

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Bacillus cereus* KG5' İN PROTEAZ ENZİMİ ÜZERİNE
ÇALIŞMALAR**

Nazenin AHMETOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DIYARBAKIR

Haziran 2011

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Nazenin AHMETOĞLU tarafından yapılan “ *Bacillus cereus* KG5’ in Proteaz Enzimi Üzerine Çalışmalar ” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Kemal GÜVEN

Üye :Doç. Dr. Sait ERDOĞAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Sema AGÜLOĞLU FİNCAN

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 28/06/2011

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

28/06/2011

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması ve gerçekleştirilmesi sırasında öneri ve yardımlarını, çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Kemal GÜVEN**' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mikroorganizmanın teminindeki yardım ve ilgileri için Sayın **Yrd. Doç. Dr. Reyhan GÜL GÜVEN**' e teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel aşamada ve tez yazım aşamasında bilgisini ve yardımını esirgemeyen sayın hocam **Arş. Gör. Fatma MATPAN BEKLER**' e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında manevi desteğini gördüğüm sayın hocam **Arş. Gör. Özlem DEMİRCİ**' ye teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında beni her konuda destekleyip, yardımlarını esirgemeyen ve benim için her türlü fedakârlığı yapan değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel aşamada, ihtiyaç duyduğum her zaman yardımını ve manevi desteğini gördüğüm değerli doktora arkadaşım **Ömer ACER**' e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında yardımını ve manevi desteğini gördüğüm değerli doktora arkadaşım **Alevcan KAPLAN**' a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında manevi desteklerini gördüğüm ve aynı laboratuvarı paylaştığım bütün yüksek lisans ve doktora arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonunun projemize vermiş olduğu destekten dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	VII
ABSTRACT	VIII
ÇİZELGE LİSTESİ	IX
ŞEKİL LİSTESİ	X
KISALTMA VE SİMGELER	XI
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyoteknoloji.....	3
1.2. Enzimler.....	6
1.3. Proteazlar.....	9
1.4. Proteazların Sınıflandırılması.....	10
1.4.1. Ekzopeptidazlar.....	10
1.4.1.1. Aminopeptidazlar.....	11
1.4.1.2. Karboksipeptidazlar.....	11
1.4.2. Endopeptidazlar.....	12
1.4.2.1. Serin Proteazlar.....	13
1.4.2.2. Aspartik Asit Proteazlar.....	14
1.4.2.3. Sistein / Tiyoil Proteazlar.....	14
1.4.2.4. Metaloproteazlar.....	14

1.5.	Mikrobiyal Proteazlar.....	15
1.6.	<i>Bacillus</i> Cinsi.....	16
1.6.1.	<i>Bacillus cereus</i>	18
1.7.	Proteazların Endüstrideki Kullanım Alanları.....	19
1.7.1.	Deterjan Endüstrisinde Proteazlar.....	20
1.7.2.	Deri Endüstrisinde Proteazlar.....	21
1.7.3.	Gıda Endüstrisinde Proteazlar.....	22
1.7.4.	Tekstil Endüstrisinde Proteazlar.....	23
1.7.5.	Atık Arıtımı ve Dönüşümü Endüstrisinde Proteazlar.....	24
2.	KAYNAK ÖZETLERİ.....	25
3.	MATERYAL VE METOT.....	37
3.1.	Materyal.....	37
3.1.1.	Kimyasal Maddeler.....	37
3.1.1.1.	Besi Yeri Maddeleri.....	37
3.1.1.2.	Azot Kaynakları.....	37
3.1.1.2.	Karbon Kaynakları.....	37
3.1.1.3.	Kimyasal Maddeler, Deterjanlar ve Metaller.....	37
3.1.1.4.	Elektroforetik Maddeler.....	37
3.1.2.	Besi Yerleri.....	38
	-Katı Besi Yerleri.....	38
	- Sıvı Besi Yerleri.....	38
3.1.3.	Tamponlar.....	38
3.1.4.	Kullanılan Aletler.....	38
3.2.	Metot.....	39
3.2.1.	Bakterilerin Kültüre Alınması.....	39
3.2.2.	Proteaz Aktivite Tayini.....	39

3.2.2.	Protein Miktar Tayini.....	40
3.2.4.	Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	40
3.2.5.	pH 'ın Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	41
3.2.6.	Farklı Besiyerlerinin Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	41
3.2.7.	Değişik İnkübasyon Sürelerinin Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması..	41
3.2.8.	Farklı Azot Kaynaklarının Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	41
3.2.9.	Farklı Yeast Ekstrakt Konsantrasyonlarının Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	42
3.2.10.	Farklı Karbon Kaynaklarının Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	42
3.2.11.	Farklı Metal İyonlarının Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	42
3.2.12.	CaCl ₂ ' nin Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	42
3.2.13.	Enzimin Saflaştırılması.....	43
3.2.13.1.	Çöktürme ve Diyaliz.....	43
3.2.13.2.	Sefadex G-75 Jel Geçirgenlik Kolon Kromatografisi.....	43
3.2.14.	Bazı Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	44
3.2.15.	Bazı Metal Şelatör ve Kimyasal Maddelerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması.....	44
3.2.16.	Bazı Deterjanların Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	45
3.2.17.	Enzimin Termal Stabilitesinin Belirlenmesi ve CaCl ₂ ' nin Termostabiliteye Etkisinin Araştırılması.....	45
3.2.18.	Proteaz Enziminin Elektroforetik Analizi.....	45
3.2.18.1.	% 0.1 Jelatin İçeren Non -Denatüre Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi İle Zimogram Analizi ve SDS-PAGE İle Enzimin Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi.....	46

-Jellerin Hazırlanması.....	46
-Elektroforez İşlemi.....	46
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	49
4.1. BULGULAR.....	49
4.1.1. Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	49
4.1.2. pH' ın Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	49
4.1.3. Farklı Besi Yerlerinin Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisi.....	50
4.1.4. BM Besi Yerinde Değişik İnkübasyon Sürelerinin Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisi.	51
4.1.5. Farklı Azot Kaynaklarının Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisi.....	51
4.1.6. Farklı Yeast Ekstrakt Konsantrasyonlarının Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisi.....	52
4.1.7. Farklı Karbon Kaynaklarının Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisi.....	53
4.1.8. Farklı Metal İyonlarının Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisi.....	54
4.1.9. CaCl ₂ ' nin Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisi.....	55
4.1.10. Proteaz Enziminin Saflaştırılması.....	56
4.1.11. Bazı Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	57
4.1.12. Bazı Metal Şelatör ve Kimyasal Maddelerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	57
4.1.13. Bazı Deterjanların Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	58
4.1.14. Enzimin Termal Stabilitesinin Belirlenmesi.....	59
4.1.15. CaCl ₂ ' nin Termostabiliteye Etkisinin Araştırılması.....	60
4.1.16. Proteaz Enziminin Elektroforetik Analizi.....	61
4.1.16.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzimin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi.....	61
4.1.16.2. %0.1 Jelatin İçeren Non -denatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Zimogram Analizi.....	62

4.2.	TARTIŞMA	64
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	75
6.	KAYNAKLAR	79
	ÖZGEÇMİŞ	87

ÖZET

Bacillus cereus KG5' İN PROTEAZ ENZİMİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nazenin AHMETOĞLU

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2011

Bu çalışmada, Kös (Bingöl) kaplıcasından izole edilen *Bacillus cereus* KG5' in endüstride geniş uygulama alanına sahip olan ekstraselüler proteaz enzimi üzerine çalışmalar yapılması amaçlanmıştır.

B.cereus KG5 BM besiyerinde kültüre alındı ve değişik inkübasyon sürelerinde proteaz aktivite tayini yapılarak maksimum enzim üretimi 24. saatte tespit edildi. pH ve sıcaklığın proteaz enzimi üzerindeki etkisi pH 6-11 ve sıcaklık 20°C ile 70°C aralığında araştırıldı. Enzimin optimum pH ve sıcaklık değerinin sırasıyla 7.0 ve 40-45°C arası olduğu tespit edildi. Farklı besiyerlerinin, %1.2 oranında farklı azot ve %2 oranında karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerindeki etkisi incelendi. Maksimum enzim üretimi BM besiyerinde elde edildi. En iyi azot kaynağı yeast ekstraktı ve en iyi karbon kaynağı ise laktoz ve galaktoz olarak belirlenirken karbon kaynaklarından glukozun enzim üretimini repress ettiği tespit edildi. Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarının enzim üretimi üzerindeki etkisi araştırıldı. %0.5 yeast ekstraktta maksimum enzim üretimi elde edildi. Artan yeast ekstrakt konsantrasyonlarında enzim üretiminde azalma gözlemlendi. %0.5 oranında farklı metal iyonlarının enzim üretimi üzerindeki etkisi araştırıldı. CaCl₂' nin enzim üretimini yaklaşık 2 kat artırırken, NaCl ve MgCl₂' nin üretimi önemli ölçüde azalttığı tespit edildi. CaCl₂' nin enzim üretimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Maksimum enzim üretimi %0.5, en düşük üretimin ise %0 CaCl₂ konsantrasyonlarında elde edildi.

B.cereus KG5' e ait kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzim aktivitesi üzerine bazı metallerin, kimyasalların, metal şelatörlerin ve deterjanların etkisi araştırıldı. CaCl₂ (2 mM' da %142), MgCl₂ (5 mM ve 10 mM' da %89) ve MnCl₂' nin (2 mM' da %29) proteaz aktivitesini belirli oranlarda artırdığı, CuCl₂, HgCl₂ ve ZnCl₂ (10 mM' da) ise enzim aktivitesini sırasıyla %100, %100' den fazla ve %96 oranında inhibe ettiği ve metal şelatörleri olan EDTA ve 1-10 phenantroline'nin (10 mM' da sırasıyla %96 ve %95) proteaz enzimini güçlü bir şekilde inhibe ettiği tespit edildi. PMSF'nin etkisinde ise etanole bağlı bir inhibisyonun olduğu belirlendi. %1 SDS' nin tamamen, %1 A10' nun %84 oranında, %0.5 Triton X-100' ün %5 oranında ve %0.1 Tween-80' in %2 oranında enzim aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Enzimin termal stabilitesinin araştırılması sonucunda 40°C' de 120 dakika sonunda enzimin oldukça stabil olduğu tespit edilmiştir. Enzimin termal stabilitesinin CaCl₂ tarafından artırıldığı belirlendi. 2 mM CaCl₂' nin enzimin 50°C' de 120 dakika sonunda orijinal aktivitesini %102 oranında koruduğu tespit edildi.

