması sağlanmıştır (Horikoshi, 1999). Fujiwara 1991 yılında yaptığı çalışmada *Bacillus subtilis*' ten elde ettiği proteaz ile jelatin tabakasını 30 dakika boyunca 50 - 60 °C işleme tabi tutarak gümüşü uzaklaştırdığını kanıtlamıştır (Fujiwara *et al*, 1991; Nelson, D. , M.M. , Cox, 2005).

### 1.3. Proteaz Üreten Bakteriler de Borun Yeri

Dünyada toprakta, suda, kayalarda yaygın şekilde bor bulunmaktadır. B ile gösterilen ve 5 atom numarasına sahip 10. 81 atom ağırlığına sahip bir elementtir. Bor doğal ortamlarda saf olarak bulunmamaktadır. Genellikle farklı bileşiklerin oksitleriyle beraber bulunurlar. (Kemp, 1956). Metal ve oksijenle birleşen borlara borax adı verilir (<http://www.etimaden.gov.tr/tr/page/bor-turkiye-tarihcesi>, 2016).

İlk saf bor Fransız Kimyager J.L.Gay Lussac ve Baron L.J. Thenard ile İngiliz Kimyager H. Davy' nin yapmış oldukları çalışmalarda elde edilmiştir. Türkiye, A.B.D. ve Rusya dünyada en önemli bor yataklarına sahip ülkelerdir. Aşağıdaki Çizelge 1.8.' de Dünya Bor Rezervleri görülmektedir.

**Çizelge 1.8.** Dünya Bor Rezervleri

Ülke	Toplam Rezerv (Bin ton B <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Toplam Rezerv (% B <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )
Türkiye	955.297	72.1
A.B.D.	80.000	6.7
Rusya	100.000	8.4
Çin	47.000	3.9
Arjantin	9.000	0.8
Bolivya	19.000	1.6
Şili	41.000	3.4
Peru	22.000	1.8
Kazakistan	-	-
Sırbistan	16.200	1,3
İran	1.000	0.0
Toplam	1.199.700	100.0

Tablo göz önüne alındığında bor kaynağı olarak % 72 rezerv oranıyla dünya genelinde Türkiye çok önemli konumdadır. (Mergan vd. , 2006).

Türkiye' nin bor rezervleri ise Eskişehir-Kırka, Balıkesir-Bigadiç, Kütahya-Emet ve Bursa-Kestelek' de bulunmaktadır (<http://www.etimaden.gov.tr/tr/page/bor-rezervleri>, 2016).

Bölgelerin oranlarına bakılırsa % 72' lik Türkiye rezervinin % 37'sini Bigadiç-Balıkesir, % 34' ü Emet-Kütahya, % 28'i Kırka-Eskişehir ve %1'Kestelek-Bursa oluşturmaktadır. Balıkesir-Bigadiç yatağından çıkarılan kolemanit ve üleksit ortamın arsenik değerlerinin düşük olmasından dolayı değerli maddelerdir (DPT, 1995).

Bakteriler ve borun ilişkisini göstermek için yapılan bazı çalışmalar, 1986 yılında Mateo ve arkadaşlarının yaptıkları *Cynobacteria* türleriyle ilgili çalışmalarda borun ana etmenlerden olduğu gösterilmiştir. 1961 yılında Anderson ve Jordan Azetobacter türü çalışmalarında bor elementinin nitrojen fiksasyonun da artırıcı bir etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Antibiyotik üreticisi olan Streptomisetlerden elde edilen bazı antibiyotikler de boromycin (Kohnno vd., 1996), tartrolon A ve B (Irschik vd., 1995)' borun varlığı kanıtlanmıştır. Mikrobiyal üretim yapmak için kullanılan besi yerlerinde de borun olduğu tespit edilmiştir (Stainer vd., 1966).

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. MATERYAL

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizmalar, ülkemizin Balıkesir ilinin Bigadiç ilçesinde bulunan bir bor madeni içerisinde alınmıştır. Örnekler madenin atık havuz toprağından ve maden içerisinde çıkarılan borun bulunduğu topraktan olmak üzere örnekler alınmıştır.

Yapılan izolasyon çalışmaları ile mikroorganizmalar saf olarak elde edilmiştir. Bu mikroorganizmalar içeriğı farklı ortamlarda üretilerek en yüksek enzim üretim aktivitesine ulaşmaya çalışılmıştır.

#### 2.1.1. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

##### NaOH Çözeltisi ( 2 N NaOH Çözeltisi )

Besi yerlerinin pH'ının ayarlanmasında 2 N NaOH tampon çözeltisi kullanılmıştır.

##### Sodyum Fosfat Tamponu

Proteaz enziminin pH 7.0' deki aktivitesinin ölçülmesinde kullanılmıştır. 6.77 g  $K_2HPO_4$  1 L distile su içerisinde çözülmüştür (A çözeltisi). 8.85 g  $Na_2HPO_4$  1L distile su içerisinde çözülmüştür (B çözeltisi). A çözeltisinden 413 mL ve B çözeltisinden 587 mL alınarak karıştırılarak elde edilmiştir (Temizkan ve Arda, 2004).

### **Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Çözeltisi ( % 10' luk Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Çözeltisi )**

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

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>            10 g  
Distile su            100 mL karıştırılarak hazırlanmıştır.

### **HCl Çözeltisi ( 0.1 M HCl Çözeltisi )**

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

HCl                    3.6 g  
Distile su            1000 mL karıştırılarak elde edilmiştir.

### **Serum Fizyolojik Çözeltisi**

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

NaCl                   9 g  
Distile su            1000 mL karışımından elde edilmiştir.

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

### **Glisin – NaOH Tamponu ( 50 mM Glisin – NaOH Tamponu )**

Proteaz enziminin pH 9.0 – pH 12.0 aralığında ki aktivitesinin saptanması için kullanılmıştır (Denizci ve ark. , 2003, Temizkan ve Arda, 2004).



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

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

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

Proteaz enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılmıştır (Denizci ve ark. , 2003).

0.5 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5.3 g / 100 mL
Distile su	100 mL

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

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

Enzim ve substrat çözeltilerinde reaksiyonu durdurmak için kullanılmıştır (Denizci ve ark. , 2003).

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 çözünmüş ve son hacim 100 mL olana kadar 0.33 M asetik asit ilave edilmiştir.

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

1:1 oranında olacak şekilde distile su ve folin reaktifi karıştırılarak elde edilmiştir (Denizci ve ark. , 2003).

### **2.1.3. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar**

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

250 mL distile su içerisine 0.3 g tris ve 0.008 g EDTA konularak karıştırılır. pH 8.0' a ayarlanır.

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

100 mL distile su içerisine 10 g SDS karıştırılarak hazırlanır.

#### **Proteinaz K**

Hazır olarak alınarak kullanılmıştır.

#### **NaCl Tamponu ( 5 M 100 mL )**

100 mL distile su içerisinde 20 g NaCl karıştırılarak hazırlanır.

### **CTAB / NaCl Çözeltisi**

90 mL distile su içinde 4.1 g NaCl çözündürülür ve üzerine 10 g CTAB yavaşça eklenerek 65 °C ' ye kadar ısıtılır. Son hacim 100 mL oluncaya kadar üstüne distile su eklenir.

### **Kloroform / İzoamil Alkol Tamponu**

96 mL kloroform ile 4 mL izoamil alkol karıştırılarak hazırlanır.

### **Kloroform / İzoamil Alkol / Fenol Tamponu**

10 g fenol ile 10 mL Tris HCl (50 mM, pH 8.0) çözündürülür. 2 saat bekletildikten sonra iki faz oluşur. Üst faz atılır. Alt faza 10 mL Tris HCl çözeltisi eklenir ve 5-6 dakika beklenir. Üst faz yine atılır. Yeniden 10 mL Tris HCl çözeltisi eklenir ve bu işlemler 5-6 kez tekrar edilir. 9.6 mL kloroform, 0.4 mL izoamil alkol, 10 mL Tris HCl ve hazırlanan fenol karışımından da 10 mL konularak hazırlanır.

### **% 70' lik Etanol**

70 mL %100' lük etanol ve 30 mL distile su karıştırılarak hazırlanır.

### **İzopropanol Alkol**

Hazır halde bulunan izopropanol alkol izolasyon işleminde gerekli miktarı kadar alınarak kullanılır.

### **Tris HCl Tamponu (50 mM, pH 8.0)**

0.78 g Tris HCl alınarak 100 mL distile su ile hazırlanmıştır.

### **2.1.4. Kullanılan Besi Yerleri**

#### **Nutrient Broth ( MERCK 1.05443 )**

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

<b><u>Bileşimi</u></b>	<b><u>g / L</u></b>
------------------------	---------------------

Pepton	5
--------	---

Et Özütü	3
----------	---

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

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

Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların petriyeri halinde stok kültür olarak saklanmasında kullanılmıştır.

<b><u>Bileşimi</u></b>	<b><u>g / Lt</u></b>
------------------------	----------------------

Pepton	5
--------	---

Et Özütü	3
----------	---

Agar	12
------	----

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

## **N1 Agar**

Çalışmadaki mikroorganizmaların yatkın olarak stok kültür halinde saklanması için kullanılmıştır.

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

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

## **Skim milk Besiyeri**

Mikroorganizmaların proteaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Singh ve ark., 2001). Singh ve arkadaşlarının belirlediği besi yeri çalışmada modifiye edilerek kullanılmıştır.

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

İstenilen pH'a ayarlanarak steril edilmiş besi yerine ayrı olarak steril edilmiş olan skim milk eklenmiştir.

## Uygun Enzim Üretim Besiyeri

Çalışmada mikroorganizmaların en yüksek proteaz üretiminin sağlandığı enzim besiyeri olarak kullanılmıştır (Qadar ve ark. , 2009).

<b><u>Bileşimi</u></b>	<b><u>g / L</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

Qadar ve arkadaşlarının belirlemiş olduğu enzim besi yerine 5 g/L kazein ilave edilerek modifiye yapılmış olarak kullanılmıştır. Hazırlanan enzim besi yerinin pH' ı ayarlanmış ve 121°C 1.0 atm basınçta otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır.

## Triptone (İndol) Besiyeri

IMVIC testlerinden indol testinin uygulanması için kullanılır.

<b><u>Bileşimi</u></b>	<b><u>g / L</u></b>
Pepton from casein	10
NaCl	5

karışımı ile hazırlanmıştır.

## Clark ve Lubs Besiyeri

IMVIC testleri içinden metil red ve voges-proskauer testleri için kullanılan besi yeridir.

<b><u>Bileşimi</u></b>	<b><u>g / L</u></b>
Pepton from meat	7
Glikoz	5
Dipotasyum fosfat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – Fosfat Buffer )	5

karıştırılarak testler için yapılmıştır.

### **Sitrat (Simmon's Citrate Agar) Besiyeri**

IMVIC testlerinden olan sitrat testinin uygulanabilmesi için yapılan besiyeridir.

<b><u>Bileşimi</u></b>	<b><u>g / L</u></b>
Amonyum Dihidrojen Fosfat	1
Dipotasyum Fosfat	1
Sodyum Klorür	5
Sodyum Sitrat	2
Magnezyum Sülfat	0,2
Agar	15
Bromtimol Mavisi	0,08

## **2.2. METOD**

### **2.2.1. Bakterilerin İzolasyonu**

Bu çalışmada kullanılan örnekler için Balıkesir ilinin Bigadiç ilçesinde bulunan bir bor madeni içerisinde farklı bölgelerden toprak örnekleri alınmıştır. Toprak örnekleri toprağın üst kısmının temizlenerek tavan kısmının yaklaşık 5-10 cm aşağısından alınmıştır.

Alınan örnekler 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. (Lennette et al, 1985).

İnkübasyon işlemi sonrasında örneklerden  $10^{-1}$  -  $10^{-6}$  aralığında olmak üzere seri dilüsyonlar yapılmış ve örneklerden 0.1 mL pipet ile alınarak petrilere eklenmiştir. Drigalski spatülü yardımıyla yayma yöntemine göre ekim yapılmıştır (Temiz, 1994). Ekim işlemi bitirildikten sonra petrilere 37 °C'de 18 saat inkübe edilmiştir.

### **2.2.2. Proteaz Üretimi İçin En Uygun Bakterilerin Belirlenmesi**

18 saatlik inkübasyon işleminin sonunda gelişmiş olan bakteriler alınarak proteaz enzimini ürettiğinin görüleceği skim milk besi yerine ekilerek 18 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra besi yerelerinde koloniler etrafında oluşan zonlar tespit edilmiştir. Bu koloniler proteaz pozitif olarak seçilmiş ve bu çalışmada kullanılmıştır (Aydın et al, 2003). Proteaz pozitif olan koloniler tek koloni ekim yöntemine göre N1 agar besi yerine ekilerek daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere saf kültür şeklinde +4 °C'de saklanmıştır (Anonymus, 1978).



### **2.2.3. Bakterilerin Üreme Zamanları ve Bakterilerin Üreme Eğrileri**

Bakteriyi üretmek için hazırlanan besi yerlerine ekilen bakteriler 37 ° 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.

### **2.2.4. Bakterilerin En İyi Proteolitik Aktivite Gösterdiği pH Değerlerinin Saptanması**

Proteaz üretimi pozitif olarak tanımladığımız bakterilerimizi pH 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 12.0 olarak ayarladığımız skim milk besi yerine ekimi yapılmıştır. Daha sonra ekim işlemi bittikten sonra petriler 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.

### **2.2.5. Bakterilerin En İyi Proteolitik Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerinin Saptanması**

Proteaz üretimi pozitif olan bakteriler farklı pH aralıklarında hazırlanan katı skim milk besi yerine ekimi yapılarak 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, 50 °C 'ye ayarlanmış etüvlerde 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır (Voget et al, 2006).

## 2.2.6. Seçilen İzolatların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

### Gram Boyama

2005 yılında Smith ve Hussey tarafından belirtilmiş olan yöntemle göre gram boyama işlemi yapılmıştır. Bu işlemde 24 saat etüvde petrielerde üretilen izolatlar steril öze ile alınarak lam üzerine bırakılmıştır. Daha sonra da üzerine 1 damla distile su damlatılarak kurumaya bırakılmıştır. Lam üzerindeki izolatların kuruması bittikten sonra bek ateşinden 3 defa geçirilerek fiksasyon işlemi yapılmıştır. Sonra da sırasıyla kristal viyole damlatılmış ve bir dakika beklenilmiştir. 1 dakika sonunda distile su ile kristal viyole lam üzerinden yıkanmıştır. Ardından lam üzerine lugol çözeltisi damlatılır ve yine 1 dakika beklenir. Yine bir dakika sonucunda lam distile su ile yıkanır. Sonra etil alkol lam üzerine damlatılır ve 15 saniye beklenir. Alkol süresi geçirilmeden distile su ile yıkanır. Son olarak da safranin boyası damlatılır ve bu da 30 saniye kadar beklenir. Süre sonunda distile su ile yıkanan lam mikroskopta görüntülenmek için hazırdır. Işık mikroskobunda 100X' lik objektifte lam üzerine immersiyon yağı damlatılarak görüntülenmiştir. Mikroskop görüntüsünde bakteriler mor renkli olanlar için Gram + , açık pembe sahip bakteriler de Gram – olarak tanımlanmıştır.

### Katalaz Testi

24 saat boyunca etüvde değerleri optimal seviye gelen bakterilerden steril öze ile fazla miktarda alınarak bir lamın üzerine bırakılır. Daha sonra üzerine 3-4 damla % 3' lük hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) damlatılmıştır. 1-2 dakika sonra lamda gaz kabarcıklarının oluşması katalaz pozitif olarak belirtilmiştir (Miller, 1992).

## **IMVIC Testleri**

### **İndol Testi**

Bu test ile bakteride triptofanaz enziminin bulunup bulunmadığının tespitinde kullanılır. Bu işlemde içeriğinde triptofan olan besi yerine ekilen bakteri ortamdaki triptofanı parçalayarak ortaya indolün çıkmasına neden olur. Ortaya çıkan indol de aldehitler ile birleşerek renkli görünürler (Shigei J., 1992). Ortamda indol varsa birleştiği aldehite göre renk verir. Benzaldehit ile birleştiyse pembe-kırmızı bir renk oluşur. Eğer indol sinnamaldehit ile birleştiyse mavi-yeşil bir renk oluşumu gözlenir (York MK et al, 2007 )

Triptofan besi yeri olarak hazırlanan sıvı besi yerine ekimi yapılan taze olarak geliştirilmiş bakteriler 37 °C sıcaklıkta 5 gün boyunca etüvde bekletilmiştir. Süre sonunda tüplerin içine 0.5 mL kovacs ayırıcı damlatılarak 1-2 dakika beklenir. Sonuç olarak tüplerde kırmızı bir halkanın oluşması pozitif, sarı halkanın oluşması negatif olarak değerlendirilir.

### **Metil Kırmızısı Testi (MR )**

Bu testin amacı bir bakterinin glikoz fermantasyonu olayında oluşan ürünler içerisinde asit oluşturup oluşturmadığının tespiti için kullanılır. İndikatör olarak bu testte metil kırmızı kimyasalı kullanılır (Shigei J., 1992; York MK et al, 2007 ).

Bu test de Clark-Lubs besi yerine geliştirilmiş kültürlerin ekimi yapılır ve 7 gün boyunca 37 °C sıcaklıkta bekletilir. 7 günün sonunda besi yerlerine metil red kimyasalından 4-5 damla damlatılarak değerlendirme yapılır. Kırmızı halkanın oluşması bu testin pozitif olduğunu gösterir.