Bu çalışmada *B.cereus* KG5' e ait proteaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ve Sefadeks G-75 jel geçirgenlik kromatografisi ile %23 verimle 13 kat saflaştırıldı. Sefadeks G-75 jel geçirgenlik kromatografisi ile saflaştırılan enzimin nondenatüre poliakrilamid jel elektroforezi ile varlığı tespit edilirken, SDS-PAGE ile de molekül ağırlığı yaklaşık 48 kDa civarında olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus cereus* KG5, Biyoteknoloji, proteaz enzim üretimi ve karakterizasyonu

ABSTRACT

STUDIES ON THE PROTEASE ENZYME IN *Bacillus cereus* KG5

MASTER THESIS

Nazenin AHMETOĞLU

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2011

In this survey it is aimed to study the extracellular protease enzyme which has a wide application in the industry of *Bacillus cereus* KG5 which has been isolated in Kös (Bingöl) hot spring.

B.cereus KG5 BM has taken under culturization at the feed-lot and protease activity is determined at various incubation times and the maximum enzyme production is determined at the 24th hour. The effect of pH and temperature over the protease enzyme is studied under pH 6-11 and between 20°C and 70°C temperatures. It was determined that the optimum value of pH and temperature for the enzyme is respectively 7.0 and 40-45°C. The effects of different feed-lots and %1.2 percent different nitrogen and %2 percent carbon sources has been studied. The maximum enzyme production is acquired at BM feed-lot. It is determined that the best nitrogen source is yeast extract and urea, the best carbon source is lactose and galactose meanwhile glukoz as a source of carbon inhibited the production of the enzyme. Different concentrations of yeast extract effect over enzyme production is studied. The maximum enzyme production is acquired at %0.5 yeast extract. It is observed that the enzyme production is degraded by yeast extract increase. Different metal ions effect at the ratio of %0.5 percent over enzyme production is studied. The CaCl₂ approximately doubled the enzyme production, NaCl ve MgCl₂ dramatically reduced the enzyme production. CaCl₂'s effect over enzyme production is studied. The maximum enzyme production is acquired at %0.5, and the lowest enzyme production is acquired at %0 CaCl₂ concentrations.

Some metals, chemicals, metal chelat agents and detergents effects over protease enzyme activity that is belonging to partially purified *B.cereus* KG5 is studied. CaCl₂ (%142 at 2 mM) , MgCl₂ (%89 at 5 mM and 10 mM) and MnCl₂ (%29 at 2 mM) increased the protease activity at a certain extent, CuCl₂, HgCl₂ and ZnCl₂ (at 10 mM) inhibited the enzyme activity respectively at %100, over %100 and %96, EDTA and 1-10 phenantroline which are metal chelat agents (respectively %96 and %95 at 10 mM) heavily inhibited the protease enzyme. At the effect of PMSF, an inhibition due to etanol has been determined. It is determined that the enzyme activity is inhibited at %1 SDS fully, %1 Alo at %84 percent, %0.5 Triton X-100 at %5 percent and 0.1 Tween-80 at %2 percent. As a result of studying the thermal stability of the enzyme, it is determined that it is still stable at 40°C temperature at the end of 120 minutes. It is determined that the thermal stability of the enzyme is increased by CaCl₂. It is determined that 2 mM CaCl₂ enzyme at 50°C temperature at the end of the 120 minutes still preserved the original stability at %102 percent.

In this study, the protease of *B.cereus* KG5 was purified by ammonium sulfate precipitation & dialysis and Sephadex G-75 gel permeability chromatography with 13 fold and %23 recovery. The enzyme purified by the Sephadex G-75 gel permeability chromatography existence is determined by non-denaturing polyacrilamide gel electrophoresis meanwhile the molecule weight is determined approximately 48 kDa by SDS-PAGE.

Key words: *Bacillus cereus* KG5, Biotechnology, protease enzyme production and characterization.

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1.	Değişik endüstriyel alanlarda kullanılan enzimler ve uygulamaları	6
Çizelge 1.2.	<i>Bacillus cereus</i> ' un taksonomik yeri	19
Çizelge 4.1.	Proteaz enziminin saflaştırma tablosu	56
Çizelge 4.2.	Bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkisi	57
Çizelge 4.3.	Bazı metal şelatör ve kimyasal maddelerin enzim aktivitesi üzerindeki etkisi	58

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	Peptid bağlarının proteazlar tarafından katalizi (proteoliz)	10
Şekil 1.2.	Ekzopeptidazların etki mekanizmaları	11
Şekil 1.3.	Amino peptidazların alt grupları ve etki mekanizmaları	11
Şekil 1.4.	Karboksipeptidazların alt grupları ve etki mekanizmaları	12
Şekil 1.5.	Omega peptidazların etki mekanizması	12
Şekil 1.6.	Endopeptidazların etki mekanizması	13
Şekil 1.7.	Proteazların endüstride kullanım yüzdeleri	20
Şekil 4.1.	Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi	49
Şekil 4.2.	pH'ın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi	50
Şekil 4.3.	Besi yerlerinin enzim üretimi üzerindeki etkisi	50
Şekil 4.4.	BM besiyerinde değişik inkübasyon sürelerinin enzim üretimi üzerindeki etkisi	51
Şekil 4.5.	Farklı azot kaynaklarının enzim üretimi üzerindeki etkisi	52
Şekil 4.6.	Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarının enzim üretimi üzerindeki etkisi	53
Şekil 4.7.	Farklı karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerindeki etkisi	54
Şekil 4.8.	Farklı metal iyonlarının enzim üretimi üzerindeki etkisi	55
Şekil 4.9.	CaCl ₂ 'nin enzim üretimi üzerindeki etkisi	56
Şekil 4.10.	Bazı deterjanların enzim aktivitesi üzerindeki etkisi	59
Şekil 4.11.	Enzimin termal stabilitesinin belirlenmesi	60
Şekil 4.12.	CaCl ₂ 'nin termostabiliteye etkisi	60
Şekil 4.13.	Standart proteinlerin R _f değerleri yardımıyla proteaz enziminin molekül ağırlığının belirlenmesi	61
Şekil 4.14.	SDS-PAGE	62
Şekil 4.15.	%0.1 jelatin içeren non-denatüre jel elektroforezi	63

KISALTMA VE SİMGELER

NB	:Nutrient broth
BM	:Bazal medium
GPM	:Glukoz pepton medium
FCR	: Folin-Ciocalteu reaktifi
PMSF	: Phenylmethylsulfonyl fluoride
EDTA	: Ethylenediamintetra acetic acide
DFP	:Diizopropil floro fosfat
APS	:Amonyum per sülfat
TEMED	:Tetrametil etilen diamin
BFB	: Brom Fenol Blue
rpm	:Devir/dakika
BSA	: Bovine serum albumin
TCA	: Trichloro acetic acid
NaOH	:Sodyum hidroksit
U/mg	:Ünite/miligram
OD	:Optik density
mM	:Milimolar
pI	:İzoelektrik nokta

1.GİRİŞ

Biyoteknoloji; canlı organizmaların veya canlılığın moleküler temellerini oluşturan kavram ve işleyiş kurallarının kullanımı ile geliştirilen teknolojileri ve teknolojik ürünleri kapsayan bir teknoloji alanıdır. İnsanlık tarihiyle eşdeğer bir geçmişe sahip olan geleneksel biyoteknoloji, son elli yılda moleküler biyoloji ve genetik alanlarında gerçekleşen bilimsel ilerlemeler sayesinde, yepyeni bir anlam ve önem kazanmıştır. Bu nedenle biyoteknoloji, ya da modern biyoteknoloji, bilişim teknolojisi ile birlikte, 21. yüzyılda insanlığın refahında en önemli katkıyı sağlaması beklenen teknolojilerin başında gelmektedir (Şahin 2003). Modern biyoteknolojinin çıkışı, 1953 yılında çift sarmallı DNA yapısının keşfi ile, genler, proteinler ve hücrel faaliyetlerin kimyasal temelini belirlenmesi veya bir başka deyişle hayatın kimyasının anlaşılmasına dayanmaktadır. Modern biyoteknoloji, genombilim, kimya, biyoloji gibi alanların birleşiminden oluşmuş ve başta farmakoloji olmak üzere birçok geleneksel yaşambilim alanının son yıllarda yaşadığı hızlı gelişimde önemli rol oynamıştır (Ölmez ve Özdemir 2006).

Biyoteknoloji, potansiyel endüstriyel uygulamaları geniş ölçüde olanaklı kılabilen bir dizi teknikten oluşmaktadır. Endüstriyel üretim süreçlerinde, kimyasal yöntemler yerine çevre dostu biyolojik yöntemlerin kullanılması mümkündür. Enzimler kullanılarak pek çok endüstriyel sürecin çevre dostu olma özelliği arttırılmaktadır. Enzimlerin kullanıldığı süreçler daha temiz, daha güvenli ve çoğunlukla da daha ekonomiktir. Biyoteknolojik yöntemler ile geliştirilen yeni ürünlerin çevre üzerindeki olumsuz etkileri daha azdır (Özgen ve ark. 2007). Tüm dünyada enzimler fiziksel, analitik ve endüstriyel uygulamaların çoğunda kullanıldıklarından dolayı araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Geniş biyokimyasal çeşitliliğinden, kütle kültürünün olabirliğinden ve genetik manipulasyonunun kolaylığından dolayı özellikle mikrobiyal enzimler araştırmacıların dikkatini çekmektedir (Patel ve ark. 2005). Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin kullanımında, mikroorganizma kullanımı artmıştır (Kıran ve ark. 2006). Kullanım açısından ekstrem şartlarda yaşamaya adapte olan mikroorganizmalar öncelikli olarak tercih edilmektedir.

1. GİRİŞ

Ekstremofilik mikroorganizmalar; volkanların yüksek sıcaklıklarında, kutupların düşük sıcaklıklarında, çok düşük ve çok yüksek pH değerlerinde (pH 0-3 veya pH 10-12) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5-30) yaşamak için adapte olmuşlardır (Niehaus ve ark. 1999). Buralarda yaşayan termoasidofilik ve alkalifilik bakterilerden elde edilen enzimler ekstrem pH ve sıcaklık koşullarına dayanıklı olduğu için endüstriyel alanda yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır (Kıran ve ark. 2006).