### **Voges-Proskauer Testi (VP)**

Bu testin amacı da bakterinin glikoz fermantasyonu işleminde oluşturduğu ürünler içerisinde nötral son ürünün varlığının tespitinde kullanılır. MR testi gibi glikoz fermantasyonunu kullandıkları için testte MR testiyle aynı besi yeri kullanılır (Shigei J. 1992; York MK ve ark. 2007 ).

Geliştirilmiş bakteriler Clark-Lubs besi yerine ekilir ve 37 °C 'de 7 gün bekletilir. Süre sonunda hem ekim yapılmış besi yerlerine hem de ekim yapılmamış saf besi yerlerine O' Meara ayırıcı veya 0. 2 mL % 40' lık KOH, 0. 6 mL % 5' lik alfa naftol ve 1 mL' ye tamamlana kadar saf etanol koyularak hazırlanan solüsyondan 1 mL eklenir ve yavaşça karıştırılır. 37 °C' lik su banyosunda 4 saat bekletilir.

Sonuç olarak besi yerinin üst kısmında 5 dakika içinde pembe renk oluşuyorsa asetoin var demektir ve test pozitifdir eğer renk pembe değil de sarı ise asetoin yok demektir ve test negatifdir.

### **Sitrat Testi**

Bakterilerin besi yerinde bulunan sitratı karbon kaynağı olarak ve amonyum tuzlarını da nitrojen kaynağı şeklinde kullanıp kullanmamasının tespit edildiği testtir. Bu test için karbon kaynağı olarak sitrat bulunan yatık şekilde hazırlanmış sitrat agar (Simmon's citrate agar) kullanılır (Shigei J. 1992;York MK ve ark. 2007 ).

Saf kültürlerini steril edilmiş fizyolojik su ile biraz sulandırılır ve sitrat agar (Simmon's citrate agar) besi yerine ekimleri yapılır. İnkübasyon için 7 gün boyunca 37 °C' de bekletilir. 7 günün sonunda besi yerlerinde üremenin olmaması ve besi yerlerinin kendi yeşil rengini koruması testin negatif, besi yerinde üremenin olarak besi yeri renginin koyu mavi renge dönüşmesi testin pozitif sonuçlanmasını gösterir.

### 2.2.7. Proteaz Üretimi

Proteaz üretimi için elde edilen izolatlar +4 C ' de kültür olarak saklandığı ortamdan aşu olarak hazırlanmıştır. 37 °C' de 24 saat boyunca etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda izolatların spektrofotometrik baz da optik değeri belirli bir orana sabitlenmiş ve hazırlanan en uygun enzim üretim besi yerine ekilmiştir.

### 2.2.8. Proteaz Aktivite Tayini

Deneilerde proteaz aktivitesi 1989 yılında Takami' nin belirtmiş olduğu yöntemin substratı kazein olarak değıştirilerek uygulanmıştır. Yönteme göre 0.5 mL enzim alınarak hazırlanan % 0.65'lik kazein çözeltisi ile yaklaşık 20 dakika kadar 37 °C' de bekletilmiştir. Bu işlem bittikten sonra tüplerin içine 110 mM trikloroasetik asit (TCA) çözeltisinden 2.5 mL eklenerek 30 dakika boyunca 37 °C sıcaklığına ayarlanmış su banyosuna bırakılmıştır. Bu süreden sonra alınan tüpler yeni tüplere filtre kağıdı ile süzdürülmüştür. Süzme işlemi bittikten sonra tüplerin içine 2.5 mL 0.5 M sodyum karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) eklenmiştir. Bu karışımın üzerine de 0.5 M Folin-Ciocalteu reaktifi eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika beklemeye bırakılmıştır. Bu işlemden sonra da tüpler içindeki çözelti spektrofotometre küvetlerine konulmuştur, kör olarak distile su ile 660 nm de spektrofotometre ölçümleri yapılmıştır.

Çıkan sonuçlardan enzim miktarlarının hesaplamaları aşağıda verilen formüle göre ve hazırlanan standart trozin grafiğinde belirlenen eğim kullanılmıştır. Bir ünite (U/ml) enzim aktivitesi, dakikada 1 µg tirozinin ortaya çıkması için gerekli enzim miktarı olarak belirtilmiştir (Erarslan vd. 2005).

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/g/mL)} = \frac{(\text{OD660/Eğim}) \times \text{Toplam hacim(mL)}}{\text{Enzim hacmi(mL)} \times \text{İnkübasyon süresi(dak)}} \times \text{Seyreltme faktörü (U/mL)}$$

### **2.2.9. Tirozin Grafiğinin Hazırlanması**

Tirozin standart grafiğinin hazırlanmasında 50 mM pH 10.0 glisin – NaOH tampon çözelti ile 1 mg / mL tirozin karıştırılarak çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözeltiden 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90,100, 150, 200 µL alınarak 1 mL'ye 50 mM pH 10.0 glisin – NaOH tampon ile tamamlanmıştır. Üzerine 0.5 M sodyum karbonattan 2.5 mL ve 0.5 mL folin reaktifi eklenmiştir.

Hazırlanan çözelti 30 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiş ve daha sonra spektrofotometrede 660 nm' de değerleri ölçülmüştür. Karışımlardaki tirozin oranına bağlı olarak 660 nm' de görülen değişimlere göre tirozin grafiği çizilmiştir. Bu grafik sonucuna göre de enzimlerin proteaz aktiviteleri hesaplanmıştır (Takami et al, 1989).

### **2.2.10. Üretim Yapılan Ortamın Başlangıç pH Değeri nin Proteaz Enzim Üretimine Etkisinin Belirlenmesi**

Üretim ortamının başlangıç pH değeri nin enzim üretimine etkisini görebilmek için pH 7.0 - 8.0 için Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu, pH 9.0-12.0 için NaHCO<sub>3</sub>-NaOH tamponları kullanılarak hazırlanan 50 mL'lik besi yerlerine bir gün etüvde inkübasyonda tutulan örnekler % 5 oranında aşılmalıdır. Aşılmalı besi yerleri 18 saat süre boyunca 37 °C de 150 rpm hızında çalkalamalı etüve bırakılmıştır. Süre sonunda her örnek protein aktivite yöntemi ile ölçülerek proteaz üretimi için ortamın en uygun pH değeri tespit edilmiştir.

### **2.2.11. Proteaz Enzim Üretiminde İnkübasyon Sıcaklık Değeri nin Proteaz Enzim Üretimine Etkisinin Belirlenmesi**

Proteaz enzimi üretimi için en uygun sıcaklığın tespiti için daha önce belirlenen uygun pH değerlerinde hazırlanan 50 ml'lik enzim üretim besi yerlerine taze olarak geliştirilmiş bakteri örneklerimizden % 5 miktarında aşılama yapılarak 15 °C, 25 °C, 37 °C, 50 °C' ye ayarlanmış 150 rpm hızında çalkalamalı etüvlere konulmuştur. 18.

saatin sonunda besi yerlerinden alınan örnekler protein aktivite tayin yöntemi ile ölçülerek proteaz enziminin üretimi için en uygun sıcaklık tespit edilmiştir (VijayAnand et al., 2010).

#### **2.2.12. Proteaz Enzim Üretiminde İnkübasyon Süresinin Etkisinin Belirlenmesi**

Daha önceden belirlenen proteaz enzim üretimi için optimum sıcaklık ve pH şartlarına uygun olarak hazırlanan enzim üretim besi yerleri 150 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatöre bırakılmıştır. Bu inkübasyona bırakılan örneklerden 6, 12, 18, 24, 48 ve 72 saat sonlarında belirli oranlarda örnek alınmış (Reddy et al., 2011) ve yine protein aktivite tayin yöntemi uygulanarak proteaz enzimi üretiminde inkübasyon süresinin etkisi belirlenmiştir.

#### **2.2.13. Sodyum Tetraborat Dekahidrat ( Sodium tetraborate decahydrate)' ın Proteaz Üretimine Etkisi**

Bu çalışmada kullanılan bakteriler bir bor madeninden alındığı için bor türevi bir kimyasalın bakterinin proteaz enzimi üretimine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Proteaz üretimi için kullanılan enzim üretim besi yerine 50 mM sodyum tetraborat dekahidrat ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) eklenerek proteaz enzimi üretimindeki değişim belirlenmiştir.

#### **2.2.14. Farklı Karbon Kaynaklarının Proteaz Enzimi Üretimine Etkisi**

Bu çalışmada kullanılan bakterilerden en iyi proteaz üretilen besi yeri Enzim Üretim Besi yeri olarak açıklanan besi yeridir. Bu besi yerinde karbon kaynağı olarak glikoz kullanıldığı bilinmektedir. Bu karbon kaynağı olan glikoz yerine aynı miktar kadar nişasta ve sakkaroz kullanılarak farklı karbon kaynaklarının etkisi görülmüştür.

### **2.2.15. Kromozomal DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayinin Belirlenmesi**

Topraktan izole edilmiş bakterilerin kromozomal DNA izolasyonu 1990 yılında Cutting ve Horn' un belirlediği protokole göre bazı değişiklikler uygulanarak yapılmıştır. 25 mL olacak şekilde hazırlanan nutrient broth sıvı besi yerine ekimler yapılarak 18 saat boyunca 150 rpm de inkübe edilmiştir. 18 saatlik inkübasyon sonunda örnekler iki kez 5 dakika 10.000 rpm' de santrifüj yapılarak bakterilerin çöktürülmesi sağlanmıştır. İşlem sonunda üst kısım atılmış altta kalan çökelti kısmı kullanılmıştır. Ependorf tüp içerisinde bulunan çökelti kısmının üstüne 400 µL TE tamponu eklenir ve hafifçe çalkalanır. Sonra üzerine 30 µL SDS çözeltisi eklenir ve vorteks ile tamamen karıştırılması sağlanmıştır. Vorteks işleminden sonra tüplere 3 µL proteinaz K eklenir ve 37 °C' de 1 saat bekletilmiştir. 1 saat sonra tüplere 100 µL NaCl eklenir ve yavaşça el ile çalkalanır. Sonra üzerine 80 µL CTAB / NaCl çözeltisi eklenir ve el ile yavaşça karıştırıldıktan sonra 65 °C' de 10 dakika tutulur. Tüplerin hacmi kadar tüplere kloroform / izoamil alkol eklenir. El ile çalkalanır ve oluşan üst fazı yeni ependorf tüplere alınır üzerine fenol / kloroform / izoamil alkol çözeltisi eklenir Alt üst yapılarak tamamen karışması sağlanır. Üst faz yine yeni bir tüpe alınarak hacminin 0.6' sı kadar izopropanol eklenir. Çalkalayarak karıştırdıktan sonra 50 µL %70' lik etanol eklenir ve hemen dökülür. Tüpler ağzı açık şekilde 15 dakika bekletilir. En son olarak tüplere 75 µL TE tamponu eklenir ve izolasyon işlemi bitirilir.

### **2.2.16. 16S rDNA Geninin PCR İle çoğaltılması**

Yapılan çalışmalar ile elde edilen iki izolatın genlerinin çoğaltılması için 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3') ve 1492R(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT -3') evrensel primerlerin kullanımı ile PCR metodu kullanılmıştır (Sambrook et al, 2001). PCR yöntemi yapılan incelemeler ve çalışmalar ile belirli bir PCR programı belirlenmiş ve bu program ile farklı sıcaklık ve MgCl<sub>2</sub> değerleriyle optimizasyon yapılmıştır. PCR yönteminde kullanılan programın içeriğine 1,5 µL 1492R reverse primer (10pmol), 1,5 µL 27F forward primeri (10pmol), 4 µL kalıp DNA, 1.6 µL dNTP, 3 µL 10X Taq buffer, 2 µL MgCl<sub>2</sub> (10mM), 0,5 µL Taq DNA



polimeraz ve 30 µL 'ye tamamlanmaya kadar steril distile su konularak PCR çalışmaları yapılmıştır. 30 döngüden oluşan thermal cycler prosedürü de 105 °C de 5 dakika preheating, 94 °C 5 dakika ilk denatürasyon aşaması, 95 °C döngü denatürasyon, 56 °C 45 saniye primerlerin bağlanma aşaması, 72 °C 1,5 dakika DNA' nın uzama aşaması ve 72 °C 5 dakika son ekstansiyon aşaması ile tamamlanmıştır (Kishore L. et al, 1996) .

### **2.2.17. Agaroz Jel Elektroforezi**

PCR ürünlerinin görüntülenmesi için % 1,5' luk agaroz jel hazırlanmıştır. Marker olarak 100bp DNA Ladder kullanılmıştır. Marker jel kuyucuklarına 1 µL kadar yükleme yapılmıştır. Örneklerin yürütülmesinde, 6X DNA Loading 'den 2 µL alınarak 6 µL örnek ile pipetaj ile karıştırılıp jel üzerindeki kuyucuklara koyulmuştur. Yaklaşık 1 saat süre örnekler yürütülerek DNA görüntüleri elde edilmiştir.

### **2.2.18. 16S rDNA Sekans Analizi ile Bakterilerin Tanımlanması ve Filogenetik Analizleri**

İzolatların yapılan PCR çalışmaları ile elde edilen ürünler İstanbul Medsantek firmasında sekans analizleri yaptırılmıştır. Elde edilen sekans sonuçları National Center of Biotechnology Information' ın web sayfasında bulunan BLAST programı kullanılarak NCBI GenBank veritabanındaki tanımlanmış türler ile karşılaştırma yapılmıştır. Karşılaştırma sonucunda seçilen en yakın türler ile filogenetik analizleri yapılmıştır. Filogenetik ağaçları ise izolatların 16S rDNA sekansları ile MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) 7 dizi analiz programı yardımıyla uygulanmıştır (Shahbazi et al, 2013). Oluşturulan soy ağaçları ile izolatların yakınlık dereceleri belirlenmiştir.

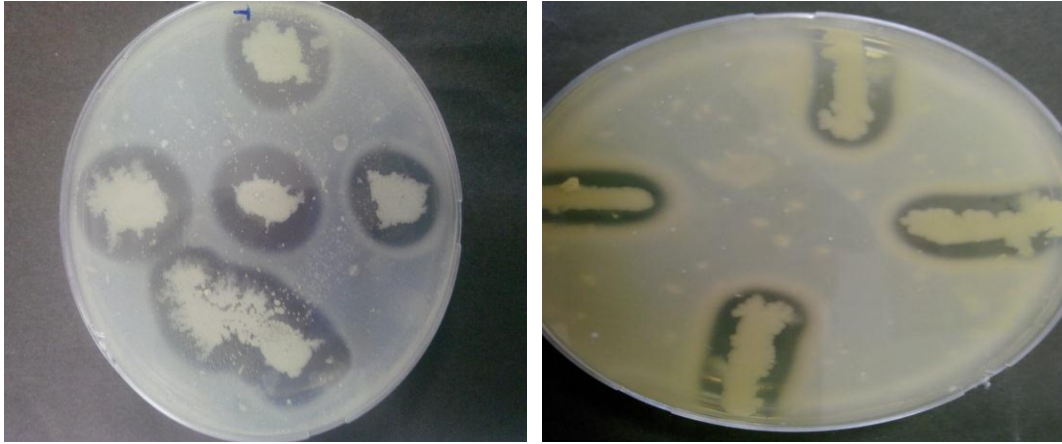
### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3.1. Bakterilerin İzolasyonu

Bu çalışmada iki farklı toprak örneğinden alınan örnekler seri dilisyonlar yapılarak Nutrient agar besiyerine yayma şeklinde ekilmiştir. Çalışmalarda kullanılacak olan 15 adet farklı bakteri izole edilmiştir.

#### 3.2. Proteaz Üretimi İçin En Uygun Bakterilerin Belirlenmesi

Nutrient Agar besi yerinde üretilen bakteriler alınarak proteaz enzimini üretilip üretmediğinin görüleceği özel skim milk besi yerlerine ekilmiştir. 37 °C’de 18 saat inkübasyon uygulandıktan sonra izole edilmiş olan bakterilerin skim milk besi yerinde üredikleri kolonilerin etrafında şeffaf zonlar oluşturduğu görülmüştür. Yapılan hesaplamalarla zon çapı daha geniş olan iki izolat ( TK2 ve TK3 ) diğer aşamalarda kullanılmak üzere belirlenmiştir.

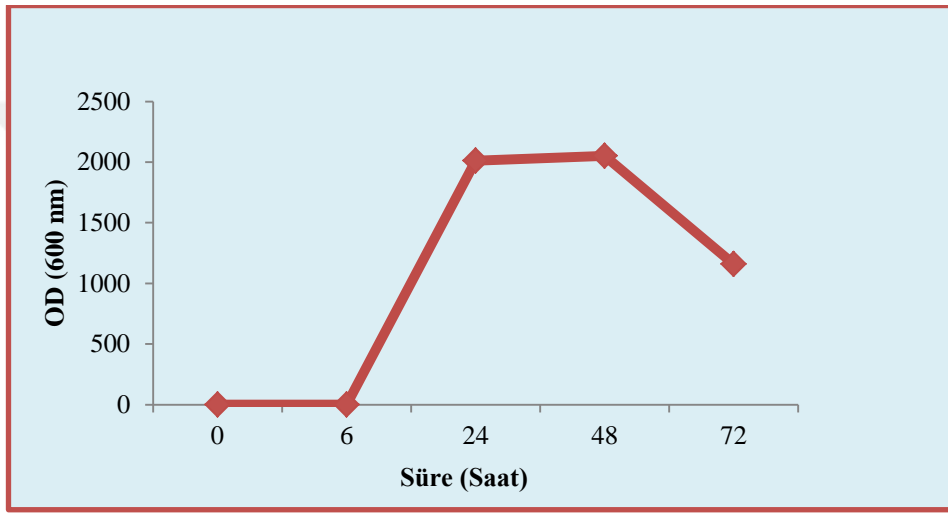


Şekil 3.1 (a) TK2 İzolatı Skimmilk Zon Görüntüsü

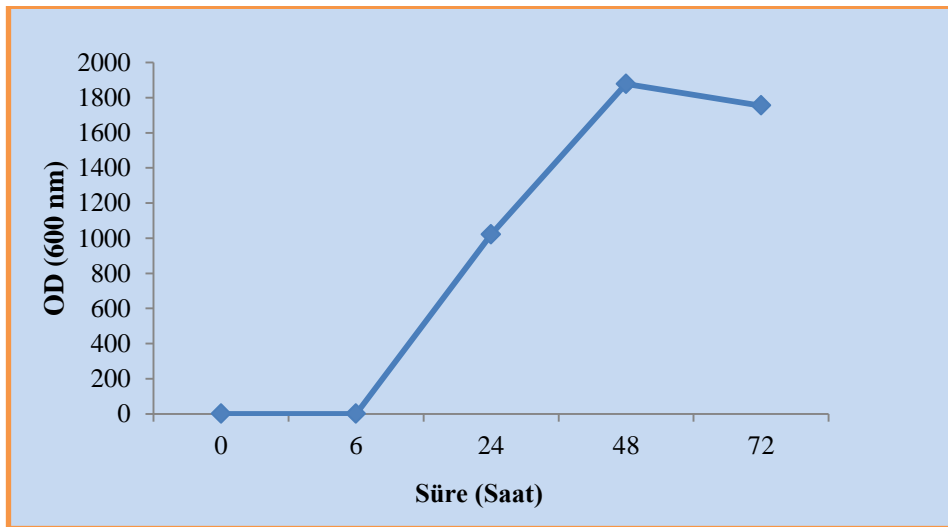
(b) TK3 İzolatı Skimmilk Zon Görüntüsü

### 3.3. Bakterilerin Üreme Zamanları ve Bakterilerin Üreme Eğrileri

Optik yoğunlukları sabitlenerek Nutrient Broth besi yerine ekilen ve 150 rpm, 37 °C’ deki inkübatöre konulan bakterilerin inkübasyonu sırasında 6, 24, 32, 48, 56 ve 72. saatlerde çıkarılarak örnek alınmış ve bakterilerin üreme seviyeleri kontrol edilerek bakterilerin üreme eğrileri belirlenmiştir. Aşağıdaki Şekil 3.2 (a) TK2 Üreme Eğrisi ve (b) TK3 Üreme Eğrisi’ nde görüldüğü gibi elde edilen sonuçlar verilmiştir.



Şekil 3.2 (a) TK2 Üreme Eğrisi



Şekil 3.2 (b) TK3 Üreme Eğrisi

### 3.4. Bakterilerin En İyi Proteolitik Aktivite Gösterdiği pH Aralıklarının Saptanması

Bakterilerin belirlenen üreme zamanından sonra üremenin optimum seviyede kalmasını sağlayacak pH değerinin saptanması için bakteriler proteaz aktivitesi gösterdiği skim milk besi yerlerine ekilir. Bu skim milk besi yerlerinin pH değerleri de pH 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ve 12.0 olarak ayarlanmıştır. Ekimi işlemi bittikten sonra besi yerleri 37 °C' de 24 saat boyunca etüve konularak inkübasyonları gerçekleştirilmiştir. Skim milk' li besi yerlerinde yapılan çalışmalarda TK2 ve TK3 izolatları için en uygun pH' ın 10.0 olduğu diğer pH' lara göre tespit edilmiştir.

### 3.5. Bakterilerin En İyi Proteolitik Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerinin Saptanması

En uygun pH' ın 10.0 olmasına rağmen farklı pH değerlerinde hazırlanan skim milk besi yerlerine ekilen daha önceden geliştirilmiş bakteriler 24 saat süre boyunca 15 °C, 20 °C, 25 °C, 37 °C, 50 °C' li inkübatörlere konulmuştur. İnkübasyon süresi dolduktan sonra TK2 ve TK3 izolatlarının hem 25 °C'de hem de 37 °C' de etkili olduğu saptanmıştır. Özellikle 15 °C ve 50 °C' de üreme çok az bir noktaya geldiği görülmüştür.

### 3.6. İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları

Çizelge 3.1. Biyokimyasal Testler

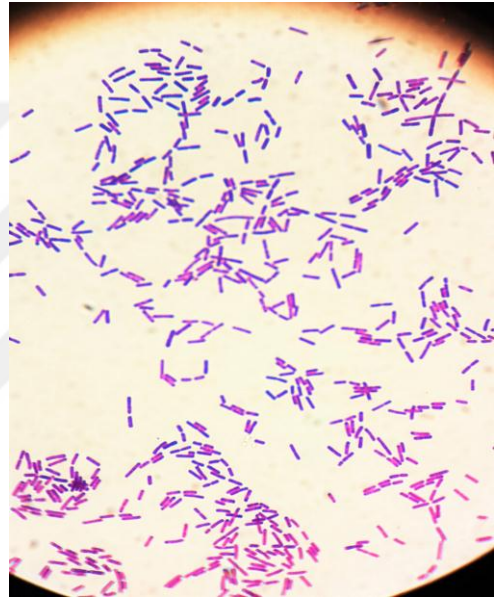
<u>TESTLER</u>	<u>TK2</u>	<u>TK3</u>
Gram boyama	+	+
Katalaz Testi	+	+
İndol Testi	-	-
Metil Red Testi	-	-
Voges Proskauer Testi	+	+
Sitrat Testi	-	-

## Gram Boyama Özelliklerinin Belirlenmesi

İzole edilen bakterilerin tanımlanmasında önemli olan gram boyama işlemi sonucunda deneylerde kullanılan TK2 ve TK3 izolatlarının mor renklere görülmelerinden dolayı Gram (+), morfolojilerinin de basil oldukları tespit edilmiştir. Aşağıda TK2 ve TK3 izolatlarının gram boyama sonuçları Şekil 3.3 (a) TK2 Gram Boyaması ve Şekil 3.3 (b) TK3 Gram Boyaması'nda verilmiştir.



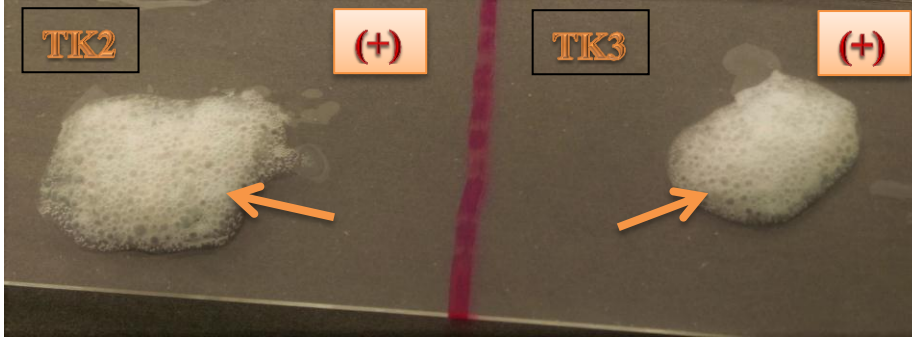
Şekil 3.3 (a) TK2 Gram Boyaması



Şekil 3.3 (b) TK3 Gram Boyaması

## Katalaz Testi Sonuçları

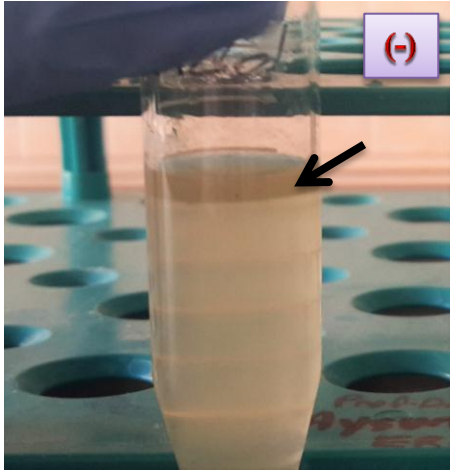
Lamın üzerine alınan bakteri örneklerinin üzerine hidrojen peroksit damlatıldıktan 1-2 dakika sonra lam üzerinde gaz kabarcıkları görülmüştür. İzolatların katalaz testi pozitif olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.4. Katalaz Testi

### İndol Testi Sonuçları

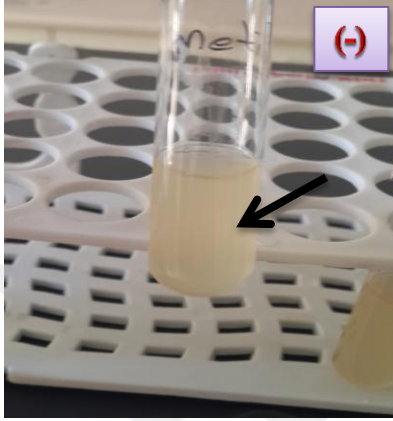
Triptofan besi yerine ekimi yapıp 5 gün inkübasyona bırakılan izolatlar 5 günün sonunda besi yerlerinin hepsine 0,5 mL Kovacs ayırıcı damlatılır ve birkaç dakika bekletilir. Süre sonunda besi ortamlarının üst tarafında kırmızı halka oluşmadığı için indol testi negatif olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.5. İndol Testi

### Metil Kırmızısı Testi

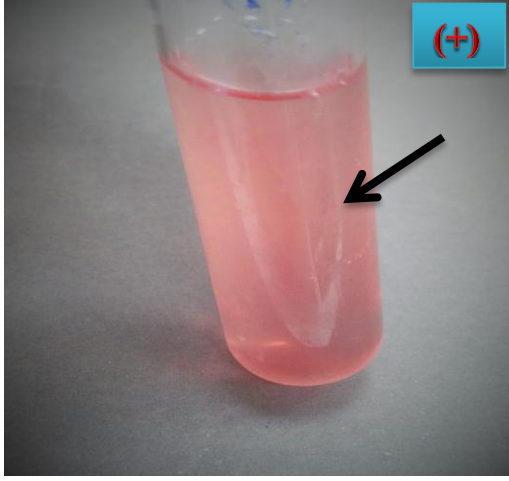
Clark-Lubs besi yerlerine ekim yapılmış ve inkübasyon için 7 gün boyunca inkübatörde bekletildikten sonra süre sonunda besi yerlerine metil red kimyasalından 4-5 damla damlatılmış ve kırmızı renk oluşmadığı için metil kırmızı testi negatiftir.



Şekil 3.6. Metil Kırmızısı Testi

### Voges –Proskauer Testi

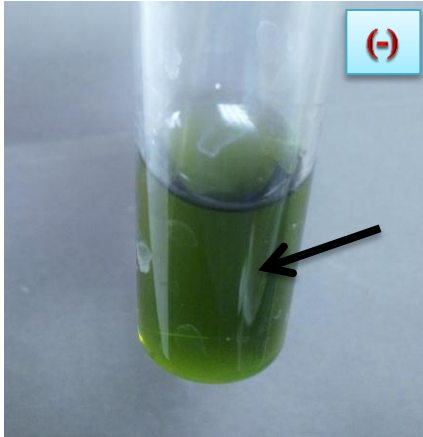
Besi yeri olarak clark – lubs besi yerlerine ekim yapılarak 7 gün boyunca inkübasyona bırakılan örnekler inkübasyon sonunda 1 ml oranında olacak şekilde 0,2 mL % 40' lık KOH, 0.6 mL % 5' lik alfa naftol ve 1 mL' ye tamamlana kadar saf etanol koyularak hazırlanan solüsyon damlatılır ve 4 saat boyunca 37 °C'de bekletildikten sonra besi ortamları pembe rengine dönüşmüştür. Besi yerlerinin pembe renk oluşu nedeniyle voges – proskauer testi pozitif olarak tespit edilmiştir.



**Şekil 3.7.** Voges – Proskauer Testi

### **Sitrat Testi**

Bakteriler sitrat agar besi yerine ekimi yapılır sonra 7 gün 37 °C’ de inkübasyona bırakılır ve süre sonunda besi ortamlarının başlangıçtaki yeşil rengi korumaya devam ettiği için örneklerin sitratı kullanmadığı ve sitrat testinin negatif olduğu görülmüştür.



**Şekil 3.8.** Sitrat Testi



### 3.7. Proteaz Aktivite Tayini

Yapılan çalışmalar sonucunda uygun enzim üretim besi yerinde üretilen izolatlar Takami ve arkadaşlarının belirtmiş olduğu yöntemle göre farklı sıcaklık değerleri ve farklı pH değerlerine göre incelenmiştir. % 0.65 oranında kazein içeren pH 7'lik Sodyum Fosfat ve pH 9'luk, pH 10'lık ve pH 12' lik Glisin – NaOH tamponları kullanılarak TK2 ve TK3 izolatlarının her hücre başına düşen üretilen proteaz enzim miktarları ( U /ml /g ) ölçülmüştür. İki izolattan da elde edilen değerler aşağıdaki Çizelge 3.2.(a) TK2 proteaz aktivite sonuçları ve Çizelge 3.2.(b) TK3 proteaz aktivite sonuçları' nda açıklanmıştır.



Çizelge 3.2.(a) TK2 Proteaz Aktivitesi

TK 2 İZOLATI ( U / g/mL)	pH 7.0			pH 9.0			pH 10.0			pH 12.0		
	24.saat	48.saat	72.saa t	24.saat	48.saat	72.saa t	24.saat	48.saat	72.saa t	24.saat	48.saat	72.saat
15 °C	41.264	26.605	74.947	32.946	19.272	59.930	32.226	25.347	42.749	39.468	23.409	53.856
25 °C	69.556	<b><u>90.648</u></b>	62.584	60.471	67.756	81.878	31.418	50.172	74.503	78.100	81.024	61.010
37 °C	66.676	<b><u>90.153</u></b>	72.344	59.931	73.783	67.441	31.148	53.410	70.904	37.579	<b><u>87.994</u></b>	73.018
50 °C	16.487	29.483	29.529	15.182	27.460	74.952	16.936	21.924	25.931	15.182	19.856	25.031

Çizelge 3.2.(b) TK3 Proteaz Aktivitesi

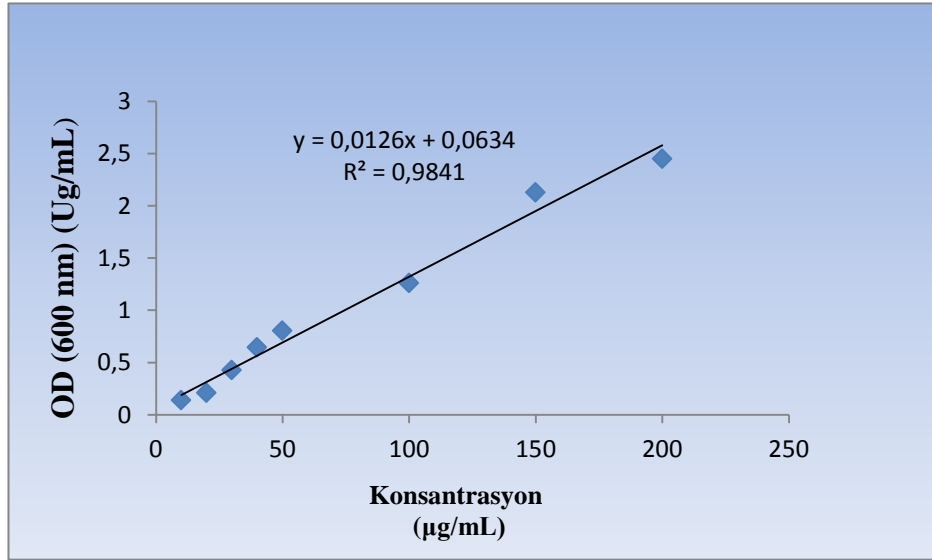
TK 3 İZOLATI (U / g/mL)	pH 7.0			pH 9.0			pH 10.0			pH 12.0		
	24.saat	48.saat	72.saat	24.saat	48.saat	72.saat	24.saat	48.saat	72.saat	24.saat	48.saat	72.saat
15 °C	43.242	27.999	<b><u>87.901</u></b>	25.386	22.015	76.301	30.877	25.976	56.198	33.665	23.771	57.052
25 °C	46.304	62.198	68.206	49.272	75.627	51.791	28.180	37.809	63.844	<b><u>91.008</u></b>	<b><u>93.347</u></b>	63.709
37 °C	46.889	<b><u>86.600</u></b>	74.097	45.090	69.870	73.693	38.884	41.447	64.968	72.209	81.881	67.262
50 °C	18.285	29.071	31.912	39.378	29.574	30.878	22.350	27.863	21.299	17.386	20.485	54.739

### 3.8. Tirozin Grafiğinin Hazırlanması

Yapılan alışmalar sonucunda aşağıda verilen izelge 3.2. Tirozin Grafiğinin Değerler' de belirtilendeğerler kullanılarak tirozin grafiğı çizilmiştir.

izelge 3.3. Tirozin Grafiğinde Kullanılan Değerler

10 µg/ml tirozin	0,137 OD
20 µg/ml tirozin	0,209 OD
30 µg/ml tirozin	0,426 OD
40 µg/ml tirozin	0,644 OD
50 µg/ml tirozin	0,803 OD
100 µg/ml tirozin	1,260 OD
150 µg/ml tirozin	2,128 OD
200 µg/ml tirozin	2,451 OD