Bakterilerden elde edilen ekstrasellüler enzimler endüstride birçok amaç için kullanılmaktadır (Appak 2006). Ekstrasellüler enzimler (ekzoenzimler) hücre içinde sentezlendikten sonra dışarı salınarak buradaki gıda moleküllerinin ayrışmalarını ve hücre duvarından geçebilecek düzeye inmelerini katalize ederler. Bu tarz aktivite gösteren enzimler (hidrolitik enzimler) arasında, başlıca, proteinaz' lar (peptidaz, jelatinaz, kollajenaz, kazeinaz, fibrinolizin, vs), karbohidraz' lar (sellülaz, amilaz, maltaz, laktaz (β -galaktozidaz), sukraz, hyaluridaz, vs) ve lipaz' lar, nukleaz ve diğerleri bulunmaktadır.

Proteazlar; proteinlerdeki peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerin bir grubudur. Proteazlar, büyük polipeptidleri ve proteinleri hücreler tarafından absorblanabilen daha küçük moleküllere hidroliz eder (Salleh ve ark. 2006). Proteazlar; prokaryot, mantar, bitki ve hayvanları içeren dünyadaki tüm yaşam formlarının gerekli bileşiklerdir. Yaşayan tüm organizmalarda bulunan proteolitik enzimler, hücre gelişimi ve farklılaşması için gereklidir (Gupta ve ark. 2002). Mikrobiyal proteazlar genelde ekstrasellülerdir ve üretici tarafından direk olarak fermentasyon ortamına salgılanırlar böylece enzimin sonraki işlemi hayvansal ve bitkisel kaynaklı proteazlara göre kolaylaşır (Rao ve ark. 1998).

Dünya genelinde endüstriyel enzim pazarı 1.4 milyar USD dolayında olup, yılda %10'un üzerinde pazar ağı artışı ve %4-5 oranında satış artışı ile en yaygın tüketim alanlarından. Endüstriyel enzim üretiminin %75' i gıda, deterjan ve nişasta endüstrileri içinde yer almaktadır (Balkan 2008). Proteazlar, toplam endüstriyel enzim ticaretinin yaklaşık %60'mı oluşturmaktadır (Kıran ve ark. 2006). Bununla birlikte mikrobiyal çeşitliliği derinlemesine inceleyerek ticari olarak daha kullanışlı enzimler üretebilen mikroorganizmaların bulunma şansı da daima vardır (Oberoi ve ark. 2001).

1.1. Biyoteknoloji

Biyoteknolojinin en özgün tanımı, biyolojik organizmaların ve sistemlerin veya proseslerin üretim ve hizmet endüstrilerine uygulanmasıdır (Çırakoğlu 1990).

Biyoteknoloji'nin tarihi ekmek, yoğurt, peynir gibi ürünler ve alkollü içkilerin üretimi ile başlar. Ancak 19. yüzyılın ortalarında insanlar Louis Pasteur'un çalışmalarından mikroorganizmaların fermantasyon olayının nedeni olduğunu öğrenmeleriyle biyoteknolojinin bilincine varmışlardır. Yüzyılımızın ilk yarısında bilim adamlarının mikroorganizmaların kimyasal değişikliklere katalizörlük yapma özelliklerini (mayanın glukozu etanole dönüştürmesi gibi) yeni ve yararlı proseslere dönüştürme çabaları bir çok maddenin daha düşük enerji harcamalarıyla eldesini sağlamıştır (Çırakoğlu 1990).

Günümüzde enerjiden tarıma, sağlıktan çevre kirlenmesiyle mücadeleye, kozmetik sanayiden madencilığe kadar bir çok alanda biyoteknoloji yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Çırakoğlu 1990). Gelişmiş ülkelerin üretiminin %40'ını biyolojik ve biyoteknolojik kaynaklı maddeler oluşturmaktadır ve gelecek yüzyılın başında biyoteknolojiye dayalı üretimin yılda 40 milyar dolara ulaşması beklenmektedir (Başaga ve Çetindamar 2000).

Biyoteknolojinin klasik tanımı kısaca "**Biyokatalizatörlerin teknik boyutta kullanımı**" şeklinde özetlenebilir. Konuya bu boyutta yaklaşıldığında bir yandan olağanüstü bir seçicilikte etki gösteren biyokatalizatörlerin (enzimler ve hücreler) endüstriyel uygulamalara elverişli immobilize formlarının geliştirilmesi, diğer taraftan enstrümantasyon alanındaki teknolojik gelişmeler bugüne kadar kimyanın etkinlik alanına giren birçok prosesin yerini daha ekonomik olan biyoproseslere bırakması sonucunu doğurmuştur (Telefoncu ve Pazarlıoğlu 1995).

Endüstriyel Biyoteknoloji, biyoteknolojinin endüstriyel proses ve üretimlerdeki uygulamalarından geri dönüşümlü ürün eldesi için biyokütlenin kullanımına kadar oldukça geniş bir alandaki uygulamalarını içerir (Yücel 2010).

Endüstriyel biyoteknoloji şirketleri, kimyasal üretimlerde kullanma amacıyla biyolojik sistemlerden yararlanarak enzim gibi biyokatalizörleri ya da kimyasal maddeleri üretirler. Günümüz üretim süreçlerini kolaylaştıracak ve iyileştirecek daha

etkin, daha dayanıklı enzimleri ve biyoaktif bileşikleri doğada bulunan zengin kaynaklardan sağlama arayışı sürmektedir. Kağıt üretimi, tekstil işlemleri, kimyasal sentez tepkimeleri gibi birçok kimyasal işlem, bazen çok yüksek ya da çok düşük sıcaklıklara bazen de çok yüksek ya da düşük pH derecelerine gereksinim duyar. Endüstriyel biyoteknolojinin amacı, bu zor şartlarda yaşayabilecek mikroorganizmalar ve işlerliğini kaybetmeyen biyomoleküller bulabilmektir. Kullanım alanı en yaygın olan ve biyoteknoloji yöntemleriyle enzimlerden bazıları proteinleri parçalayan proteaz, selülozu parçalayan selulaz, yağarla etkileyen lipaz ve nişastayı basit şekerlere dönüştüren amilazlardır (Çırakoğlu 1990).

Endüstriyel biyoteknolojinin gıda endüstrisinde çok geniş uygulama alanı vardır. Alkollü içecekler, mayalanmış ürünler, fermente edilmiş ürünler, meyve suları, gıda koruyucu ve lezzet arttırıcı maddeler, süt ve süt ürünleri, sirke gibi gıda maddelerinin üretimi için yüksek performans gösteren maya ve bakterilerin ve gıda üretim süreçlerinin belirli aşamalarında gerekli enzimlerin geliştirilmesi ve kullanımı örnek verilebilir. Tekstil dünyasında da biyoteknoloji, iplik ve kumaşlarla ilgili bir çok işlemde kullanılır. Örneğin, dokuma sırasında kumaşın zarar görmesini engellemek için kaplama yapıştırıcı olarak kullanılan nişastayı zamanı geldiğinde sökmek için amilaz enzimi kullanılmaktadır. Mikroorganizmalardan elde edilen tripsin enzimi derinin tüylerden temizlenmesini sağlamaktadır (Çırakoğlu 1990).

Enzimlerin bu şekilde endüstriyel süreçlerde kullanılmaları işlemlerine “**enzim teknolojisi**” denir. En geniş tanımı ile enzim teknolojisi; serbest enzim ve tüm hücre biyokatalizörlerinin hizmet ve mal üretiminde kullanılması olarak görülebilir. Enzim teknolojisinin daha dar bir tanımı ise büyük ölçekli biyoproses rekabetinde enzimlerin kullanımına izin veren teknolojik bir kavram olarak görülebilir (Beilen ve Li 2002).

Enzim teknolojisi;

- **mikrobiyal işlemler** (üretici suşların seçimi, geliştirilmesi vb.),
- **enzimlerin fermentasyon yoluyla üretimleri** (büyük ölçekte üretimi için yapılan besiyeri, ortam koşulları vb. düzeylerdeki optimizasyonlar),
- **katalitik etkinliğin arttırılması** için enzimlerin üç boyutlu yapılarının değiştirilmesi (protein mühendisliği),

- **izolasyonları ve immobilizasyonları** (enzimlerin çözünmeyen destek materyaller yardımıyla suda çözünmeyen hale getirilmesi) çalışmalarını kapsar.

Enzim teknolojisi, ekonomik, etkili ve ekolojik tekniklere olan büyük ihtiyaç nedeniyle ilerleme kaydetmiştir. Biyoteknoloji sayesinde, yeni tür enzimlerin büyük ölçeklerde ve ekonomik olarak üretilmesi mümkün olmuştur. Üretimi, sabitlenmesi (non-reaktive), paketlenmesi ve belirli ölçeklerde dağıtımının yapılabilmesi sonucu, enzimler, raflarda duran ekzotik bir maddeden ziyade, büyük depolarda muhafaza edilebilen endüstriyel bir madde olmuştur (Karademir 2002).

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır (Kıran ve ark. 2006).

Enzimler, enzimatik süreçlerin çevre kirliliğine daha az yol açmaları, kimyasal süreçleri daha ılımlı koşullarda ve ekonomik olarak gerçekleştirebilmeleri sebebi ile günümüzde her geçen gün daha da artarak birçok endüstri alanında kimyasal süreçlerin yerini almaktadır (Öztürk 2007).

Dünya enzim endüstrisindeki kullanım alanının %29' unu gıda sektörü, %15' ini hayvan yemi sektörü ve %56' sını genel teknik alanları oluşturmaktadır (Schallmey 2004). Endüstriyel olarak üretilen enzimlerin yaklaşık %75' inin kullanıldığı temel endüstriler ; deterjan (%37), tekstil (%12), nişasta (%11), fırınlama (%8) ve hayansal gıda (%6) endüstrileridir (Shrinivas 2008).

Değişik endüstriyel alanlarda kullanılan enzimler ve uygulamaları Tablo 1.' de verilmiştir.

2007' de dünyada kullanılan enzimler üzerine yayınlanan bir çalışmada, dünya enzim marketinin her yıl %7.6 oranında arttığı ve 2011 yılında 6 milyon dolara ulaşmasının beklendiği belirtilmiştir (Shivanand ve ark. 2009, Sundararajan ve ark. 2011).