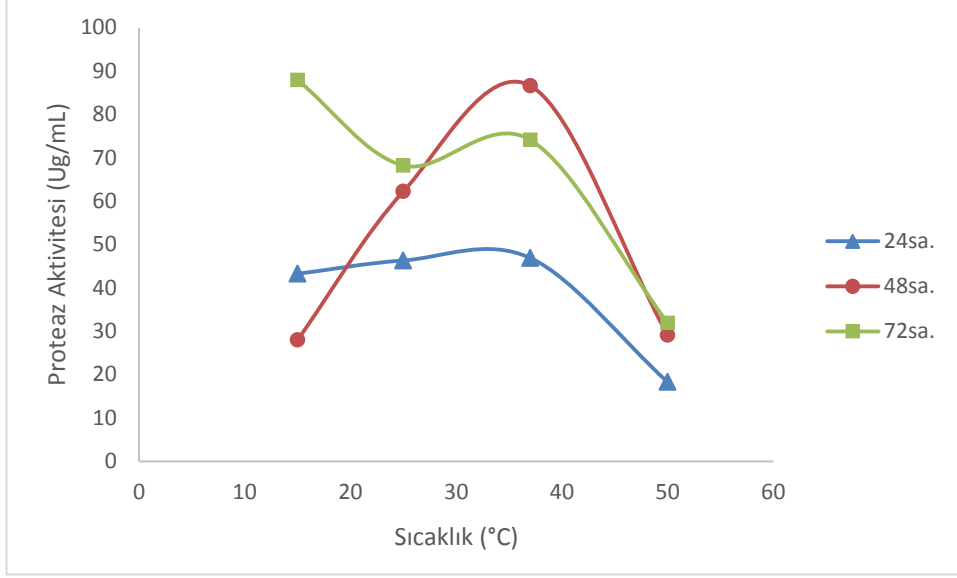


Şekil 3.9. Tirozin Standartı

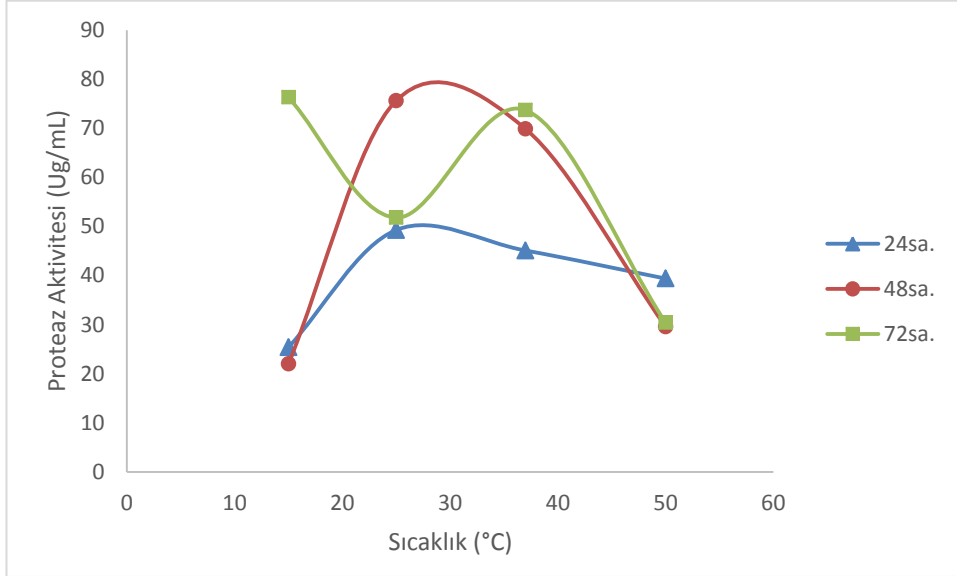
### 3.9. Proteaz Enzim Üretimine İnkübasyon Sıcaklığının ve Ortam Başlangıç pH Değerinin Etkisi

Kültürden alınan izolatlar farklı pH' lara ayarlanmış uygun enzim üretim besiyeri olarak kabul edilen ortama ekilir ve 18 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra proteaz aktivite yöntemi ile hesaplamalar yapılarak izolatların buldukları ortamın pH değerinin proteaz enzimi üretimine etkisine bakılmıştır. Buna göre TK2 izolatı için en uygun pH' ın 7.0 olduğu pH 12.0 de de enzim üretiminin yüksek olduğu fakat pH 9.0 ve pH 10.0 değerlerinin istenen seviyede olmadığı belirlenmiştir. TK3 izolatı için ise en yüksek enzim miktarı pH 12.0 de bulunduğu pH 7.0 değerlerinin çok az daha düşük olduğu ve pH 9.0, pH 10.0 değerlerinin pH 12.0 değerine ulaşamadığı görülmüştür. Sayısal sonuçlar da aşağıdaki Şekil 3.9. (a,b,c,d) ve Şekil 3.10. (a,b,c,d) 'da belirtilmiştir.

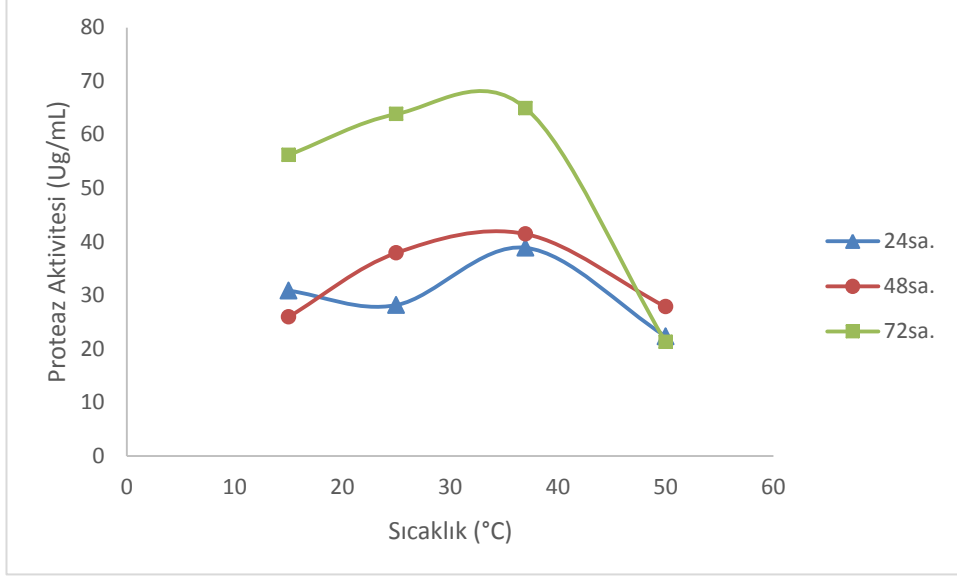
Sıcaklığın proteaz enzimi üretimindeki etkisini belirlemek için önceden geliştirilen izolatlarımız uygun enzim üretim besisi yerine aşılansak 18 saat boyunca 15 °C, 25 °C, 37 °C, 50 °C' lere ayarlanmış inkübatörlere konulmuştur. Süre sonunda protein aktivite tayini yöntemi ile gerekli hesaplamaları yapılmış ve uygun sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Buna göre TK2 ve TK3 izolatlarının 15 °C' de üremenin çok az bir değerde olduğu, 25 °C, 37 °C' lerde ise enzim üretiminin optimum seviyeye çıktığı ve 50 °C' de de üremenin düşerek çok az bir seviyeye gerilediği tespit edilmiştir. Aşağıda Şekil 3.9. (a,b,c,d) TK2' de İnkübasyon Sıcaklığının ve Başlangıç pH Değerlerinin Proteaz Enzim Üretimine Etkileri ve Şekil 3.10. (a,b,c,d) TK3' de İnkübasyon Sıcaklığının ve Başlangıç pH Değerlerinin Proteaz Enzim Üretimine Etkileri' nde elde edilen enzim üretim miktarları verilmiştir.



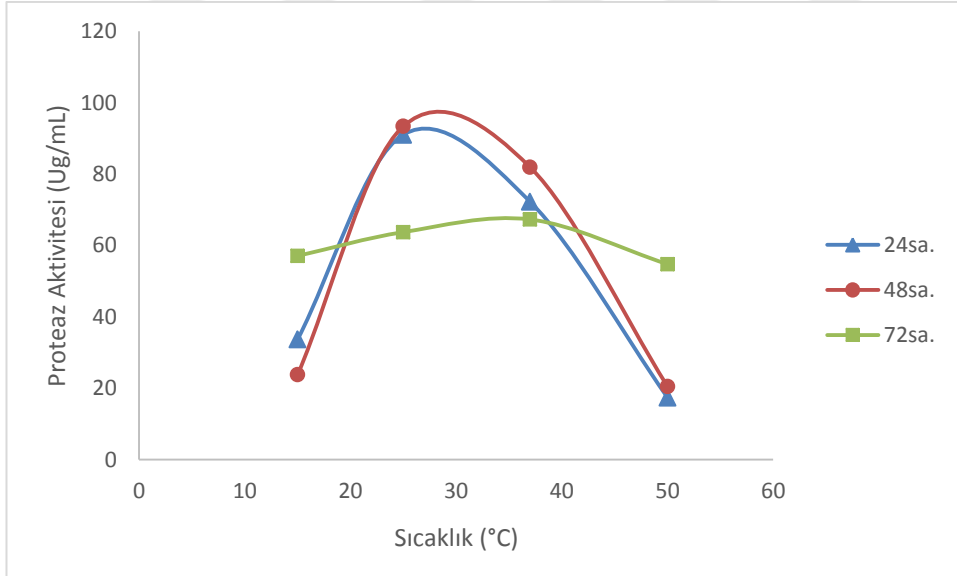
**Şekil 3.10. (a)** TK2' de İnkübasyon Sıcaklığının ve Başlangıç pH Değerlerinin Proteaz Enzim Üretimine Etkileri (Reaksiyon pH'ı: pH 7.0)



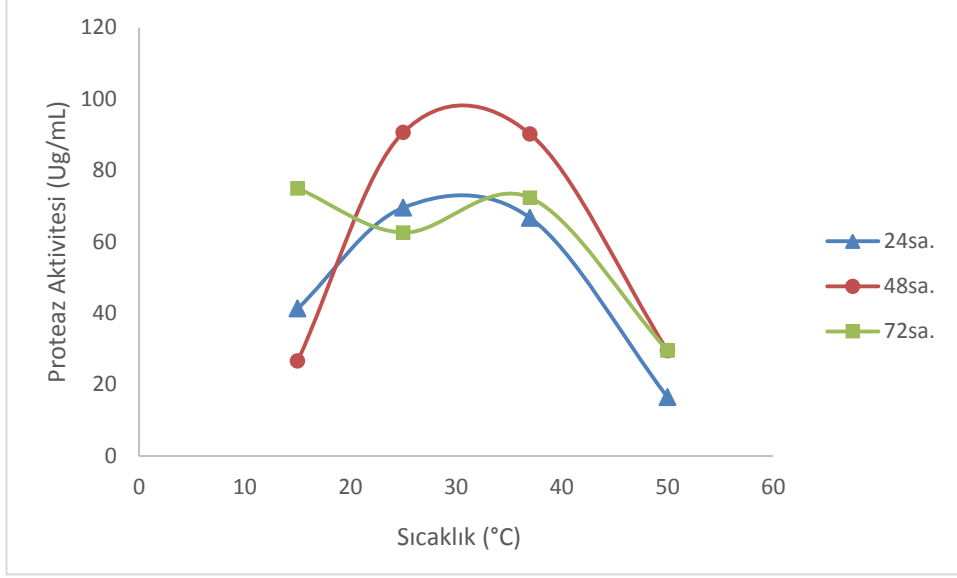
**Şekil 3.10. (b)** TK2' de İnkübasyon Sıcaklığının ve Başlangıç pH Değerlerinin Proteaz Enzim Üretimine Etkileri (Reaksiyon pH'ı: pH 9.0)



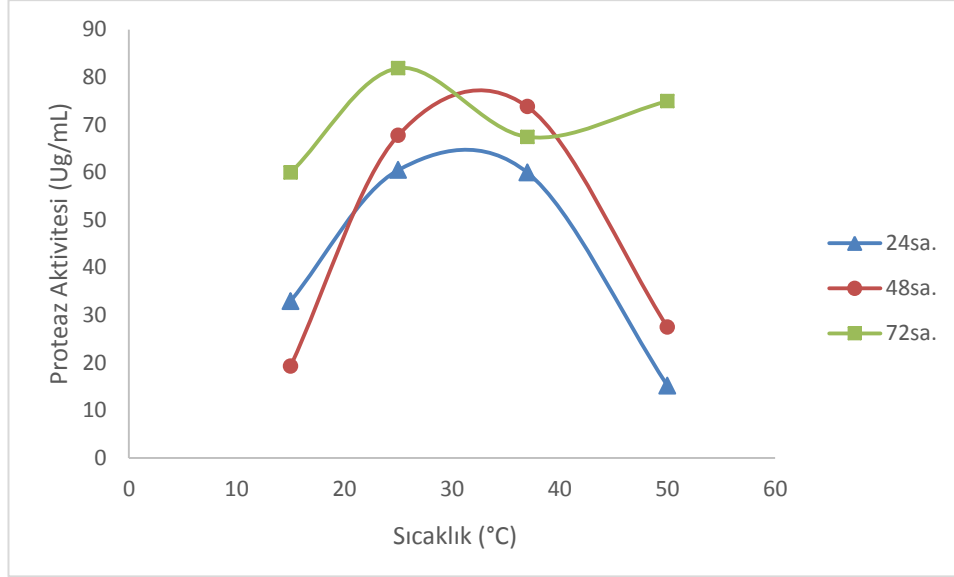
**Şekil 3.10. (c)** TK2' de İnkübasyon Sıcaklığının ve Başlangıç pH Değerlerinin Proteaz Enzim Üretimine Etkileri (Reaksiyon pH'ı: pH 10.0)



**Şekil 3.10. (d)** TK2' de İnkübasyon Sıcaklığının ve Başlangıç pH Değerlerinin Proteaz Enzim Üretimine Etkileri (Reaksiyon pH'ı: pH 12.0)

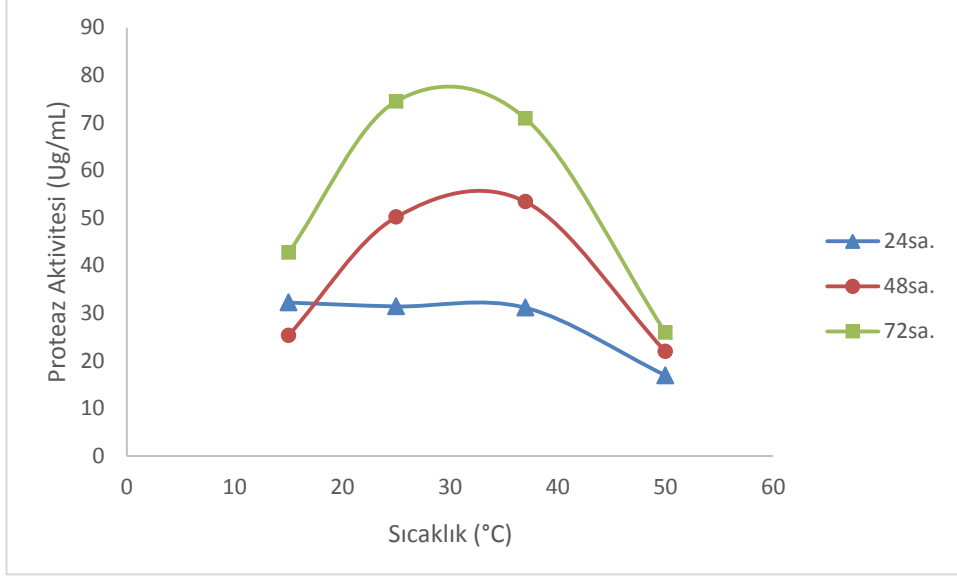


**Şekil 3.11. (a)** TK3' de İnkübasyon Sıcaklığının ve Başlangıç pH Değerlerinin Proteaz Enzim Üretimine Etkileri (Reaksiyon pH'ı: pH 7.0)

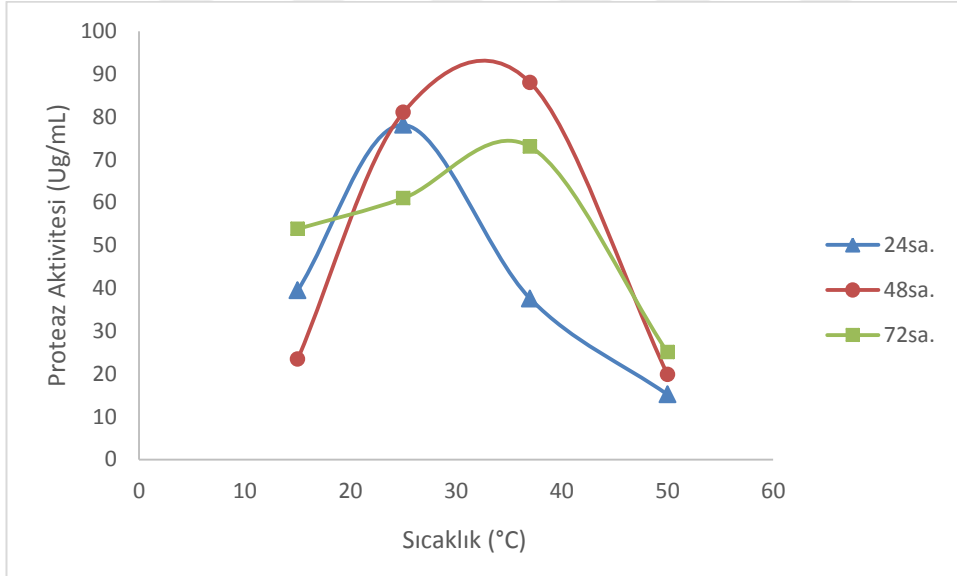


**Şekil 3.11. (b)** TK3' de İnkübasyon Sıcaklığının ve Başlangıç pH Değerlerinin Proteaz Enzim Üretimine Etkileri (Reaksiyon pH'ı: pH 9.0)