Tüm dünyada enzimler fiziksel, analitik ve endüstriyel uygulamaların çoğunda kullanıldıklarından dolayı araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Geniş biyokimyasal çeşitliliğinden, kütle kültürünün olabirliğinden ve genetik manipulasyona

1.GİRİŞ

uygunluğundan dolayı özellikle mikrobiyal enzimler araştırmacıların dikkatini çekmektedir (Patel 2005).

Mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin tüm dünya genelinde yıllık kullanım oranlarına bakıldığında %25 alkalın proteaz, %21 diğer proteazlar, %18 amilaz, %10 renin, %3 tripsin, %3 lipaz, %10 diğer karbonhidrat parçalayan enzimler (selülaz ve ksilanaz gibi), %10 kadar ise analitik ve farmasötik enzimlerin olduğu şekilde bir dağılım belirlenmiştir (Rao ve ark. 1998).

Çizelge 1.1. Değişik endüstriyel alanlarda kullanılan enzimler ve uygulamaları (Kirk ve ark. 2002)

Endüstri	Enzim sınıfı	Uygulama
Deterjan (çamaşır ve bulaşık)	Proteaz	Protein lekelerinin giderilmesi
	Amilaz	Nişasta lekelerinin giderilmesi
	Lipaz	Yağ lekelerinin giderilmesi
	Selülaz	Temizleme, renk aydınlatılması, anti-redeposition (pamuk)
	Mannanaz	Mannan lekelerinin giderilmesi (görünmeyen lekeler)
Nişasta ve Yakıt	Amilaz	Niştastanın sıvılaştırılması ve şekerleştirilmesi
	Amiloghukozidaz	Şekerleştirme
	Pullulanaz	Şekerleştirme
	Glukoz izomeraz	Glukozun fruktoza dönüşümü
	Siklodekstrin-glikoziltransferaz	Siklodekstrin üretimi
	Ksilanaz	Viskozitenin düşürülmesi (yakıt ve nişasta)
	Proteaz	Proteaz
Gıda	Proteaz	Sütün çöktürülmesi, yenidoğan formülasyonları, aroma
	Lipaz	Peynir aroması
	Laktaz	Sütün laktozun giderilmesi
	Pektin metil esteraz	Meyve tabanlı ürünlerin jöleleştirilmesi
	Pektinaz	Meyve-tabanlı ürünler
	Transglutaminaz	Visko-elastik özelliklerin modifikasyonu
Fırıncılık	Amilaz	Ekmeğin yumuşatılması ve kabartılması, un ayarlanması
	Ksilanaz	Hamurun şartlandırılması
	Lipaz	Hamur kararlılığı ve şartlandırılması (in situ emulsifier)
	Fosfolipaz	Hamur kararlılığı ve şartlandırılması (in situ emulsifier)
	Glukoz oksidaz	Hamurun güçlendirilmesi
	Lipoksijenaz	Hamurun güçlendirilmesi, ekmeğin beyazlatılması
	Proteaz	Bisküvi ve kurabiye
	Transglutaminaz	Lamine edilmiş güçlendirilmiş hamur
Hayvan Yemi	Fitaz	Fitat sindirilebilirlik-fosfor ayrılması
	Ksilanaz	Sindirilebilirlik
	β -Glukanaz	Sindirilebilirlik
Meşrubat	Pektinaz	Pektin giderilmesi, lapalaştırma
	Amilaz	Meyve suyu muamelesi, düşük kalorili bira
	β -Glukanaz	Lapalaştırma
	Asetolaktat dekarboksilaz	Biranın olgunlaştırılması
	Lakkaz	Berraklaştırma (meyve suyu), aroma (bira)

1.2. Enzimler

Enzimler, canlı organizmada oluşan tüm tepkimelerin uygun koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bu tepkimeleri düzenleyen, katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu (ribozimler) hariç olmak üzere, genellikle protein yapısındaki özelleşmiş biyokatalizörlerdir. Enzimler de diğer katalizörler gibi reaksiyon hızını

arttırarak çalışırlar. Benzer koşullar altında, enzim varlığındaki tepkime oranı, katalizör yokluğundaki reaksiyon oranına göre bir veya birkaç milyon kat daha yüksek olabilmektedir.

Enzimler biyolojik katalizör olmaları nedeni ile dünyamızdaki canlıların yaşamını olası kılan etmenlerin başında gelir (Öztürk 2007). Enzimler yüksek katalitik aktivite göstermeleri, yüksek derecede substrat spesifitesine sahip olmaları, büyük miktarlarda üretilebilmeleri ve ekonomik değere sahip olmaları açısından geleneksel kimyasal katalizörlerden üstün avantajlara sahiptirler. Enzimlerin yapı ve fonksiyonlarını, kataliz mekanizmalarını ve enzimlerin katalizlediği her türlü metabolik ve biyokimyasal reaksiyonların neden ve nasıl gerçekleştiğini inceleyen enzimolojinin başlangıcı 19. yy' dan daha önceki tarihlere dayanmaktadır. Fakat bu alandaki önemli bilimsel gelişmeler son 40 yılda gerçekleşmiş pepsin, polifenol oksidaz, peroksidaz ve invertaz gibi enzimler 19. yy' ın ortalarında diğer enzimler ise 19. yy' ın sonlarına doğru saflaştırılmışlardır (Kazan 2008).

Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir (Kıran ve ark. 2006). Enzimler; ekmek, peynir, bebek gıdaları üretimi, alkollü içecekler, meyve suyu ve sut üretiminde, temizlik malzemelerinde ve tıpta teşhis ile tedavi sürecinde büyük miktarlarda kullanılmaktadırlar. Ayrıca kimya, kağıt, nişasta, biyoyakıt, kauçuk ve fotoğraf endüstrisinde, ziraatta, kontakt lens temizleyicilerinden, biyolojik savaşta kullanıma kadar çok geniş alanlarda da enzimler kullanılmaktadır. Enzimlerin bu kadar fazla alanda kullanılabilir olmasının sebepleri; maliyet bakımından ucuz olması, in-vitro şartlarda aktif olması, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olması ve en önemlisi de enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmamasıdır (Çelik 2006).

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir (Kıran ve ark. 2006).

Enzimlerin teknoloji ve sanayide kullanımı için saflaştırılması gerekmektedir. Bu süreçte de gerek kolay üreyebilmeleri gerekse ürettikleri enzimlerin diğer organizmalara oranla daha kolay saflaştırılmaları nedeni ile biyoteknolojik süreçlerde mikroorganizmalar temel enzim kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bugüne kadar tanımlanan enzimlerin büyük çoğunluğu düşük sıcaklıkta ve dar bir pH aralığında

çalışmaktadır ve bu nedenle endüstrinin tercih ettiği geniş pH aralığı ve yüksek sıcaklık koşullarında kullanılamamaktadır. Bu durum da endüstriyel talebi karşılayabilecek nitelikte yeni enzimlerin ve bu enzimleri üretebilecek mikroorganizmaların bulunmasını teşvik etmektedir. Ekstrem koşullardan izole edilen ekstremofil olarak adlandırılan mikroorganizmalar endüstrinin arzuladığı nitelikteki enzimlerin elde edilmesinde önemli bir kaynak olarak karşımıza çıkmaktadır (Anwar ve Saleemuddin 1998, Niehaus ve ark. 1999, Öztürk 2007).

Ekstremofilik mikroorganizmalar; volkanik kaynaklardaki yüksek sıcaklıklarda, soğuk kutup bölgelerindeki düşük sıcaklıklarda, derin denizlerdeki yüksek basınçta, çok düşük ve yüksek pH değerlerinde (pH 0-3 ya da 10-12) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (5-30) yaşamaya adapte olmuşlardır (Niehaus 1999). Sonuç olarak bu mikroorganizmalar mezofilik akranlarının hayatlarını sürdüremedikleri koşullar altında endüstriyel ek süreçlerin geliştirilmesine olanak sağlayan eşsiz biyokatalizörler üretirler (Demirjian 2001). Sıcak su kaplıcalarından izole edilen termofilik bakterilerin en önemli özelliği ekstrem şartlarda dayanıklı enzimlere sahip olmasıdır ve bu da onları biyoteknolojik açıdan önemli kılmaktadır (Gül Güven 2011). Ekstremofilik mikroorganizmaların metabolik ve biyolojik fonksiyonları ekstrem koşullar altında fonksiyon gösterebilen enzimler ve proteinler tarafından yerine getirilir. Son olarak eşsiz özellikler gösteren egzotik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler çoğunlukla termostabil ve genellikle deterjanlara, şaotropik ajanlara, organik çözücüler ve pH' ın düşük veya yüksek değerlerine karşı genellikle dirençlidirler (Niehaus 1999).

Enzim terminolojisi ve sınıflandırılması için 1961 yılında toplanan ilk Enzim Komisyonunun raporuna göre enzimler, katalizörlük yapılan tepkimenin tipine göre 6 ana sınıfa ayrılmıştır. Bu sınıflar;

Oksidoredüktazlar: Bu sınıf, redoks tepkimelerini katalizleyen tüm enzimleri içine alır, bir substrattan diğerine H, O₂, ve e⁻ transferini sağlarlar.

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

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

Liyazlar: Susuz ortamdaki grupların uzaklaştırılmasını katalizlerler.

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

Ligazlar: ATP veya diğer nükleosit trifosfat içindeki pirofosfatın hidrolizi ile eşleşmiş olan iki molekülün birleşmesini katalize ederler (Özçömlekçi 2006).

Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin %80'i polimerlerin doğal yapısını bozabilme yeteneğine sahip olan hidrolazlardır (Gözükara 1997). Endüstriyel açıdan çok önemli olan hidrolazların %60'ını ise proteazlar oluşturmaktadır (Özçömlekçi 2006).

1.3. Proteazlar

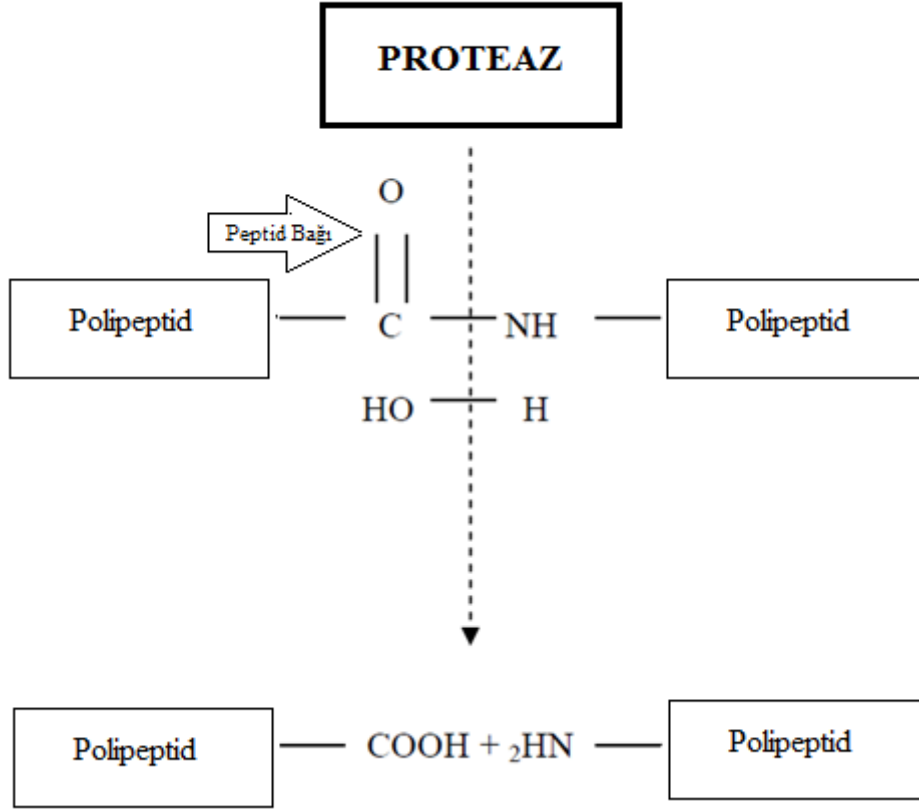
Proteazlar; proteinlerdeki peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerin bir grubudur. Proteazlar, büyük polipeptidleri ve proteinleri hücreler tarafından absorblanabilen daha küçük moleküllere hidroliz eder (Salleh ve ark. 2006).

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği tarafından geliştirilen ve enzimlerin adlandırılması için kullanılan EC numaralarına göre; Sınıf 3 (hidrolazlar) ve alt sınıf 3.4 (peptidazlar ya da peptid hidrolazlar) grubuna ait enzimlerdir ve EC 3.4. başlığıyla ifade edilirler.

Proteoliz olarak adlandırılan peptid bağlarının proteazlar tarafından hidrolizi Şekil 1.1.' de görüldüğü gibidir. Proteolizin ürünleri protein, peptid fragmentleri ve serbest aminoasitlerdir (Gençkal 2004).

Proteazlar; prokaryot, mantar, bitki ve hayvanları içeren dünyadaki tüm yaşam formlarının gerekli bileşiklerdir. Yaşayan tüm organizmalarda bulunan proteolitik enzimler, hücre gelişimi ve farklılaşması için gereklidir (Gupta ve ark. 2002).

Proteazlar endüstriyel enzimlerin üç büyük grubundan birini temsil eder ve dünya çapındaki toplam enzim satışının yaklaşık %60'ını oluşturarak endüstriyel enzim marketinde büyük bir hakimiyete sahiptirler (Rao ve ark. 1998). Endüstriyel marketteki proteazların bu hakimiyetinin 1998 yılında tahmin edilen değeri 1 milyon dolarken 2005 yılına kadar artarak devam etmiştir (Gupta ve ark. 2002).



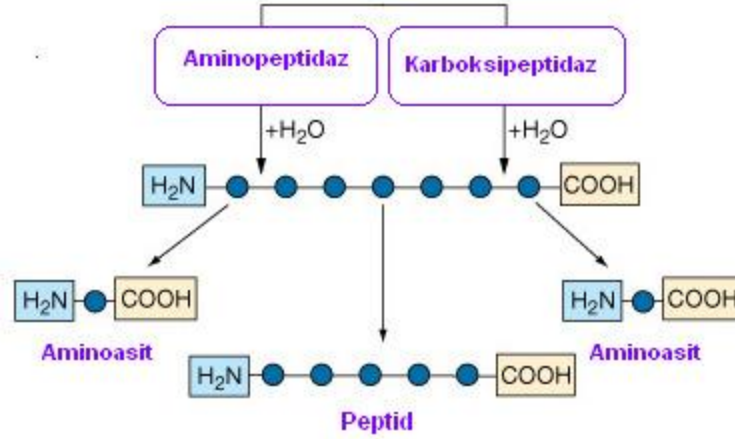
Şekil 1.1. Peptid bağlarının proteazlar tarafından katalizi (proteoliz)

1.4. Proteazların sınıflandırılması

Milletlerarası Biyokimya Birliği (International Union of Biochemistry) tarafından yapılan enzim sınıflandırılmasında tüm enzimler katalizledikleri reaksiyon tipine göre 6 sınıfa ayrılmışlar ve proteazlar 3. sırada yer alan hidrolazlar sınıfına dahil edilmişlerdir. Proteazların alt sınıfı peptid bağlarını parçalamadan dolayı 3.4 olarak belirlenmiştir. Büyük bir aileyi (E.C 3.4) oluşturan proteazlar, Avrupa Biyokimya Komitesi tarafından EC sisteminde, ekzopeptidazlar (E.C 3.4.21-99) ve endopeptidazlar (E.C 3.4.11-19) olmak üzere 2 gruba ayrılmışlardır (Sevinç 2010).

1.4.1. Ekzopeptidazlar

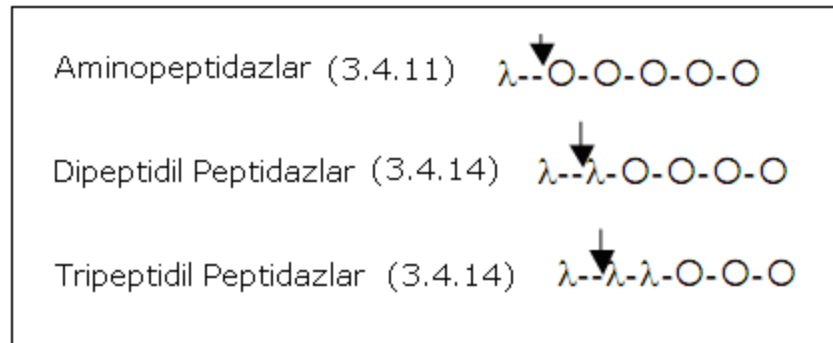
Ekzopeptidazlar, polipeptid zincirlerinin uçlarındaki serbest amino (N) ya da karboksil (C) gruplarına atak yapmaktadırlar. Ekzopeptidazlar etki ettikleri protein zincirinin sonundaki grup serbest amino grubu ise aminopeptidaz, serbest karboksil ise karboksipeptidaz, olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. Ekzopeptidazların etki mekanizmaları

1.4.1.1. Aminopeptidazlar

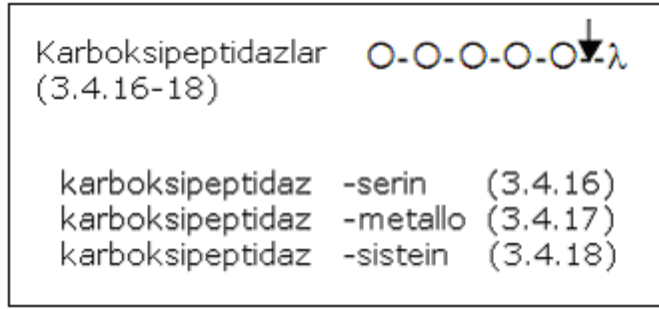
Aminopeptidazlar, polipeptid zincirinin ucundaki serbest N terminalinde işlevseldirler. Enzim, tek bir aminoasidi, bir dipeptidi ya da bir tripeptidi hidroliz etmesine göre isim almaktadır (Şekil 1.3.). Aminopeptidazların N-terminal metionini (Met) uzaklaştırdıkları bilinmektedir. Bakteri ve fungusları da içeren mikroorganizmaların çoğunda bulunmaktadır. Genellikle hücre içi enzimlerdir, fakat *A. oryzae* tarafından üretilen aminopeptidaz hücre dışı bir enzimdir (Rao ve ark. 1998).



Şekil 1.3. Aminopeptidazların alt grupları ve etki mekanizmaları

1.4.1.2. Karboksipeptidazlar

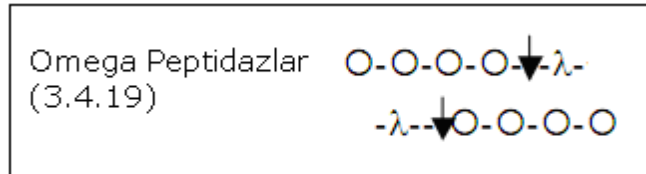
Karboksipeptidazlar, enzimlerin aktif bölgesindeki aminoasit çeşitlerinin yapısına göre üç ana gruba ayrılırlar (Şekil 1.4.). Bunlar; serin karboksipeptidazlar, metallo karboksipeptidazlar ve sistein karboksipeptidazlardır (Rao ve ark. 1998).



Şekil 1.4. Karboksipeptidazların alt grupları ve etki mekanizmaları

Amino peptidazlar ve karboksipeptidazların yanı sıra tanımlanmış iki ekzo peptidaz ailesi bulunmaktadır. Bunlar dipeptitleri hidroliz eden dipeptidazlar ve prostetik gruba bağlı aminoasitlerin karboksil veya amino uçlarındaki peptid bağlarının hidrolizini katalize eden omegapeptidazlardır (Alpan 2008).

Omegapeptidazlar, serbest bir N ya da C terminal ucuna ihtiyaç duymazlar. Endopeptidazlardan farklı olarak N ya da C terminal uçlara yakın bölgelerde hidroliz etme yeteneğine sahiptirler (Şekil 1.5.). Omegapeptidazlar, amino veya karboksipeptidazların direkt etkide bulunamadıkları polipeptid bölgelerini hidroliz ederler (Sevinç 2010).