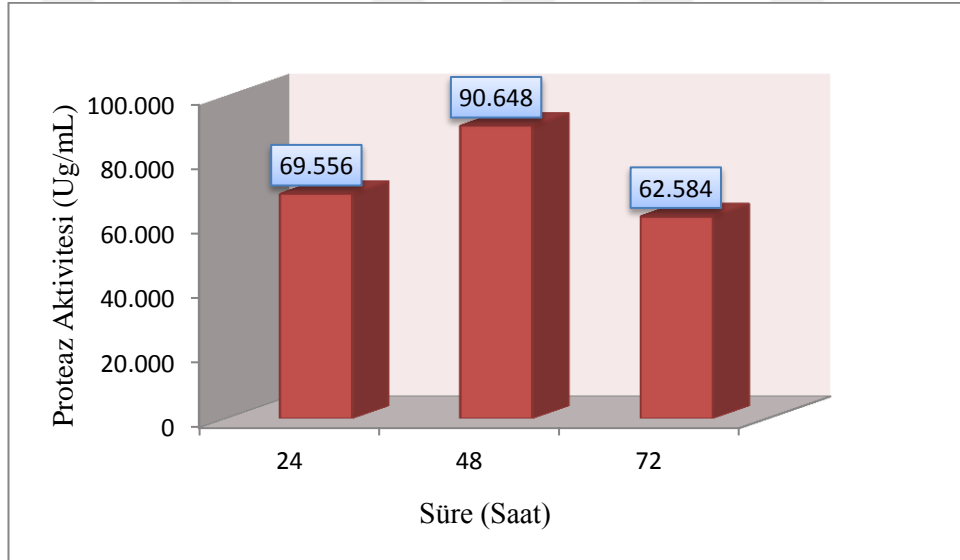
**Şekil 3.11. (c)** TK3' de İnkübasyon Sıcaklığının ve Başlangıç pH Değerlerinin Proteaz Enzim Üretimine Etkileri (Reaksiyon pH'ı: pH 10.0)



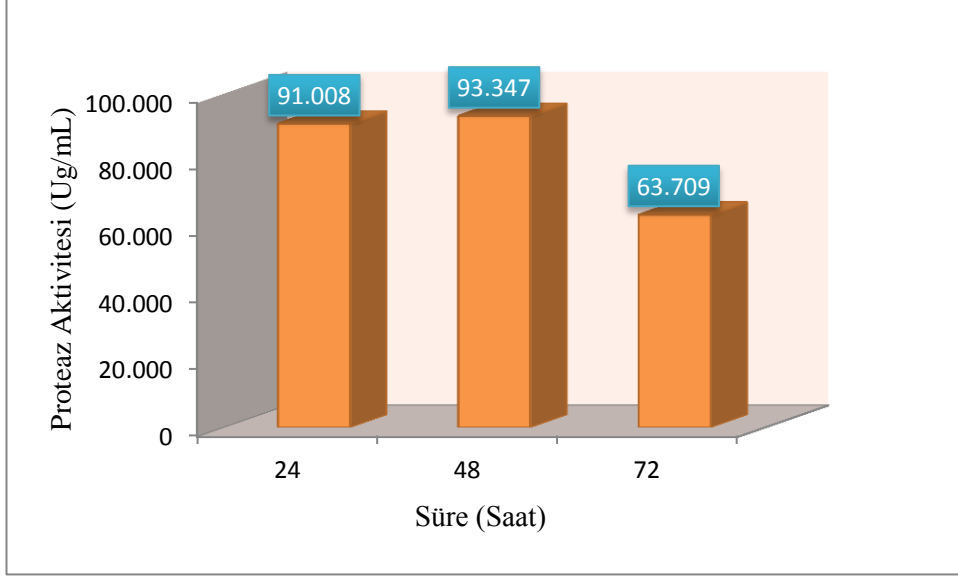
**Şekil 3.11. (d)** TK3' de İnkübasyon Sıcaklığının ve Başlangıç pH Değerlerinin Proteaz Enzim Üretimine Etkileri (Reaksiyon pH'ı: pH 12.0)

### 3.10. Proteaz Enzim Üretiminde İnkübasyon Süresinin Etkilerinin Sonuçları

Uygun enzim üretim besiyeri yerine ekilmiş olan izolatlar daha önceden belirlenmiş olan uygun pH ve uygun sıcaklığa ayarlanmış etüve konularak inkübasyona bırakılır ve 6, 12, 18, 24, 48 ve 72 saatlerde örnek alınarak her saate göre protein aktivite yöntemi ile enzim miktarı ölçülmüştür. 6,12 ve 18 saatlerde enzim üretiminin ya çok çok düşük ya da istenilen seviyelerde olmadığı için değerlendirilmeye alınmamıştır. Ölçülen enzim miktarları sonucuna göre de TK2 ve TK3 izolatlarının en yüksek aktivite 48.saatte ulaşıldığı tespit edilmiş ve sonuçlar aşağıdaki Şekil 3.12. (a) TK2 izolatının inkübasyon süresi – enzim ilişkisi ve Şekil 3.12. (b) TK3 izolatının inkübasyon süresi – enzim ilişkisi ' nde gösterilmiştir.



**Şekil 3.12. (a)** TK2 izolatının inkübasyon süresi – enzim ilişkisi ( Reaksiyon işlemi pH 7.0 ve sıcaklık 25 °C olarak ayarlanmıştır.)



**Şekil 3.12. (b)** TK3 izolatının inkübasyon süresi – enzim ilişkisi (Reaksiyon işlemi pH 12.0 ve sıcaklık 25 °C olarak ayarlanmıştır.)

### 3.11. Sodyum Tetraborat Dekahidrat' ın Proteaz Üretimine Etkisinin Sonuçları

Proteaz enziminin üretiminde kullanılan besi yerlerinin içine örneklerin alındıkları bölgenin bor madeni olmasından dolayı bir bor türevi olan Sodyum Tetraborat Dekahidrat konulmuş ve izolatların ekimleri yapılmıştır. Etkisinin belirlenmesi içinde protein aktivite yöntemi uygulanarak dışarıdan bor türevinin etkisi belirlenmiştir. Bu etkinin negatif olduğu ve enzim üretimini yarı yarıya düşürdüğü belirlenmiştir.

**Çizelge 3.4.** Sodyum Tetraborat Dekahidrat' ın Proteaz Üretimine etkisi

	TK2	TK3
Bor Türevi İlaveli Besi Yerinde Proteaz Aktivitesi (U g/mL)	77.26	75.76
Normal Enzim Besi Yerinde Proteaz Aktivitesi (U g/mL)	89.59	90.35

(Reaksiyon TK2 için 25 °C, pH 7.0 ve 48. saat ve TK3 için 25 °C, pH 12.0 ve 48. Saat olarak ayarlanmıştır.)

### **3.12. Farklı Karbon Kaynaklarının Proteaz Enzimi Üretimine Etki Sonuçları**

Uygun proteaz enzimi üretim besi yerinde karbon kaynağı olan glikoz çıkarılıp yerine önce sakkaroz konularak bakteri ekilmiş ve proteaz enzimine protein aktivite yöntemi ile bakılmış ama glikozlu besi yerindeki enzim üretim miktarından daha düşük miktar elde edilmiştir. Aynı durum glikoz yerine kullanılan karbon kaynağı nişasta içinde geçerlidir. Nişastalı enzim üretim besi yeri de çok düşük miktarlarda enzim elde edildiğinden karbon kaynağının glikoz olması uygun bulunmuştur.

**Çizelge 3.5. (a)** Karbon Kaynağı Olarak Nişasta Kullanılan Besi Yerinin Proteaz Üretimine Etkisi

	TK2	TK3
Nişasta İlaveli (Glikozsuz) Besi Yerinde Proteaz Aktivitesi (U g/mL)	76.37	78.14
Normal (Glikozlu) Enzim Besi Yerinde Proteaz Aktivitesi (U g/mL)	89.59	90.35

(Reaksiyon TK2 için 25 °C, pH 7.0 ve 48. saat ve TK3 için 25 °C, pH 12.0 ve 48. Saat olarak ayarlanmıştır.)

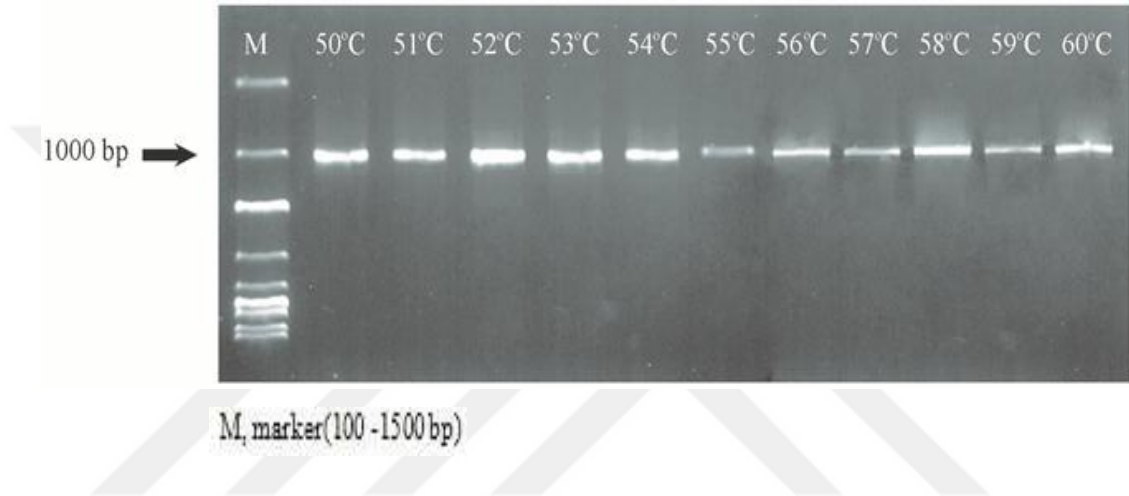
**Çizelge 3.5. (b)** Karbon Kaynağı Olarak Sakkaroz Kullanılan Besi Yerinin Proteaz Üretimine Etkisi

	TK2	TK3
Sakkaroz İlaveli (Glikozsuz) Besi Yerinde Proteaz Aktivitesi (U g/mL)	72.39	72.83
Normal (Glikozlu) Enzim Besi Yerinde Proteaz Aktivitesi (U g/mL)	89.59	90.35

(Reaksiyon TK2 için 25 °C, pH 7.0 ve 48. saat ve TK3 için 25 °C, pH 12.0 ve 48. Saat olarak ayarlanmıştır.)

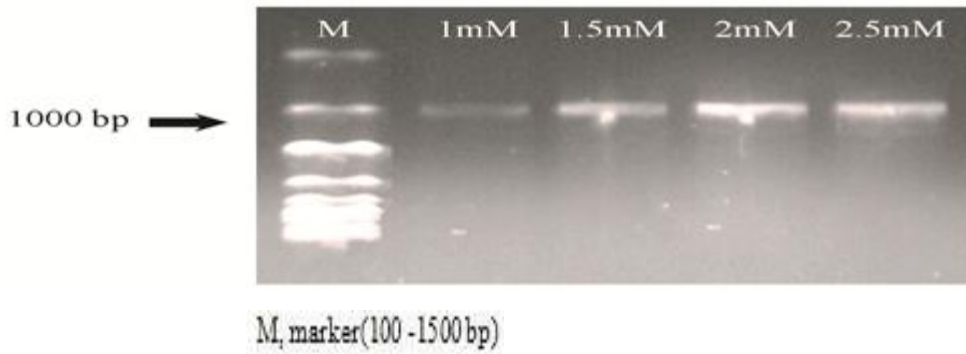
### 3.13. TK2 Adlı Suşun PCR ve 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması

PCR işlemlerinde 16S rDNA bölümleri çoğaltılarak elde edilen son ürünler hazırlanan % 1 'lik agaroz jele yüklenerek elektoroforezde yürütme işlemleri yapılmıştır. Yürütme işlemleri sonucunda oluşturulan PCR ürünleri yaklaşık 1000 bp' de görüntülenmiştir. PCR ürünlerinin sıcaklık ve MgCl<sub>2</sub> farklı konsantrasyonları denenerek elektroforez sonuçları elde edilmiştir. Bağlanma için en uygun sıcaklığın 52 °C olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 3.13.** TK2 Adlı Suşa Ait PCR Ürünlerinin Primer Bağlanma Sıcaklıkları

TK2 kodlu suş için primer bağlanma sıcaklığı optimum değeri belirlendikten hemen sonra primer bağlantılarının kuvvetlendirilmesi için farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları denenerek en uygun MgCl<sub>2</sub> değerinin 2 mM olduğu belirlenmiştir.

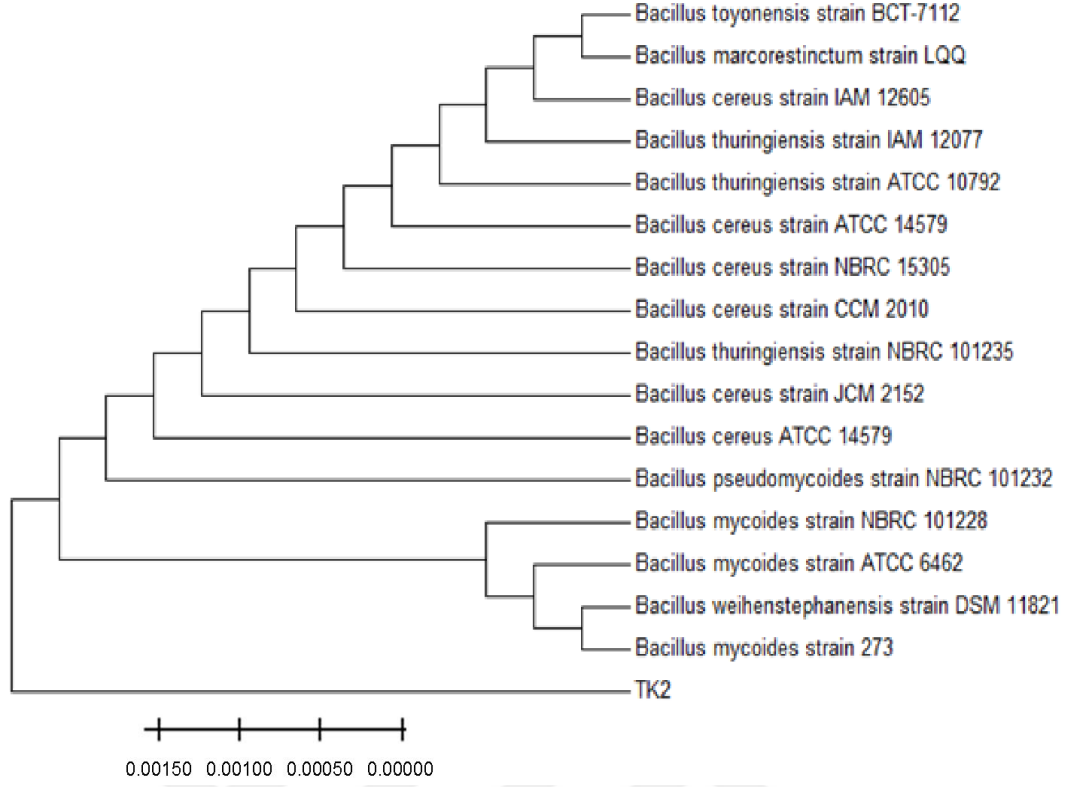


**Şekil 3.14.** TK2 Adlı Suşa Ait PCR Ürünlerinin Farklı MgCl<sub>2</sub> Konsantrasyonları

### 3.14. TK2 Adlı Suşun Tanımlanması ve Filogenetik Analiz Sonuçları

Filogenetik analiz yapılırken distance matrix diye bilinen (uzaklık matriksi) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile elde edilen veriler ile filogenetik soy ağacı oluşturulmuştur. Filogenetik analiz için MEGA 7 programı kullanılmıştır. TK2 adlı suşla ilgili veriler bu programa yüklenerek TK2 suşuna en yakın homolojiyi gösteren türler ile filogenetik ilişki belirlenmiştir. Yapılan BLAST çalışmaları sonucunda TK2 adlı suş gen bankasında tanımlanmış olan türler arasında *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus toyonensis* türlerine yaklaşık olarak % 99 oranlarında benzerlik göstermiştir. Ancak en yakın tür olarak *Bacillus cereus* ATCC 14579 türüne % 100' e yakın oranda homoloji gösterdiği belirlenmiştir. TK2 suşuna en uzak homolojiyi ise *Bacillus pseudomycoides* strain NBRC 101232 türü göstermiştir.

MEGA 7.0 programında 16S rDNA bölgelerine göre sıralanan dizileri uzaklık matriksine bağlı olarak neighbour-joining tree (soy ağacı) oluşturulmuştur. Oluşturulan bu soy ağacının doğruluğunu belirtmek için de 500 tekrarlı bootstrap (seç-bağla) analizi uygulanmıştır.



**Şekil 3.15.** TK2 suşuna ait neighbour-joining yöntemiyle oluşturulan dendrogram (0.00150: Nükleotidler arasındaki uzaklığı göstermektedir.)