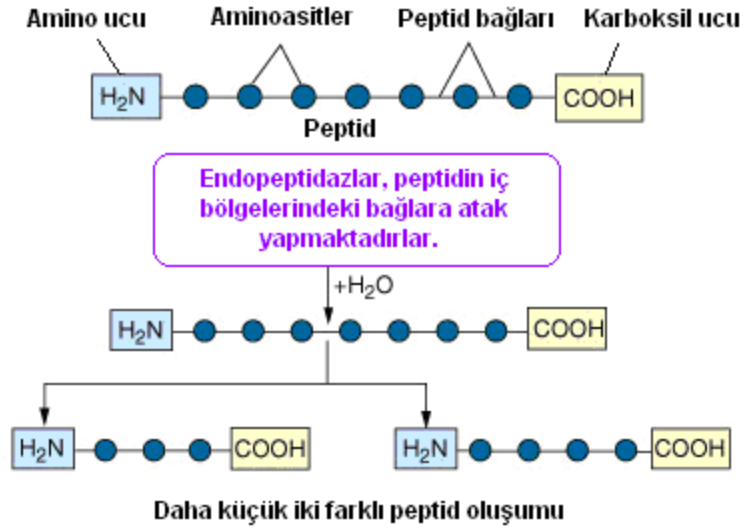


Şekil 1.5. Omega peptidazların etki mekanizması

1.4.2. Endopeptidazlar

Endopeptidazlar, polipeptid zincirlerinin iç bölgelerindeki peptid bağlarına etki etmeleri ile karakterize olurlar (Şekil 1.6.). Serbest N ya da C grubunun varlığı enzimatik aktivite üzerine negatif etki yaratmaktadır.

Endopeptidazlar, serin, sistein, aspartik ve metallo proteazlar olmak üzere dört gruba ayrılmaktadırlar. Ayrıca katalitik mekanizması bilinmeyen endopeptidazlar olarak da ayrıca bir grupları bulunmaktadır.



Şekil 1.6. Endopeptidazların etki mekanizması

1.4.2.1. Serin Proteazlar

Serin proteazlar, aktif bölgelerinde serin içermeleri ile karakterize olurlar. Serin proteazlar substrat tercihlerine göre 3 grupta toplanırlar;

- tripsin benzeri serin proteazlar; pozitif yüklü aminoasitten sonraki peptid bağını hidrolizlerler.
- kimotripsin benzeri serin proteazlar; büyük hidrofobik aminoasitten sonraki peptid bağını hidrolizlerler.
- elastaz benzeri serin proteazlar ise küçük hidrofobik aminoasitten sonraki peptid bağını hidrolizlemektedirler (Rao ve ark. 1998).

Serin proteazların molekül ağırlıkları 18-35 kDa arasında değişmektedir. İzoelektrik noktaları genellikle pH 4 ile 6 arasındadır. Küfler, maya mantarları, birçok bakteri türü ve bazı makro mantar çeşitleri bilinen serin proteaz üreticileri olsa da, subtilisin üreten bazı *Bacillus* sp.' ler en iyi serin proteaz üreticilerindedir (Rao ve ark. 1998).

Serin alkalın proteazlar, birçok bakteri, küf, maya ve mantar tarafından üretilirler. Parçalanacak bağın karboksil bölgesinde tirozin, fenilalanin veya lösin olan peptid bağını hidrolizlerler. Alkalın proteazların optimum pH' sı 10.0 ve izoelektrik noktaları 9.0 civarındadır. Molekül ağırlıkları 15 ile 30 kDa arasında değişmektedir Serin alkalın proteazların *Arthrobacter*, *Streptomyces* ve *Flavobacterium* sp. gibi

bakteriler tarafından üretilmelerine rağmen *Bacillus* spp. en iyi bilinenleridir. Serin proteazlar, DFP (diizopropilflorofosfat) ve PMSF (fenilmetilsulfonilflorid) tarafından inhibe edilen enzimlerdir (Rao ve ark. 1998).

1.4.2.2. Aspartik Asit Proteazlar

Genellikle asidik proteazlar olarak bilinen aspartik endopeptidazlar aktif merkezlerinde katalitik aktiviteleri için aspartik asit rezidülerine ihtiyaç duyar. Düşük pH' larda aktivite gösteren aspartik proteazların molekül ağırlıkları 30-45 kDa arasında değişmektedir ve heksapeptid yapısında olan pepstatin adlı inhibitör tarafından inhibe edilmektedirler. İzoelektrik noktaları pH 3 ile 4.5 arasında değişmektedir. Pepsin, katepsin D ve E ile renin aspartat endopeptidazların bilinen örnekleridirler (Rao ve ark. 1998).

1.4.2.3. Sistein / Tiyol Proteazlar

Sistein proteazlar hem prokaryotik hem de ökaryotik organizmalarda bulunmaktadır. Tüm sistein proteazların aktivitesi, histidin veya sistein içeren katalitik bir çifte bağlıdır. Sistein proteazlar genellikle sadece HCN (hidrosiyamik asit) ve sistein gibi azaltıcı ajanların varlığında aktiftirler. Sistein proteazların tek zincir spesifitelerine dayanarak papain benzeri, arginin rezidüsünde bağı açığa çıkarmak için tercih edilen tripsin benzeri, glutamik aside spesifik ve diğerleri olmak üzere 4 gruba ayrılırlar. Papain en iyi bilinen sistein proteazdır. Sistein proteazların optimumu nötral pH' lardadır fakat lizozomal proteazlar gibi bazıları da asidik pH' larda aktiftir (Rao ve ark. 1998).

1.4.2.4. Metaloproteazlar

Metaloproteazlar, katalitik proteazların en çok çeşitlilik gösteren grubudur. Aktiviteleri için +2 değerlikli metal iyonlarına ihtiyaç duymaları ile karakterize edilirler.

Metaloproteazların yaklaşık otuz sınıfı tanımlanmıştır. Bunların onyedisi yalnızca endopeptidazları onikisi yalnızca ekzopeptidazları içerirken bir sınıf hem endo hem de ekzopeptidaz içermektedir. İşlev spesifisitelerine göre nötral, alkalın, *Myxobacter* I ve *Myxobacter* II olmak üzere dört gruba ayrılırlar.

Alkalin metaloproteazlar çok geniş bir spesifisite gösterirken nötral metaloproteazlar hidrofobik amino asit kalıntılarında spesifisite gösterirler. *Myxobacter* I ayrılan bağın her iki tarafındaki küçük amino asit kalıntılarında *myxobacter* II peptid bağının amino tarafındaki lizin kalıntılarında spesifiktir. Genellikle EDTA gibi şelat yapıcı ajanlar tarafından inhibe olurlar (Rao ve ark.1998).

Bacillus stearothermophilus tarafından üretilen termolizin bir nötral metaloproteaz olup disülfid köprüleri olmaksızın tek bir peptittir ve molekül ağırlığı 34 kDa' dur. 80°C' de 1 saat yarılanma ömrüyle çok kararlı bir proteazdır. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Serratia* türleri tarafından üretilen alkalin metaloproteazlar 48-60 kDa molekül ağırlığına sahiptirler ve pH 7-9 arasında aktiftirler. Matriks metaloproteazlar doku morfojenezi farklılaşması sırasında hücre dışı matriks degradasyonunda önemli bir rol oynarlar, kanser ve artrit gibi hastalıkların tedavisinde yararlı olabilirler (Rao ve ark.1998).

1.5. Mikrobiyal Proteazlar

Hücrede birçok önemli fizyolojik görevler üstlenen proteazlar, tüm ökaryotik ve prokaryotik organizmalar için vazgeçilmez enzimlerdir. Proteazlar, proteinazlar veya peptidazlar organizmada sentezlenen proteinlerin kompozisyonunun, büyüklüğünün, biçiminin ve döngüsünün kontrolünde esansiyel olan enzimlerdir (Sevinç 2010).

Proteazlar, doğada bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kalıntıların dekompozisyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Böylece besin döngüsünü ve ayrıca bitkilerin besinleri alabilmelerini sağlamaktadırlar (Kıran ve ark. 2006).

Proteazlar doğada yaygın olmalarına rağmen, mikroplar bu enzimlerin tercih edilen kaynağı olarak hizmet ederler (Shankar ve ark. 2011). Mikrobiyal proteazlar en önemli hidrolitik enzimler arasındadır ve enzimolojinin gelişiminden beri yaygın bir şekilde çalışılmaktadır (Gupta et al. 2002).

Güncel dünyada proteazlara duyulan talep; mikrobiyal canlıların hızlı gelişimden, düşük maliyetli üretiminden ve mikrobiyal canlıları genetik olarak modifiye ederek çeşitli endüstriyel uygulamalar için gerekli olan daha verimli enzimler üretebilen ve arzu edilen özelliklere sahip yüksek verimli suşlar üretmeyi kolaylaştırdıklarından dolayı mikrobiyal proteazlara karşı büyük bir ilgiye yol açmıştır (Shankar ve ark. 2011).

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

Mikrobiyal proteazlar genelde ekstraselülerdir ve üretici tarafından direkt olarak fermentasyon ortamına salgılanırlar, böylece enzimin sonraki işlemi hayvansal ve bitkisel kaynaklı proteazlara göre kolaylaşır (Rao ve ark. 1998).

Hayvansal ve fungal proteazlarla karşılaştırıldığında bakteriyal proteazlar en önemlisidir. Bakterilerin arasında da *Bacillus* sp. ekstraselüler proteazların spesifik üreticileridir (Nascimento ve Martins 2004).

Bakteriyal proteazlar; genellikle ekstraselüler, kolaylıkla büyük miktarlarda üretilen, termostabil ve yüksek pH aralıklarında da aktif olan enzimlerdir. Bu özellikleri bakteriyal proteazları daha geniş endüstriyel uygulamalar için elverişli yapar (Banik ve Prakash 2004). Bu nedenle özellikle *Bacillus* türlerinden elde edilen mikrobiyal proteazlar, deterjan formülasyonlarındaki büyük uygulamalarıyla en çok kullanılan endüstriyel enzimlerdir (Beg ve Gupta 2003, Haddar ve ark. 2010).

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

1.6. *Bacillus* Cinsi

Bacillus cinsi, Bacillaceae familyasına dahil olup, gram pozitif (bazı türleri değişken), aerobik veya fakültatif anaerobik, spor oluşturan, çubuk şeklinde bakterilerdir (Kalkan ve Halkman 2006). Aerobik ve fakültatif anaerobtur. Çoğunda oksijen terminal elektron alıcısıdır. Endospor oluştururlar. Vejetatif hücreler 0.5X1.2

μm ile $2.5 \times 10 \mu\text{m}$ çapındadır. *Bacillus* cinsinin koloni morfolojisi çeşitlilik gösterir. Geneli beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir (Kalaylı ve Beyatlı 2003).

Bacillus 'ların termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunur. Çok yüksek sıcaklık derecelerinde bile canlı kalırlar. Genellikle $35-37 \text{ }^\circ\text{C}$ da ve pH 7 civarında ürerler (Kalaylı ve Beyatlı 2003).

Bacillus cinsi uygun olmayan şartlarda spor oluşturma yeteneğindedir. Oluşturduğu endospor ise; silindirik, oval, yuvarlak veya böbrek şeklinde olabilir. Buna ilaveten sporlar hücre içerisinde sentral ya da subterminal olarak yerleşebilir. *Bacillus* türlerinin hücre duvarı, hücre yüzeyini tamamıyla örten yüzey katmanı parakristalin oluşturur. *Bacillus* türleri genellikle karbonhidrat kapsülü bulundurlar. Tipik habitatları toprak olmasına rağmen doğada geniş olarak, süt ve süt ürünlerinden hava, su ve yiyecek gibi birçok ortamdan elde edilebilirler (Kalaylı ve Beyatlı 2003).

Ellie yakın türü ihtiva eden *Bacillus* türlerinde, endosporun hücre içindeki yeri farklı olabilir. Spor hücre merkezinde veya uçta olabilir. Vejetatif hücreden daha dar olabildiği gibi, daha geniş de olabilir. Şekeri fermente ederler ve sonuçta gaz oluşumu görülmeksizin asit üretirler. Proteinleri ise, amonyak oluşumu altında parçalarlar ve böylece kokuşmaya neden olurlar. DNA'larındaki G+C mol oranı %32–62'dir (Kalkan ve Halkman 2006).

Bacillus' ları bazı türleri güçlü proteolitik özellik gösterir, buna karşın bazı türleri ya zayıf proteolitik özellik gösterir veya hiç göstermez. Aktif proteolitik türler genellikle ekşitilmeden pıhtılaştırılan süt ürünlerinde kullanılır. *Bacillus cereus* bu özelliği gösteren bir türdür. *Bacillus* türleri arasında lipolitik olan bakteriler de bulunmaktadır.

Bacillus türleri çeşitli kompleks substratlara karşı aktivite gösteren çok sayıda ve çeşitli hidrolitik enzimler üretmekte ve salgılamaktadırlar. Bu nedenle *Bacillus* cinsindeki organizmalar, endüstriyel alanda α -amilaz, proteaz, glukanaaz, glukoz izomeraz ve endonükleaz gibi enzimlerin üretiminde yaygın şekilde kullanılmaktadırlar (Uhlig 1998).

1.6.1. *Bacillus cereus*

Bacillaceae familyasının *Bacillus* cinsine ait bir bakteri olan *B.cereus*, toprak ve bitki örtüsü üzerinde yaygın bir şekilde bulunmaktadır (Kalkan ve Halkman 2006).

Optimum üreme sıcaklığı, suşlara göre 28–35°C arasında değişmekle birlikte genellikle 30°C' dir. Maksimum üreme sıcaklığı yine suşlara göre 37 ile 48°C arasında değişir. Minimum üreme sıcaklığı da suşa bağlı olarak 10 ile 18°C arasındadır. Bazı kaynaklarda minimum sıcaklık 4–5°C, maksimum sıcaklık ise 50°C olarak verilmektedir. Spor germinasyonu için optimum sıcaklık 30°C, minimum -1°C ve maksimum 59°C' dir. Gelişebildiği pH aralığı 4.9-9.3 olup optimum 7.0' dir. *Bacillus cereus*; lesitinaz, jelatinaz, proteaz, amilaz aktivitesine sahip olup, nitratı indirger ve polimiksine dirençlidir. Birçok suşu da %7.5 tuzda üreyebilir. *Cereus* adını tahıl anlamındaki cereal' dan alır.

Özellikle *B.cereus* ile kontamine olmuş gıdalar pişirildikten sonra yeterince ve hızlı soğutulmadıklarında veya gıdaların hazırlanması ile tüketimi arasındaki süre uzadığında, canlı ve ısıya dirençli olan sporların çimlenmesi sonucu mikroorganizma çoğalıp, gıda zehirlenmesine neden olabilecek düzeyde toksin oluşturabilir. Gıda zehirlenmeleri, gıdadaki bakteri sayısı 10^6 /g olduğunda ortaya çıkmaktadır (Kalkan ve Halkman 2006).

B.cereus zehirlenmesinde aracı gıdalar olarak, pişmiş pirinç, makarna, et, kümes hayvanları, sebze yemekleri, çeşitli çorbalar, pudingler, baharat ve soslar sayılabilir. Ayrıca, toprak kökenli olması nedeniyle tarla ve bahçe ürünlerine rahatlıkla bulaşabilen *B. cereus*, sporlu bir bakteri olduğu için et ve süt ürünlerinde de bulunabilir (Kalkan ve Halkman 2006).

B.cereus, insan patojeni olmak yanında salgıladığı proteaz enzimi ile özellikle UHT sütlerde sorun çıkaran bir bakteridir (Kalkan ve Halkman 2006).

Nitrojen kaynağı, karbon kaynağı, oksijen düzeyi, süt komponentleri gibi etkenler sütte *B. cereus* 'un gelişimini etkiler. Aynı zamanda *B. cereus* 'un gelişimi süütün işlenmesi sırasındaki pH ve sıcaklığa da bağlıdır. Sporları pastörize sütte canlı olarak kaldıklarından, sütlerin oda sıcaklığında bozulmasına yol açar. *B. Cereus* diyare, bulantı- kusma olmak üzere, iki türlü gıda zehirlenmesi yapar (Kalaylı ve Beyatlı 2003).

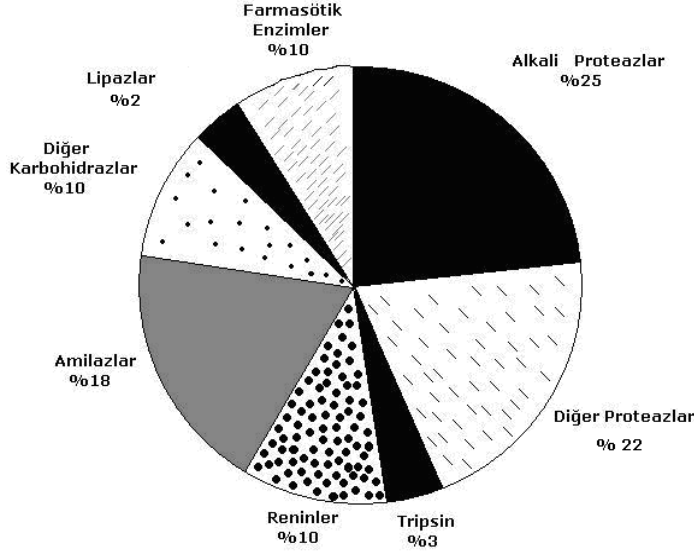
Çizelge 1. 2. *Bacillus cereus*'un taksonomik yeri

- › Bacteria
- › Firmicutes
- › Bacilli
- › Bacillales
- › Bacillaceae
- › Bacillus
- › *Bacillus cereus*

1.7. Proteazların Endüstrideki Kullanım Alanları

Endüstriyel enzimlerin en önemli gruplarından biri olan proteazlar dünyadaki endüstriyel enzim marketinin %65' inden fazlasını oluşturmaktadır (Wang ve ark. 2009).

Proteazlar, geniş substrat spesifitelerinden dolayı deri işleme süreci, deterjan formülasyonu, deterjan endüstrisi, yiyecek endüstrisi, peptid sentezi, protein hidrolizatlarının üretiminde, D,L- aminoasitlerinin çözünürlüğünde, ilaç endüstrisi, etin yumuşatılması, biyosentez, biyoyileşme, biyotransformasyon, kullanılmış fotoğraf filmlerinden gümüşün geri kazanılması ve çöp işleme endüstrisi gibi geniş endüstriyel uygulamalarda kullanılırlar (Shankar ve ark. 2011, Nascimento ve Martins 2004, Deng ve ark. 2010).



Şekil 1.7. Proteazların endüstride kullanım yüzdeleri (Rao ve ark. 1998).

1.7.1. Deterjan Endüstrisinde Proteazlar

Dünya enzim üretiminin yaklaşık %30' unu deterjan enzimi üretimi oluşturmaktadır (Horikoshi 1999).

İdeal deterjan proteazlar, yiyecek, kan ve diğer vücut salgılarından dolayı lekelerin büyük bir kısmının uzaklaşmasını kolaylaştırmak için, geniş substrat spesifitesine sahip olmalıdır. Bir deterjan içinde bir proteazın en iyi performansı için anahtar parametre onun pI' sıdır. Deterjan çözeltisinin pH' ı ile pI' sı birbirine uyumlu ise proteazın bu uygulama için çok uygun olduğu kabul edilir (Rao ve ark. 1998).

Bir enzimin deterjan katkı maddesi olabilmesi için 2 özelliği olmalıdır: alkalın bir pH' ya sahip ve deterjanlarla uyumlu olmalıdır (Anwar ve Saleemuddin 1998).

Deterjanlara alkalın proteaz ilavesinin amacı protein kökenli lekeleri %35-40 uzaklaştırarak temizleme etkisini arttırmaktır. Bakterilerden özellikle yüksek sıcaklık ve pH' larda büyüyen bir *Bacillus* türü tarafından üretilen proteaz enzimleri, deterjanlara katkı maddesi olarak eklenmekte sıcak su ile daha etkin temizlik sağlayacak yıkama olanağını vermektedir. Biyoteknolojide uygulama olanağı bulacağı düşüncesi termofilik enzimlere olan ilgiyi arttırmıştır. Dolayısıyla tekstil ve deterjan endüstrisinde özellikle termofilik ve alkalifilik mikroorganizmaların ürettiği amilaz ve proteaz üreticisi

Bacillus türlerinin taranmasına, izolasyon ve nitelendirmesine yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır (Çelik 2006).

Proteazlar, günümüzde tüm dünyada çamaşır deterjanı katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Proteazların bu alanda kullanımlarındaki artışın temel sebebi, çevresel kaygılardır. Sıcak yıkamalar için tasarlanmış olan deterjanlar, sodyum fosfat ve 60°C üzerindeki yüksek sıcaklıklarda aktif hale gelen bir beyazlatma maddesi olan sodyum perborat içermekteydi, ancak fosfat kirlenmesini azaltmak için ortaya çıkan çevresel baskılar ve polyester kumaşların kullanımının artması nedeniyle bu içerikler deterjanlarda azaltılmış hatta kaldırılmıştır. Bunun sonucu olarak da bakteriyel enzimlerin kullanımı artmıştır (Sevinç 2010).