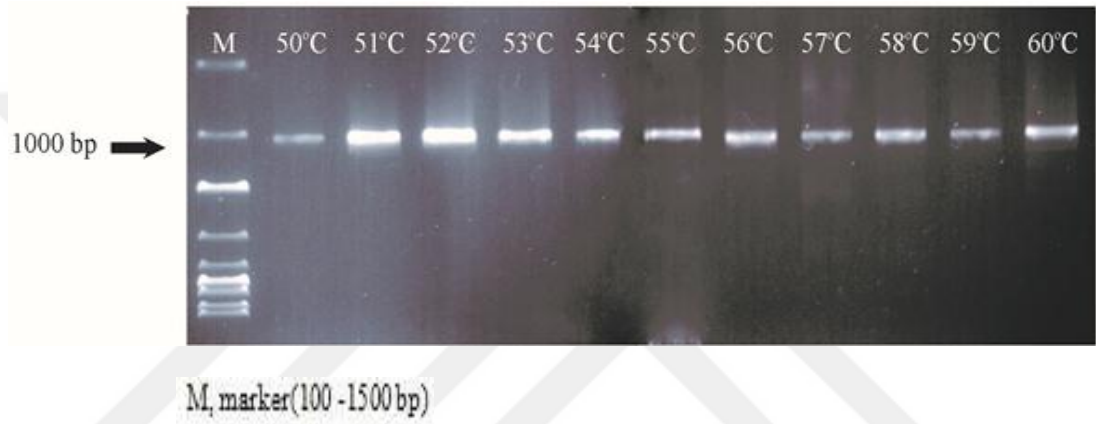


	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1. TK2																	
2. <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	0.582																
3. <i>Bacillus cereus</i> strain JCM 2152	0.582	0.000															
4. <i>Bacillus thuringiensis</i> strain NBRC 101235	0.582	0.000	0.000														
5. <i>Bacillus cereus</i> strain CCM 2010	0.582	0.000	0.000	0.000													
6. <i>Bacillus cereus</i> strain NBRC 15305	0.582	0.000	0.000	0.000	0.000												
7. <i>Bacillus cereus</i> strain ATCC 14579	0.582	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000											
8. <i>Bacillus thuringiensis</i> strain ATCC 10792	0.582	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000										
9. <i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077	0.582	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000									
10. <i>Bacillus cereus</i> strain IAM 12605	0.582	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000								
11. <i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	0.582	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000							
12. <i>Bacillus pseudomycooides</i> strain NBRC 101232	0.584	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003						
13. <i>Bacillus mycooides</i> strain NBRC 101228	0.583	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005				
14. <i>Bacillus mycooides</i> strain ATCC 6462	0.583	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	0.000			
15. <i>Bacillus weihenstephanensis</i> strain DSM 11821	0.583	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	0.000	0.000		
16. <i>Bacillus mycooides</i> strain 273	0.583	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	0.000	0.000	0.000	
17. <i>Bacillus marcorestrictum</i> strain LQQ	0.582	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	

Şekil 3.16. 16S rDNA dizi verileri yardımıyla TK2 suşu için oluşturulan türlerin eşleştirme değerleri

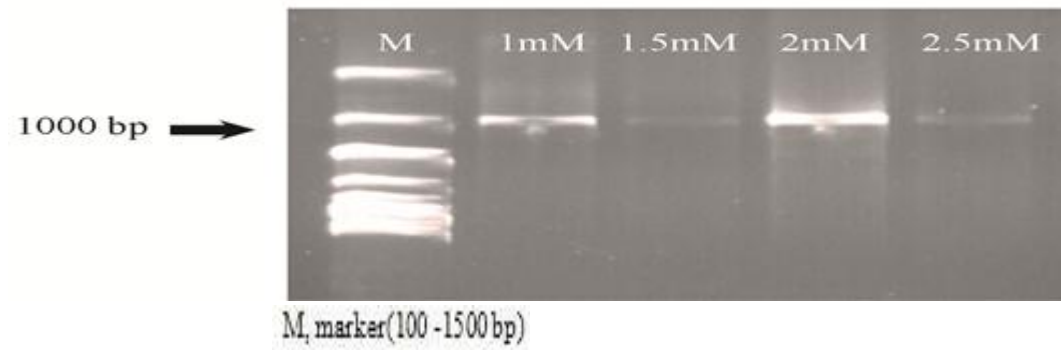
### 3.15. TK3 Adlı Suşun PCR ve 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması

PCR işlemlerinde 16S rDNA bölümleri çoğaltılarak elde edilen son ürünler hazırlanmış olan % 1 'lik agaroz jele yüklenerek elektoroforezde yürütme işlemleri yapılmıştır. Yürütme işlemleri sonucunda oluşturulan PCR ürünleri yaklaşık 1000 bp' de görüntülenmiştir. PCR ürünlerinin sıcaklık ve MgCl<sub>2</sub> farklı konsantrasyonları denenerek elektroferez sonuçları elde edilmiştir. Primer bağlanması için en uygun sıcaklığın 52 °C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.17. TK3 Adlı Suşa Ait PCR Ürünlerinin Primer Bağlanma Sıcaklıkları

TK3 kodlu suş için primer bağlanma sıcaklığı optimum değeri belirlendikten hemen sonra primer bağlantılarının kuvvetlendirilmesi için farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları denenerek en uygun MgCl<sub>2</sub> değerinin 2 mM olduğu belirlenmiştir.

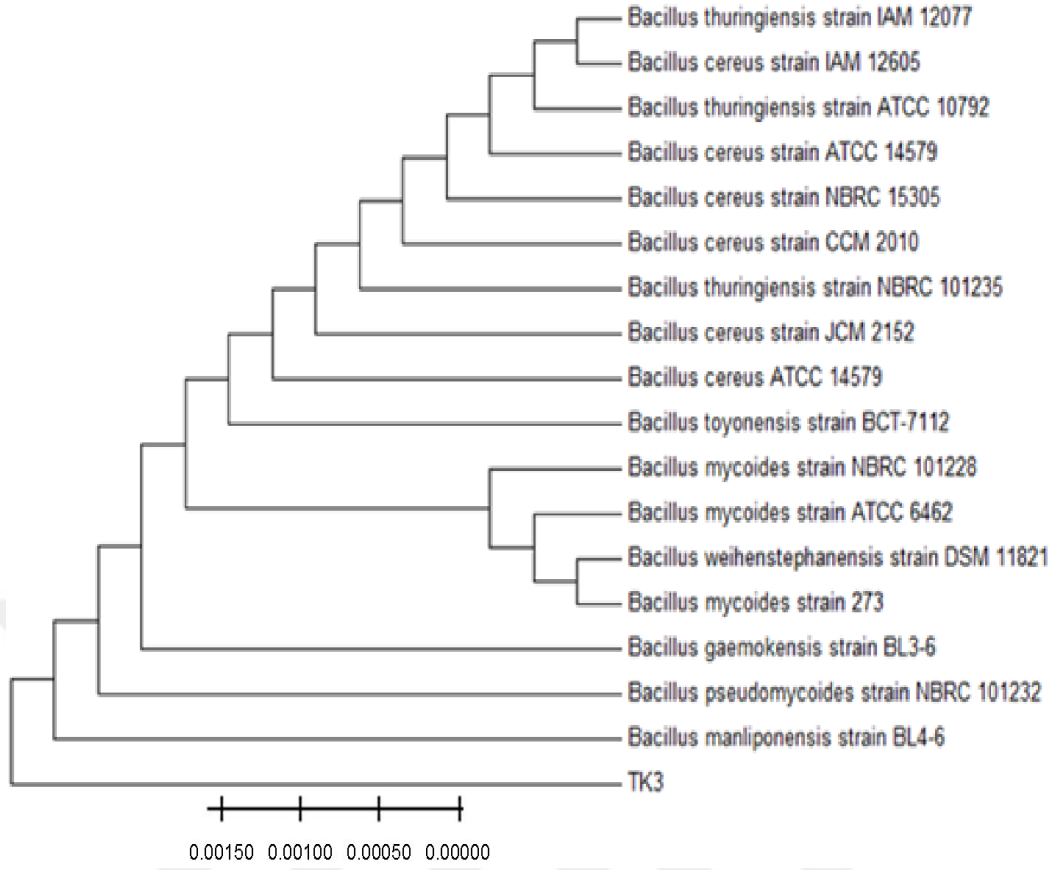


Şekil 3.18. TK3 Adlı Suşa Ait PCR Ürünlerinin Farklı MgCl<sub>2</sub> Konsantrasyonları

### 3.16. TK3 Adlı Suşun Tanımlanması ve Filogenetik Analiz Sonuçları

Filogenetik analiz yapılırken distance matrix diye bilinen (uzaklık matriksi) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile elde edilen veriler ile filogenetik soy ağacı oluşturulmuştur. Filogenetik analiz için MEGA 7 programı kullanılmıştır. TK3 adlı suşla ilgili veriler bu programa yüklenerek TK3 suşuna en yakın homolojiyi gösteren türler ile filogenetik ilişki belirlenmiştir. Yapılan BLAST çalışmaları sonucunda TK3 adlı suş gen bankasında tanımlanmış olan türler arasında *Bacillus toyonensis*, *Bacillus cereus* ve *Bacillus thuringiensis* türlerine yaklaşık olarak % 99 oranlarında benzerlik göstermiştir. Ancak en yakın tür olarak *Bacillus toyonensis* strain BCT-7112 türüne % 100' e yakın oranda homoloji gösterdiği belirlenmiştir. TK3 suşuna en uzak tür ise *Bacillus manliponensis* strain BL4-6 olduğu belirlenmiştir.

MEGA 7.0 programında 16S rDNA bölgelerine göre sıralanan dizileri uzaklık matriksine bağlı olarak neighbour-joining tree (soy ağacı) oluşturulmuştur. Oluşturulan bu soy ağacının doğruluğunu belirtmek için de 500 tekrarlı bootstrap (seç-bağla) analizi uygulanmıştır.



**Şekil 3.19.** TK3 suşuna ait neighbour-joining yöntemiyle oluşturulan dendrogram ( 0.00150: Nükleotidler arasındaki uzaklığı göstermektedir.)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. TK3																		
2. <i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	0.574																	
3. <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	0.574	0.000																
4. <i>Bacillus cereus</i> strain JCM 2152	0.574	0.000	0.000															
5. <i>Bacillus thuringiensis</i> strain NBRC 101235	0.574	0.000	0.000	0.000														
6. <i>Bacillus cereus</i> strain CCM 2010	0.574	0.000	0.000	0.000	0.000													
7. <i>Bacillus cereus</i> strain NBRC 15305	0.574	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000												
8. <i>Bacillus cereus</i> strain ATCC 14579	0.574	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000											
9. <i>Bacillus thuringiensis</i> strain ATCC 10792	0.574	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000										
10. <i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077	0.574	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000									
11. <i>Bacillus cereus</i> strain IAM 12605	0.574	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000								
12. <i>Bacillus pseudomycolides</i> strain NBRC 101232	0.574	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003							
13. <i>Bacillus mycolides</i> strain NBRC 101228	0.575	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005					
14. <i>Bacillus mycolides</i> strain ATCC 6462	0.575	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	0.000				
15. <i>Bacillus weihenstephanensis</i> strain DSM 11821	0.575	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	0.000	0.000			
16. <i>Bacillus mycolides</i> strain 273	0.575	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	0.000	0.000	0.000		
17. <i>Bacillus gaemokensis</i> strain BL3-6	0.575	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.005	0.008	0.008	0.008	0.008	
18. <i>Bacillus manliponensis</i> strain BL4-6	0.577	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.014	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019

Şekil 3.20. 16S rDNA dizi verileri yardımıyla TK3 suşu için oluşturulan türlerin eşleştirme değerleri

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada Balıkesir ilinin Bigadiç ilçesinde bulunan bor madeninden iki farklı noktadan alınan toprak örneklerinden 15 adet bakteri izolasyonu yapılmıştır. Skim milk besiyerine ekilen izolatlar 18 saat süre ile 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılarak inkübasyon sonunda bakterilerin oluşturdukları zon çaplarına göre aralarında en yüksek proteaz aktivitesi gösteren iki izolat ( TK2 ve TK3 ) belirlenmiştir. Ward (1985), *Flavobacterium pectinovorum* ile yaptıkları çalışmada en yüksek aktiviteyi skim milk varlığında olduğunu belirlemişlerdir. Nadeem ve ark. (2008) topraktan izolasyonunu yaptıkları *Bacillus* cinsi bakterileri skim milk besi yerlerine ‘yayma’ yöntemi ile ekerek, 37 °C’ de 18 saat süre ile inkübasyona bırakmışlar ve bakterilerin oluşturdukları zon çaplarına göre, bakterilerin proteaz aktivitesi miktarlarını belirlemişlerdir. Carlisle ve Falkinham (1989) ise skim milkli besi yerlerine *Bacillus* sp. kültürlerini ‘damlatma’ ve ‘sürme’ metodları ile ekmişler, bakterilerin oluşturdukları zonları milimetrik olarak ölçerek proteaz aktivite miktarlarını belirlemişlerdir.

İzole edilen bakterilerin besi ortamında üretilmesinde TK2 ve TK3 izolatları için optimum sıcaklığın 25 °C olduğu belirlenmiştir. Joshi ve ark (2007), *Bacillus cereus* MTCC 6840 suşuyla yaptıkları çalışmalarda proteaz enziminin en yüksek aktivite değerlerini pH 9.0 ve 20 °C’de olduğunu belirtmişlerdir. Jinsong ve ark (2006), ise *Bacillus cereus* SYP-A2-3 suşundan elde ettikleri proteaz enziminin 0°C’de % 6, 25°C’de % 60 oranında aktivite gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Yossan ve ark. (2006), *Bacillus* türleri üzerine yaptıkları çalışmalarda, en uygun sıcaklık değerinin 45 °C olduğunu belirlemişlerdir. Qadar ve ark. (2009), *Bacillus* sp. türünden elde ettikleri proteaz enziminin uygun sıcaklık değerinin 35 °C’de en iyi aktivite sonuçlarını gösterdiğini belirtmişlerdir.

Proteaz enziminin eldesinde uygun pH olarak pH 7.0 olarak yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Wang ve ark (2008), *Pseudoalteromonas* NJ276 suşundan elde ettikleri proteaz enziminin optimum pH 5.0 – 12.0 arasında en iyi aktivite

değerlerinin oluştuğu belirlenmiştir. Kobayashi ve ark (2007), ise *Alkaliphilus transvaalensis* suşundan elde ettikleri enzimin optimum pH değerinin 12.6' da aktivite gösterdiğini belirlenmiştir. Nedra ve ark. (2007)' da *Bacillus licheniformis* NH1 enziminin en iyi pH değerlerinin pH 10.0-11.0 aralığında olduğunu bildirmişlerdir. Reddy ve arkadaşları' da 2008 yılında yaptıkları çalışmada topraktan *Bacillus* sp. RKY3' ten izole ettikleri proteaz enziminin pH 7.0 – 9.0 aralığında yüksek oranda aktif olduğunu ve pH 5.0 – 11.0'e kadar olan aralıklarda kararlılık gösterdiği de belirtilmiştir. Yossan ve ark. (2006), *Bacillus* türleri üzerine yaptıkları çalışmalarda, bakterinin optimum pH değerinin 10.0 olduğunu tespit etmişlerdir. Qadar ve ark. (2009), bir *Bacillus* sp. türünden elde ettikleri proteaz enziminin en yüksek aktiviteyi pH 7.0' da gösterdiğini belirlenmiştir. Shaheen ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada *Bacillus subtilis*' ten elde edilen proteaz enziminin pH 11.0' de en yüksek aktiviteyi gösterdiğini belirlenmiştir. Safey ve ark. (2004) ise *Bacillus subtilis* ile yaptıkları çalışma sonucunda elde ettikleri proteazın pH 7.0' de en iyi aktiviteyi gösterdiğini belirtmişlerdir.

Çalışmalar için uygun pH ve uygun sıcaklık değerleri altında proteaz enziminin aktivite değerlerine inkübasyon süresi olarak 48.saatte ulaşılmıştır. Mahmoud ve arkadaşlarının 2005 yılında yapmış oldukları çalışmalarda *B. sphaericus* B-5 ve *B. subtilis* B-6 için en uygun inkübasyon süresini 48. saat olarak belirlenmiştir. Qadar ve arkadaşlarının 2009' da yaptıkları çalışmalarda *Bacillus* sp. PCSIR EA-3 türünün inkübasyonunda 48. saatin maksimum proteaz aktivitesine ulaşılrken, 72. saatten sonra enzim üretimi değerlerinin düşmeye başladığı belirtilmiştir.

Elde edilen izolatlarla yapılan biyokimyasal testlerden Gram boyama işlemi ile TK2 ve TK3 izolatları Gram (+) özellik gösterdikleri belirlenmiştir. Sharmin ve Rahman (2007)' nin *Bacillus* FS-1 ile yaptıkları çalışmalarda uyguladıkları Gram boyama işlemi sonucunda izole ettikleri türün Gram (+) olduğunu belirtmiştir. Proteaz üretimi yapılan bakteriler genel olarak Gram (+) oldukları literatürler de belirtilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan suşlara hidrojen peroksit damlatılarak katalaz testi uygulanmış ve sonucun pozitif olduğu belirlenmiştir. F. Sharmin. and M. Rahman 2007 yılında *Bacillus* strain FS-1 ile yaptıkları çalışmada da % 30' luk hidrojen peroksit ile katalaz testini denemişler ve sonucu pozitif olarak belirlemişlerdir.

Suşlar bir gün önceden canlandırılarak taze olarak triptofan besi yerine ekildikten sonra 37 °C ayarlanmış inkübatörde 5 gün bekletilmiş ve sürenin sonunda 0.5 mL Kovacs ayırıcı damlatılarak renk değişimi gözlenmemiş ve bu yüzden indol testinin negatif olduğu tespit edilmiştir. F. Sharmin. and M. Rahman 2007 yılında *Bacillus* strain FS-1 ile yaptıkları çalışmada 24 saat boyunca taze olarak ürettikleri suşlarını 1-3 gün boyunca 37 °C de inkübatöre bırakmışlar ve sürenin sonunda örnekleri Kovacs ayırıcı damlatarak renk değişimine bakmışlar, renk değişimi olmadığı içinde indol testinin sonucunu negatif olarak belirlemişlerdir.

Taze olarak canlandırılan suşlarımız clark-lubs besi yerine ekilmiş ve 7 gün boyunca 37 °C de inkübatörde bekletilmiştir. 7. günün sonunda besi yerlerine metil red damlatılarak değişime bakılmış ama değişiklik olmadığı için metil kırmızısı testi negatif kabul edilmiştir. F. Sharmin. and M. Rahman 2007 yılında *Bacillus* strain FS-1 ile yapmış oldukları çalışmalarda da denemiş oldukları metil red testinin pozitif olduğunu belirtmişlerdir.

Biyokimyasal testlerden bir diğeri olan Voges-Proskauer testi için bir gün önceden ekilmiş olan taze suşlarımız clark-lubs besi yerlerine ekilerek 5 gün inkübasyona bırakılmış, süre sonunda ortamlara 1 mL kadar 0.2 mL % 40' lık KOH, 0.6 mL % 5' lik alfa naftol ve 1 mL' ye tamamlanacak şekilde saf etanol damlatılarak birkaç saat bekletilmiştir. Birkaç saatin sonunda besi ortamlarında belirgin renk değişimi olduğu gözlenmiş ve VP testinin pozitif olduğunu belirlenmiştir. Literatüre bakıldığında da F. Sharmin. and M. Rahman 2007 yılında *Bacillus* strain FS-1 ile yapmış oldukları çalışmalarda 1 mL' lik bakteri kültürlerini peptonlu fosfat ortamlarına ekmişler inkübasyona bırakıp çıkardıktan sonra ortamların üzerine 0.2 mL % 40' lık KOH, 0.6 mL % 5' lik alfa naftol ve 1 mL' ye tamamlanacak şekilde saf etanol konularak



hazırladıkları solüsyonu damlatarak ortamın turuncu- kırmızı tonlarına değiştiğini belirleyerek VP testinin pozitif olduğunu ifade etmişlerdir.

Biyokimyasal testlerin sonucusu olan sitrat testi için taze kültürler Simon's Sitrat Agar besi yerine ekilmiş olarak 7 gün boyunca 37 °C de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda başlangıçtaki ortam rengini koruduğu ve değişiklik göstermediği için sitrat testi negatif olduğu belirlenmiştir. Literatüre bakıldığı zaman ise F. Sharmin. and M. Rahman 2007 yılında *Bacillus* strain FS-1 ile yapmış oldukları çalışmalarda bakteri kültürlerini iğne yardımıyla 1 inch miktarında tüplere yatık şekilde ekmişler 3 gün boyunca 37 °C de inkübasyona bırakmışlardır. Süre sonunda tüplerin başlangıçtaki yeşil renginin parlak mavi renge dönüştüğünü ve bakterilerin sitratı kullandığını tespit ederek sitrat testini pozitif olarak belirlemişlerdir.

Yapılan proteaz aktivite tayinleri sonucunda bir ünite (U/g/mL) enzim aktivitesi, dakikada 1 µg tirozinin ortaya çıkması için gerekli enzim miktarı olarak belirtilmiştir. Bu bağlamda 1 µg tirozinin ortaya çıkması için TK2 suşunda gerekli enzim miktarı 89.59 U/g/mL ve TK3 suşunda 1 µg tirozinin ortaya çıkması için gerekli enzim miktarı 90.35 U/g/mL olarak ölçülmüştür.

Bakteri suşlarımız için belirlenmiş olan uygun enzim üretim besi yerlerine suşlarımızın bu ortamda üretmiş oldukları proteaz miktarlarını proteaz aktivite yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntem sonucunda TK2 bakteri suşunun uygun reaksiyon şartları altında üretmiş olduğu proteaz miktarı 90.648 Ug / mL olarak belirlenmiştir. TK3 bakteri suşu ise uygun reaksiyon şartları altında ürettiği proteaz miktarı 93.347 Ug / mL olarak belirlenmiştir. Literatüre bakıldığında Pant ve arkadaşlarının (2015) *B. subtilis* kullanarak ürettikleri proteaz dakikada 143.73 Ug / mL aktivite göstermektedir.

Yapılan çalışmalar ile elde edilen proteaz enziminin üretimine enzimin üretildiği ortamın pH değerinin büyük önem taşıdığı belirlenmiştir. Bu bağlamda TK2 suşu için yapılan deneyler sonucu en yüksek proteaz miktarlarına pH 7.0' da ulaşılmış

olup yaklaşık 90.648 Ug / mL değeri ölçülmüştür. Diğer değerlere bakıldığında ise pH 12.0' ye ayarlanan enzim üretim ortamında proteaz miktarı 87.994 Ug / mL olarak ölçülmüştür. pH 9.0 ve pH 10.0'a ayarlanmış enzim üretim ortamlarında üretilen proteaz miktarı yeterli görülmemiştir. TK3 suşu ile yapılan deneylerde enzim üretiminin pH 12.0' ye ayarlanan ortamda 93.347 Ug / mL değeri ile en yüksek miktar ölçülmüştür. Diğer pH değerlerine sahip ortamlara bakıldığında ise pH 7.0' a ayarlanmış olan ortamda 86.600 değeri ölçülerek kabul edilebilir olarak belirlenmiştir. Diğer pH değerlere yeterli seviyede görülmemiştir. Wang ve arkadaşlarının 2008 yılında, *Pseudoalteromonas* NJ276 suşu ile yaptıkları çalışmalarda ekstraselüler proteaz enzimi üretmişler ve enzimin optimum pH 5.0-12.0 aralığında en iyi aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Kobayashi ve arkadaşlarının 2007 yılında yapmış oldukları çalışmalarda *Alkaliphilus transvaalensis* suşundan ürettikleri enzimin optimum pH değerinin 12.6 olduğunu belirlemişlerdir. Qadar ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada *Bacillus* sp.'den ürettikleri proteaz enziminin maksimum aktiviteyi pH 7.0' da gösterdiğini belirlemişlerdir. *Bacillus subtilis* ile çalışmalar yapan Safey ve arkadaşları (2004), elde etmiş oldukları proteazın pH 7.0' da en iyi aktiviteyi gösterdiğini belirtmişlerdir. Horikoshi ve arkadaşlarının (1990) *Bacillus* sp. AH-101'den ürettikleri alkalen proteazın pH 11.0 -12.0'de en yüksek aktiviteyi gösterdiğini belirtmişlerdir.

Elde edilen proteaz enziminin aktivitesine en uygun sıcaklık değerinin bulunması yapılan çalışmalar sonucu TK2 ve TK3 suşlarının her ikisi içinde 25 °C belirlenmiştir. Her iki suş içinde uygun pH ortamında 25 °C sıcaklıkta en yüksek proteaz miktarları ölçülmüştür. Jinsong ve ark (2006), *Bacillus cereus* SYP-A2-3 suşundan izole edilen proteaz enziminin 0°C'de %6, 25°C'de %60 relatif aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Hui ve arkadaşlarının 2009 yılında *Penicillium chrysogenum* FS010 suşu ile yaptıkları çalışmalar ile elde ettikleri proteaz enziminin 15 °C - 35 °C yüksek aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Çalışma da uygun şartlar ayarlanarak hazırlanan ortamların en yüksek proteaz aktiviteyi belirlemek için ortamlar inkübasyona bırakılır ve belirli saatlar baz

alınarak ölçümler yapılmıştır. Bu ölçümlerin sonucunda hem TK2 hem de TK3 için en yüksek aktiviteye 48. saat de ulaşılmıştır. Mahmoud ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmada *B. sphaericus* B-5 ve *B. subtilis* B-6 suşları için optimum inkübasyon süresini 48 saat olarak belirlemişlerdir. Qadar ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada *Bacillus* sp. PCSIR EA-3 suşu için 48. saatlik inkübasyon süresi sonunda en yüksek alkalen proteaz aktivitesi belirlenirken, 72. saatten sonra proteaz enzim üretiminde düşüş görüldüğü belirlenmiştir.

Suşların borlu topraktan alındığı için proteaz enzim üretim besisi yerine bir bor türeviden olan Sodyum Tetraborat Dekahidrat eklenerek etkilerine bakıldı ancak negatif bir etki yaparak proteaz enzim miktarını düşürdüğü gözlemlendi. TK2 için ölçülen proteaz enzim miktarı 77.26 U / mg, TK3 için de 75.76 U / mg' dır. Dahot 1994, Nascimento ve Martins 2004, Vidyasagar ve ark. 2009 yıllarında, proteaz enzimi üzerine yapmış oldukları çalışmalarda kullanılan  $Cu^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Ag^{+2}$ ,  $K^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  gibi iyonların enzim aktivitesini düşürdüğünü belirlemişlerdir.

Proteaz enzimi üretimi için belirlenen enzim üretim besisi yeri karbon kaynağı olarak glikoz kullanılmış ve böylelikle enzim aktivitesinin yüksek olması sağlanmıştır. Glikoz yerine karbon kaynağı olarak aynı miktarlarda sakkaroz ve nişasta kullanılmış fakat elde edilen enzim miktarları glikoza göre daha düşük seviyelerde kalmıştır. Sakkarozlu besiyerlerinde TK2 de 72.39, TK3 de 73.83 U / mg, glikozlu besiyerlerinde ise ölçülen değerler ise TK2 de 89.59, TK3 de 90.35 U / mg olarak ölçülmüştür. Nişastalı besiyerlerinde TK2 ile ölçülen değer 76.37 U / mg ve TK3 için ise 78.14 U / mg' dır. Yüksekdağ ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2004), *B. subtilis* ve *B. megaterium* türlerinde en yüksek proteaz aktivitesini sağlayan karbon kaynağı glikoz olduğunu belirtmişlerdir. Gessesse ve Gashe 1997 yılında yaptıkları çalışmada glikoz ve sükröz proteaz enzimi üretimi için en uygun karbon kaynakları olarak belirlenmiştir.

Özellikle böyle önemli toprak kaynaklarından elde edilen bakterilerin ticari olarak satılan bakterilerin ürettiği proteaz enzimi ile karşılaştırıldıklarında yakın sonuçların olabileceği ve böylelikle ticari bakterilere bağımlılığın giderek

azalabileceği gösterilmiştir. Bor ile yapılan çalışmaların günümüzde giderek hızlanması sonucu borun canlılar için biyolojik önemi belirlenmeye başlamıştır. Yapılan bu çalışma ile daha kapsamlı ve daha geniş çalışma şartları ile bu konunun önemli bir seviyeye gelebileceği gösterilmek istenmiştir. Özellikle yapılacak yeni çalışmalarla ticari olarak elde edilen enzimlerin karşılaştırılması ile ticari alım bağımlılığı ortadan kalkabilecektir.

Ayrıca Türkiye genelinde bulunan bütün bor rezervlerini kapsayacak geniş çalışmalar ile yeni proteaz kaynakları elde edilebilir. şu ana kadar bor ve bakteri ilişkisini açıklayan çalışmaların olmayışı, dünyanın en fazla bor rezervine sahip ülkemizde büyük bir eksikliktir. Bu alışma gibi bor ve bakteriler ile yapılacak kapsamlı çalışmalar bor madeninin canlılık için önemini daha iyi açıklayabilecektir.

## KAYNAKLAR

Anonim: (<http://www.etimaden.gov.tr/tr/page/bor-rezervleri>,  
Erişim Tarihi:17.09.2016).

Anonim: (<http://www.etimaden.gov.tr/tr/page/bor-turkiye-tarihcesi>,  
Erişim Tarihi:17.09.2016).

Anonim: (<https://tr.wikipedia.org/wiki/Papaya>, Erişim Tarihi:29.09.2016)

Anonim: (<https://tr.wikipedia.org/wiki/Pepsin>, Erişim Tarihi:29.09.2016)

Adınarayana, K., Ellaiah, P. and Prasad, S.D., 2003. Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from A Newly Isolation *Bacillus subtilis* PE-11. AAPS Pharmscitech, India, 4(4): 56.

Aehle W. , (2007), “Enzymes in Industry: Production and Applications Third Completely Revised Edition”, 3rd Edition, Wiley Press Incorporated.

Andersen, L.P. 1998 Method for dehairing of hides or skins by means of enzymes.  
US Patent 5, 834,299

Anderson, G. R. , & Jordan, J. V. (1961) Boron. A non-essential growth factor for *Azotobacter hroococum*. Soil Sci 92: 113–116.

Anwar, A., M., Saleemuddin, 1997. Alkaline Proteases: A Review, Bioresource Technology, 64:175-183.

Aunstrup K., (1980), “Proteinases”, Economic Microbiology: Microbial Enzymes and Bioconversions, 5, 50–114.

- Babe, L.M. , Craik C.S., 1997. Viral Proteases: Evolution of diverse structural motifs to optimize function, *Cell*, vol. 91, P: 427-430.
- Banerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi,W., Soni,R. 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochem* 35: 213-219
- Bayoudh, A. , Gharsallah, N., Chamkha, M. , Dhouib, A. , Ammar S. and Nasri, M. , 2000, Purification and characterization of an alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* MN1, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24 (4), 291-295.
- Boyce, S. and Tipton, K.F., 2005, *Enzyme classification and nomenclature*, John Wiley & Sons, Ltd.,
- Brady, D., Duncan, J.R. and Russell, A.E., 1994. Partial purification of an extracellular protease produced by *Proteus vulgaris*, *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 78 (5), 153-156.
- Bulut, Ş., 2007, Marinal bakteri *Teredinobacter turnirae*' den proteaz üretimi, Doktora Tezi, Fırat Ü. Fen Bil. Ens., 188s.
- Carlisle, G.E., J.O., Falkinham, 1989. Enzyme activities and antibiotic susceptibility of colonial variants of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Appl Environ Microbiol.*, 55(11): 3026–3028.
- Cutting, S.M. and Horn, PB., Genetic analysis in *Molecular Biological Methods for Bacillus*. Edited by: Harwood C, Cutting S. John Wiley and Sons, Chichester, UK; 27-74, 1990.

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

Chakraborty, R. and Srinivasan, M., 1993, Production of a thermostable alkaline protease by a new *Pseudomonas* sp. by solid substrate fermentation, Journal of Microbial Biotechnology, 8, 7–16.

Chang, S.J. , Kim, Y.S., Yang, H.C., Sung, H.C. and Choi, Y.J., 1988, A study on the alkaline protease produced from *Bacillus subtilis*, Journal of the Korean Agricultural Chemical Society, 31, 356-360.

Chaplin, M.F., and Bucke, C., “Enzyme Technology”, Cambridge University Press, Cambridge, 20-35 (1990).

Cheong, C., Chun, S.S. and Kim, Y.H., 1993, Production and properties an alkaline protease from *Pseudomonas* sp. SJ-320, Korean Biochemistry Journal, 26, 479- 484.

Çetin, E. T. "Pratik Mikrobiyoloji." *İstanbul Üniversitesi* 2 (1968).

Dahot, M. U., 1994. Purification And Some Properties of Alkaline Protease From *Penicillium Expansum*. Journal of Islamic Academy of Sciences 7:2, 100-105.

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

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

- Deshpande, V.V., Rao, M., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 62, No.3, p. 597-635
- Deshpande, V.V., 2005. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Process Biochemistry* 40: 3152 – 3158.
- Drenth J., Jansonius J. N., Koekoek R., Swen H. M., Wolthers B. G., (1968), "Structure of Papain", *Nature*, 218, 929-32.
- Duran, K., E., Bozacı, H.A., Karahan, 2007. Protein Esaslı Mamüllerin Enzimatik Ön Terbiyesi, Ege Üniversitesi Tekstil Mühendisliği Bölümü. Tekstil ve Konfeksiyon Araştırma Uygulama Merkezi Yayını
- Edwards, D.R, M.M., Handsley, C.J., Pennington, 2008. The ADAM metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* 29 (5): 258–89. *Enzyme biotechnology*. (Ed.): A. Wiseman. Ellis Harwood, U.K., P: 88.
- Erarslan, A., Denizci, A.A., Kazan, D., Abeln, E.C.A. 2004. Newly isolated *Bacillus clausii* GMBAE 42: an alkaline protease producer capable to grow under highly alkaline conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 96;320-327
- Fadıloğlu, S., O., Erkmen, 2004. Gıda sanayinde enzimlerin önemi. Gaziantep Üniversitesi, Bilimsel yayınlar kataloğu. s: 1-16.
- Fankhauser, D.B., 2007. Fankhauser's Cheese Page. *Enzyme biotechnology*, P:1-25.
- Ferrero, M.A., Castro, G.R., Abate, C.M., Baigori, M.E. and Sineriz, F.E., 1996, Thermostabil alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 327-332.
- Fogarty, William M., and C. T. Kelly. "Starch-degrading enzymes of microbial origin." *Progress in Industrial Microbiology* (1979).



- Freeman S.A., Peek K., Prescott M., Daniel R. (1993). Characterization of a chelatorresistant proteinase from *Thermusstrain* Rt4A2. *Biochem. J.*, 295: 463–469.
- Fujiwara, N. and Yamamoto, K. , 1987, Production of alkaline protease in low cost medium by alkalophilic *Bacillus* sp. and properties of the enzymes, *Journal of Fermentation Technology*, 65, 345-348.
- Fujiwara, N., Yamamoto, K., Masui, A. 1991. Utilization of a thermostable alkaline protease from an alkaliphilic thermophile for the recovery of silver from used X-ray film. *J Ferment Bioeng* 72:306-308
- Gaiju, H. , Bhalla, T.C. and Agarwal, H.O. , 1996, Thermostable alkaline protease from thermophilic *Bacillus coagulans* PB-77, *Indian Journal of Microbiology*, 36, 153-155.
- Gençkal, H. 2004., *Studies on Alkaline Protease Production from Bacillus sp.* Yüksek Lisans Tezi , İzmir Institute of Technology, P: 26-55.
- Gessesse, A., and Gashe. B:A., 1997. Production of Alkaline Xylanase by an *Bacillus* sp. Isolated from an Alkaline Soda Lake. *Journal of Applied Microbiology*. 83: 402-406.
- Gupta, R., Beg, Q. K., Khan, S., Chauhan, B., 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbial Biotechnology* 60: 381 –395.
- Ha, M., El-Din, A., Bekhit, A., Carne, A., Hopkins, D. L., 2012. Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin ve zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food Chemistry*. 134 (2012) 95-105.
- Hartley, B. S. "Proteolytic enzymes." *Annual review of biochemistry* 29.1 (1960): 45-72.

- Heineken, F.G. and O'Conner, R.J., 1972, Continuous culture studies on the biosynthesis of alkaline protease, neutral protease and alpha amylase by *Bacillus subtilis* NRRL B-3411, *Journal of General Microbiology*, 73, 35-44.
- Horikoshi, K., Takami, H., Akiba, T. 1990. Characterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer-Verlag 1990
- Horikoshi, K., 1996. Alkaliphiles-from an industrial point of view. *FEMS Microbiology Reviews*, 18: 259-270.
- Hui, Y.Z., Yong,T., Yun,H.H. and Tian, H.W., 2009. Purification and characterization of the cold-active alkaline protease from marine cold70 adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010. *Mol Biol Rep*, 36: 2169–2174.
- Irschik, H., Schummer, D., Gerth, K., Hofle, G., Reichenbach, H. (1995) The tartrolons, new boron-containing antibiotics from a myxobacterium, *Sorangium cellulosum*, *J Antibiot*, Tokyo, 48: 26-30.
- İsmarcı, 2014. *Bacillus megaterium'* dan Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara
- Jacobson, J.W., Glick, J.L., Madello, K.L. 1985 Composition for cleaning drains clogged with deptsits containing hairs. US Patent 4, 540, 506
- Jinsong, S., Zhenghong, X., Qifan, W., and Wenyi, T., 2006. Purufication and characterization of cold adapted protease produced by psychrotrop og glacier environment. *Chin. J. App. Environ. Biol*, 12(1): 72-75.
- Johnvesly, B., Naik, G.R., “Studies On Production Of Thermostable Alkaline Protease From Thermophilic *Bacillus* sp. JB-99 in a Chemically defined medium”, *Process Biochemistry*, 37: 139-144 (2001).

- Joshi, G. K., Kumar, S. and Sharma, V., 2007. Production of moderately halotolerant, SDS stable alkaline protease from *Bacillus cereus* MTCC 6840 isolated from lake namital, Uttaranchal state, India. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38: 773-779.
- Kalaiarasi, K. and Sunitha, P. U., 2009, Optimization of alkaline protease production from *Pseudomonas fluorescens* isolated from meat waste contaminated soil, *African Journal of Biotechnology*, 8 (24), 7035-7041.
- Kamphuis I. G., Kalk K. H., Swarte B. A., Drenth J., (1984), "Structure of papain refined at 1.65 Å resolution", *Journal of Molecular Biology*, 179, 233-256.
- Karmakar S.R., 1999. *Chemical Technology in The Pretreatment Process of Textiles*, Elsevier Science B.V. P:18-24.
- Kasavi, C., 2006. Kovalent bağlanma ve fiziksel adsorbsiyon metodları ile proteaz enziminin immobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Kato, T., Yamagata, Y., Arai. T., Ichishima, E., "Purification of a new extracellular 90-kDa serine proteinase with isoelectric point of 3.9 from *Bacillus subtilis* (*natto*) and elucidation of its distinct mode of action", *Biosci Biotech Biochem*, 56:1166–1168 (1992).
- Katsaros, G.I., Tavantzis, G., Taoukis, P.S., 2010. Production of novel dairy products using actinidin and high pressure as enzyme activity regülatör. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11 (2010) 47-51.
- Kaul-Hatti, Rajni. "Enzyme production." *Biotechnology. In Encyclopedia of Life Support Systems* 5 (2004).

- Kaur, S., Vohra, R.M., Kapoor, M., Beg, Q.K., Hoondal, G.S. 2001. Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2. *World J Microbiol Biotechnol* 17: 125-129
- Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2009. *Biyokimya. Aktif Yayınevi*, 92-118, Erzurum.
- Kemp. P. H. (1956) *The Chemistry of Borates, Part I: Borax Consolidated*, London.
- Kıran, Ö.E., Çömlekçiöğlü U. ve Dostbil N., 2006, Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1)
- Kishore, L, K. Natarajan, and C. R. Babu. "Total soluble protein and membrane lipopolysaccharide profiles in differentiating *Rhizobium* isolates." *Microbios* 86.348 (1996): 143-156.
- Kobayashi, T., Lu, J., Li, Z., Hung, H.S., Kurata, A., Hatada, Y., Takai, K., Ito, S. and Horikoshi, K., 2007. Extremely high alkaline protease from a deep-subsurface bacterium, *Alkaliphilus transvaalensis.*, 75: 71-80.
- Kohno, J., Kawahata, T., Otake, T. (1996) Boromycin, an anti-HIV antibiotic, *Biosci Biotechnol Biochem*, 60: 1036-1037.
- Krajewska, B., 2003. Application of Chitin and Chitosan Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review, *Enzyme and Microbial Technology*, 35:126-139.
- Kudrya, V.A. and Simonenko I.A. 1994 Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 41: 505-509
- Kumar C. G., Takagi H., (1999), "Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint", *Biotechnology Advances*, 17, 561-594.

- Kwon Y.T., Kim J.O., Moon S.Y., Lee H.H., Rho H.M. (1994). Extracellular alkaline protease from alkalophilic *Vibrio metschnikoviistrain* RH530. *Biotechnol. Lett.*, 16: 413–418.
- Larcher G., Cimon B., Symoens F., Tronchin G., Chabasse D., Bouchara J.P. (1996). A 33 kDa serine proteinase from *Scedosporium apiospermum* *Biochem. J.*, 315: 119–126.
- Laxman, R.S., Sonawane, A.P., More, S.V., Rao, B.S. Rele, M.V. Jogdand, V.V., 2005. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* . *Process Biochemistry* 40: 3152 – 3158.
- Lenette, E.H., Balows, A., Hausler, J.W.J. and Shadomy, J.H., 1985. *Manuel of clinical Microbiology*. USA, 4: 1149.
- Long, S., Mothibelli, M.A., Robb, F.T. and Woods, D.R., 1981, Regulation of extracellular alkaline protease by histidine in a collagenolytic *Vibrio alginolyticus* strain, *Journal of General Microbiology*, 127, 193-199.
- Mahler, R.H., H., Cordes, 1966. *Biological Chemistry*, New York, P: 346- 411.
- Mahmoud, M.A., Al-Agmay, M.H.M., El-loboudy, S.S. and Ashour, M.S., 2005, Production and properties of an extra-cellular neutral protease from *Bacillus* species, *Research Bulletin F. of Science, Al Azhar University*, 211-215
- Mateo, P., Bonilla, I., Fernandez-Valiente, E., Sanchez-Maeso, E. (1986) Essentiality of boron for dinitrogen fixation in *Anabaena* sp PCC 7119. *Plant Physiol* 94: 1554-1560.
- Mathew, J., 1999, *Microbial proteases, isolation, purification and characterization*, PhD Thesis, Mahatma Gandhi U., 151 p.

- Maurer K. H., (2004), "Detergent Proteases", *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 330-334.
- Metzler, D., E., "Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells", *Harcourt Academic Press*, 1:625-627 (2001) *microbiology: an introduction*, Blackwell Science Ltd., London, 288 p.
- Miller, S.B., 1992, Simple enzyme experiments, Tested studies for laboratory teaching, Volume 6
- Mizusawa, K., Ichishima, E. and Yoshida, F., 1969, Production of thermostable alkaline protease by *Streptomyces*, *Applied Microbiology*, 366-371.
- Nadeem, M., Qazi, J.I., Baig, S., Syed, Q., 2008. Effect of Medium Composition on Commercially Important Alkaline Protease Production by *Bacillus licheniformis* N-246 (4) 388–394.
- Nascimento, A.C.W., Martins, L. L. M., 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35:91-96
- Nduwimana J., Guenet L., Dorval I., Blayau M., Le Gal J. Y., Le Treut A., (1995), "Proteases", *Annual Biologie Clinique*, 53, 251-264.
- Nedra, E.H.A., Rym, A., Basma, G.F., Alya, S.K., Safia, K. and Moncef, N., 2007. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. *Enzyme and Microbial Technology*. 40: 515-523.
- Nelson, D. , M.M. , Cox, 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, N. Kılıç (Editor), 3. Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık, Sayfa: 243-290.

- Nilegaonkar S., Zambare P., Kanekar P., Dhakephalkar P., Sarnaik S., (2006), "Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCMB-326", *Bioresource Technology*, 98, 1238–1245.
- Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., Saxena, R.K., Gupta, R. 2001. Characterization and wash performance analysis of an SDS-resistant alkaline protease from a *Bacillus* sp. *World J Microbiol Biotechnol* 17: 493- 497
- Öztürk, M.H., 2004. Partial Purification and Characterization of Alkaline Proteases from Isolated *Bacillus* Strains, *Yuksekk Lisans Tezi*, İ.T.U. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Polaina J., MacCabe A. P., (2007), "Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications", 1st Edition, Wiley Press Incorporated.
- Qadar, S. A., Shireen, E., Iqbal, S., Anwar, A., 2009. Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG 2 isolated from an industrial effluent. *Indian Journal of Biotechnology*. Vol:8, P:286-290.
- Pant, G., Prakash, A., Pavani, J.V.P., Bera, S., Deviram, G.V.N.S., Kumar, A., Panchpuri, M., Prasuna, R.G, 2015. Production, Optimization and Partial Purification of Potease from *Bacillus subtilis* *Journal of Taibah University for Science* 9(1): 50-55.
- Rao, B.M., Tanksale, M.A., Ghathe, S.M., and Deshpande, V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3): 597-635.
- Reddy L. V. A., Wee Y. J., Yun J. S., Ryu H. W., (2008), "Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches", *Biosource Technology*, 99.

- Reddy, M.N., Kumar, C.K., Swathi, K., Nagamani, B., Venkateshwar, S. and Rao, L.V., 2011, Extracellular alkaline protease production from isolated *Bacillus subtilis* SVR-07 by using submerged fermentation, International Journal of Pharmaceutical Research and Development, 3 (1), 216-223.
- Safey, E. M., Abdul, U. M., 2004. Production ,Purification, Characterization of Protease Enzyme from *Bacillus subtilis*. International Conferences For Development And The Environment In The Arab World, Assiut Univ., P:23-25.
- Salleh, AB., Rahman, RNZR, Basri, M., “New Lipases and Proteases, 2nd ed.”, *Nova Science Publishers, Inc.*, New York, 29 (2006).
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sarı, E., 2011. *Bacillus Circulans* M34’ten Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (Yüksek Lisans Tezi), Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Sengupta, S. and Dasgupta, M., 2006, Industrial and clinical applications excluding diagnostic clinical enzymology, *Enzymology*, 25 p.
- Sevinç, N. 2010. Türkiye Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* sp. Suşlarından Proteaz Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi-Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Shaheen, M., Shah, A.A., Hameed, A. and Hasan, F., 2008, Influence of culture conditions on production and activity of protease from *Bacillus subtilis* BS1, *Pakistan Journal of Botany*, 40 (5), 2161-2169.



Shahbazi, R., Kasra-Kermanshahi, R., Gharavi, S., Moosavi-Nejad, Z., Borzooee, F., Screening of SDS-degrading bacteria from car wash wastewater and study of the alkyl sulfatase enzyme activity. *Iran Journal of Microbiology*, 5: 153-158, 2013.

Sharmin, F., and M. Rahman. "Isolation and characterization of protease producing *Bacillus* strain FS-1." (2007).

Shigei J. Test methods used in the identification of commonly isolated aerobic gram-negative bacteria: Indole test. In: Isenberg HD (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press, Washington D.C. 1992, p. 1.19.13 - 1.19.16

Shimogaki, H., Takeuchi, K., Nishino, T., Ohdera, M., Kudo, T., Ohba, K., ... & Irie, M. (1991). Purification and properties of a novel surface-active agent-and alkaline-resistant protease from *Bacillus* sp. Y. *Agricultural and biological chemistry*, 55(9), 2251-2258.

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

Singh J., Batra N., Sobti R. C., (2001), "Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1", *Process Biochemistry*, 36, 781-785.

Singh, J.; Vohra, RM.; Sahoo, D.K.: "Purification and Characterization of Two Extracellular Alkaline Protease from a Newly Isolated Obligate Alkalophilic *Bacillus sphaericus*", *World Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26 (2001) 387-393.

Sinha, N. and Satyanarayana, T., 1991, Alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis*, *Indian Journal of Microbiology*, 31, 425-430.

- Southan C., (2001), “A genomic perspective on human proteases as drug targets”, *Drug Discovery Today*, 6, 681-688.
- Stainer, R. Y., Palleroni, N. J., & Duodoroff, M. (1966) The aerobic pseudomonads a taxonomic study. *J Appl Microbiol* 43: 159–271.
- Steele D.B., Fiske M.J., Steele B.P., Kelley V.C., (1992), “Production of a low molecular weight, alkaline active, thermostable protease by a novel spiral-shaped bacterium, *Kurthia spiroforme* sp.”, *Enzyme Microbial Technology*, 14, 358–360.
- Sumantha, A., Larroche, C. and Pandey A., 2006, Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective, *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2), 211–220.
- Takami H., Akiba T., Horikoshi K, (1989), “Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30, 120-124.
- Tanksale, M.A. 2001. Molecular aspects of a fungal alkaline protease, Ph. D. Thesis, University of Pune, India, P:1-209.
- Tekin, N., 2008. Türkiye Kaynaklı *Bacillus* spp.’lerin Alkalen Proteaz Üretim Kapasiteleri ve Enzimlerin Kısmen Karakterizasyonu (Yüksek Lisans Tezi), Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Telefoncu A., Pazarlıoğlu N., 2010. *Biyoteknoloji Temel Prensipler ve Uygulamalar*, 385-392, İzmir.
- Temiz, A., 1994. Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri. Ankara. S: 26-120.

- Temizkan, G. ve Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler Nobel Tıp Kitabevi, İst.345
- Thangam, E.B. and Rajkumar, G.S. 2002. Purification and characterization of an alkaline protease from *Alcaligenes faecalis*. Biotechnol Appl Biochem 35:149-154
- Tortora, J.G., Case, C.L. and Funke, B.R., 2009, Microbiology, Pearson Education, 812p.
- Tsai Y.C., Juang R.Y, Lin S.F., Chen S.W., Yamasaki M., Tamura G., (1988), “Production and characterization of an alkaline elastase produced by alkalophilic *Bacillus* strain Ya-B”, Applied Environmental Microbiology, 54, 3156-3161.
- Tsujibo, H., Sakamoto, T., Nishino, N., Hasegawa, T. & Inamori, Y. 1990 Purification and properties of three types of xylanases produced by an alkalophilic actinomycete. Journal of Applied Bacteriology 69, 398–405.
- Uhlig, H., 1998. Industrial enzymes and their applications. New York: John Wiley and Sons. 37-202.
- Uludağ, Y.B., 2000. Immobilize Glukomilaz ile Maltodekstrinden Glukoz Uretimi, Yuksek Lisans Tezi, Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Muhendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli. P: 25-39.
- Vidyasagar, M., Prakash, S., Mahajan, V., Yogesh, S., 2009. Purification and characterization of an extreme Halothermophilic protease from a halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp. TVSP101. Brazilian Journal of Microbiology 40:12-19.

- Vijayanand, S., Hemapriya, J., Selvin, J. and Kiran, S., 2010, Production and optimization of haloalkaliphilic protease by an extremophile *Halobacterium* sp. JS1, isolated from Thalassohaline environment, *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 5 (1), 44-49.
- Voget, S., Steele, H.L. and Streit, W.R., 2006. Characterization of metagenome-derived halotolerant cellulase. *J Biotechnol* 126: 26-36.
- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S. and Higton, G., 2001, *Industrial microbiology: an introduction*, Blackwell Science Ltd., London, 288 p.
- Walsh, G., "Proteins Biochemistry and Biotechnology" *John Wiley and Sons, Ltd.*, 420-422, (2002).
- Wang Q., Hou Y., Xu Z., Miao J., Li G., (2008), "Optimization of cold-active protease production by the psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NF341 with response surface methodology", *Biosource Technology*, 99, 1926-1931.
- Ward, O.P, 1985, Proteolytic enzymes: in comprehensive biotechnology, Pergamon Press, Great Britain, 789-818.
- Wiseman, A., 1987. *Handbook of Enzymes Biotechnology* Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry. 274-373.
- York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Indole test. *In: Garcia LS (editor in chief). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.17.23.1 - 3.17.23.3*
- York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. MR-VP (Methyl Red–Voges-Proskauer) Tests. *In: Garcia LS (editor in chief). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.17.33.1 - 3.17.33.4*

York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Citrate Utilization Test (Simmons). *In*: Garcia LS (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.17.12.1 - 3.17.12.2

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

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

Zare, H., Moosavi-Movahedi, A. A., Salami, M., Mirzaei, M., Saboury, A. A., 2013. Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica* cv. Sabz) latex. *Phytochemistry*. 87 (2013) 16-22.

Zhao, G., Zhou, M., Zhao H., Chen, C., Xie, B., Zhang, X., He, H., Zhou, B., Zhang, Y., 2012. Tenderization Effect of Cold-adapted Collagenolytic Protease MCP-01 on Beef Meat at Low Temperature and Its Mechanism. *Food Chemistry*. 134 (2012) 1738-1744.