Mikroorganizmalardan elde edilen proteolitik enzimler dünya çapında deterjan endüstrilerinde en fazla kullanım bulan enzimlerdir. 30 yıl boyunca deterjanlardaki proteazların önemi küçük katkı maddesinden, anahtar bileşenlere değişmiştir. İyi bir deterjan enzimi oksitleme ajanı ve ağartıcılarla beraber stabilitesini koruyabilmelidir. Ticari olarak kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı ağartma/oksitleme ajanlarının varlığında stabilitesini koruyamamaktadır. Bu nedenle enzim tabanlı deterjanların daha iyi stabiliteye sahip olması için rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır. Bununla birlikte mikrobiyal çeşitliliği derinlemesine inceleyerek ticari olarak daha kullanışlı enzimler üretebilen mikroorganizmaların bulunma şansı da daima vardır. Klasik olarak deterjanlar yüksek yıkama sıcaklıklarında kullanılmaktadır. Şimdilerde alkaline proteazların tanımlanmasında geniş sıcaklık aralıklarında etkili olması oldukça ilgi çekmektedir (Kıran ve ark. 2006).

Diğer taraftan günümüzde deterjan endüstrisi, yıkama sıcaklığının düşürülmesi ve deterjan kompozisyonunun değişmesi yönünde çalışmalar yapmakta, fosfat tabanlı deterjanları uzaklaştırarak, deterjan uygulamaları için daha uygun yeni alkali proteazlar üzerinde durmaktadır (Kıran ve ark. 2006).

1.7.2. Deri Endüstrisinde Proteazlar

Bakteriyel proteazlar, derinin kollajen olmayan yapılarının seçimli hidrolizinde, globulinler ve albuminler gibi fibril yapıda olmayan proteinlerin uzaklaştırılmasında, deriden kılların ayrılmasında ve derinin yumuşatılmasında kullanılmaktadır.

Günümüzde deri prosesi; ıslatma, sepileme, kireçlik, kireç giderme, sama ve kıl giderme gibi bazı adımlar içerir. Ancak bu işlemler boyunca yüksek oranda kimyasal madde ve atık su ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda, ham derilerdeki doğal yağın giderilmesinde enzimlerden yararlanılarak işlem etkinliğinin artırılması ve yağ gidermede kullanılan kimyasal maddelerin azaltılarak deri sanayinin çevreyi daha az kirletmesi amaçlanmıştır (Sevinç 2010).

Deri endüstrisinin farklı aşamalarında farklı proteaz çeşidi kullanılmaktadır. Deriyi ıslatma aşamasında nötral proteazlar, deriyi kıllardan arındırma aşamasında alkalin proteazlar ve deriyi yıkama aşamasında da asit proteazlar kullanılırlar (Nilegaonkar ve ark. 2007).

Deri işleme sürecinin farklı aşamalarında özellikle de derinin kıllardan arındırılması aşamasında zararlı kimyasalların yerine enzimlerin kullanımı, çevre kirliliğini %80-90 azaltmaktadır. Geleneksel kimyasal metotlarla karşılaştırıldığında enzimatik prosesler sadece zararlı ve çevreyi kirleten kimyasalların kullanımını azaltmakla kalmaz aynı zamanda yüksek verimli kaliteli ürünler oluşturur (Huang ve ark. 2003).

Proteazlar, hayvan postlarını deriye dönüştürmede ıslatma, kireçleme, kıllardan arındırma, yünden arındırma ve ayırma aşamalarında sıklıkla kullanılmakta ve yapılan araştırmalara göre kimyasal maddelere göre daha yüksek aktivite göstermektedirler. Geleneksel sama işlemi, deri üretim proseslerinden kireç giderme işlemi sonrasında alkali proteazların kullanımı ile gerçekleştirilmektedir. Ham deri yapısında bulunan globüler proteinler parçalanmakta ve yapıları açılmaktadır (Sevinç 2010).

1.7.3. Gıda Endüstrisinde Proteazlar

Gıda endüstrisinde proteazların kullanımı eski zamanlara dayanır. Onlar rutin olarak peynir yapımı, fırıncılık, soya hidrolizatlarının hazırlanması ve et yumuşatma gibi çeşitli amaçlar için kullanılır. Buğday unu fırıncılık prosesinin en büyük bileşenidir.

Fırın hamurlarının özelliklerini belirleyen gluten olarak adlandırılan suda çözünmeyen bir protein içerir. *Aspergillus oryzae*'den elde edilen endo ve exoproteazlar sınırlı proteoliz ile buğday gluteni modifiye etmek için kullanılmıştır. Fungal proteazlar beyaz ekmek ve poğaçaların yapımında da başarılı bir şekilde kullanılmaktadır Fungal proteazların aşırı miktarları, ekmeği hamurumsu bir hale

getirir. Enzim ilavesi özellikle sert hamurlar ve elastiki hamurlar için yğundur. Hamurun enzimatik muamelesi onun elle ve makine ile üretimini kolaylaştırır ve ürünlerin daha geniş bir aralıkta üretimine izin verir.

Proteazların ilavesi artan somun hacimlerinde karışma zamanını yaklaşık % 25 oranında azaltmaktadır. Özellikle *Bacillus subtilis* bakteriyel proteazları kek, bisküvi ve kraker yapımında kullanılır. Bu proteazlar hamurların yumuşamasını geciktirmek için kullanılır ve özellikle kraker üretiminde çok önemlidir. Bakteriyel proteazlar hamurun kuvveti ve uzama kabiliyetini arttırmak için kullanılır (Çelik 2006).

Yüksek içerikte iyi kaliteli protein içerdiklerinden dolayı soya fasulyeleri zengin bir besin kaynağı olarak yüzyıllardır kullanılmaktadır. Proteazlar birçok soya ürünü ve soya sosu hazırlamak için kullanılmaktadır (Çelik 2006).

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

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

1.7.4. Tekstil Endüstrisinde Proteazlar

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

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

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

1.7.5. Atık Arıtımı ve Dönüşümü Endüstrisinde Proteazlar

Boynuz, tüy, tırnak ve saç gibi lifsel proteinler doğada atık olarak oldukça bol miktarda bulunurlar. Bu atıklar bazı mikroorganizmalardan elde edilen proteazlarla kullanılabilir hale dönüştürülebilir veya yok edilebilirler. Proteazların proteolitik aktivitesi ile protein içerikli bu atıkların parçalanarak giderimi sağlanmaktadır. Bu etkileri ile proteazlar son zamanlarda atık yönetiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kümes atıklarının düzenlenmesi proteazların kullanım alanları arasındadır bu yolla atıklar ve tüy birikintileri giderilebilmektedir (Alpan 2008).

Proteazlar fotoğrafçılık sektöründe de kullanılmaktadır. Fotoğraf filmleri üzerinde önemli miktarda gümüş bulunmaktadır, filmlerin yakılması ile yüzeyindeki gümüş geri kazanılmakta ancak bu yöntemle çevre kirliliğinin artmasına yol açılmaktadır. Bu işlemde proteazların kullanılması, gümüşün geri dönüşümü için çevre dostu bir yöntem olarak görülmektedir. Filmler üzerindeki jelatinin enzim tarafından parçalanması ile, üzerinde bulunan gümüş kolayca geri kazanılmakta, proteazlar film sektöründe de giderek önemli bir yer edinmektedir (Anwar and Saleemuddin 1998).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kumar ve ark. (1999), alkalifilik *Bacillus* izolatına ait ekstraselüler 2 proteaz enzimini saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Saflaştırılan enzimlerin (AP-1 ve AP-2) molekül ağırlıklarını SDS-PAGE ile sırasıyla 28 ve 29 kDa olarak belirtmişlerdir. AP-1 ve AP-2' in optimum pH ve sıcaklıklarını sırasıyla 50 ve 55°C, pH 11 ve 12 olarak belirlemişlerdir. Enzimlerin 5 mM Ca^{+2} varlığında ve yokluğunda pH 6.0–12.0 aralığında ve 50°C' ye kadar stabil olduğunu belirtmişlerdir. AP-1 ve AP-2'in yarı ömürlerinin 50°C' de sırasıyla 50 ve 40 dk olduğunu belirtmişlerdir. PMSF' nin enzimleri ile inhibe etmesi enzimlerin alkalın serin proteaz olduğunu belirtmişlerdir.

Mabrouk ve ark. (1999), *Bacillus licheniformis* ATCC 21415' e ait alkalın proteaz üretiminin optimizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Karbon kaynağı olarak %4 laktoz ve %1.5 glukoz karışımını kullanılarak alkalın proteazın en yüksek veriminin elde edildiğini belirlemişlerdir. %6 soya fasülyesi ve %1.2 amonyum fosfat karışımının da en iyi azot kaynağı olduğunu belirlemişlerdir. Besi yerine %0.07 $CaCl_2$ ' nin eklenmesi enzim üretimini artırdığını belirtmişlerdir. Besi yerine sürfaktan olarak %1 mısır yağının eklenmesi aktivitede dikkat çekecek bir artışa yol açtığını ($20\ 379\ U\ ml^{-1}$) belirlemişlerdir. Enzimin 50°C' de 15 dk stabil olduğunu ve 1 saat sonra aktivitesinin %48.8' ini kaybettiğini belirtmişlerdir. Polifosfatın enzim aktivitesini zayıf bir şekilde inhibe ettiğini (%3) , EDTA' nın ise aktivitede %22' lik bir kayba neden olduğunu belirtmişlerdir.

Towatana ve ark. (1999), termal bir kaynağın toprak örneğinden izole edilen alkalifilik ve termofilik *Bacillus* sp. PS719' a ait ekstraselüler alkalın proteazın saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Saflaştırılan enzimin denatüre ve nondenatüre jel elektroforezinde 42 kDa hizasında bir tek bant oluşturduğunu belirtmişlerdir. Elektroforez sonucuna dayanarak saflaştırılan enzimin bir tek polipeptid zincirinden oluştuğunu rapor etmişlerdir. Enzimin izoelektrik noktasının yaklaşık olarak 4.8 olduğunu belirtmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 75°C ve pH 9.0 olduğunu belirtmişlerdir. Enzim aktivitesinin Ca^{+2} tarafından arttırılırken Fe^{+2} ve Cu^{+2} tarafından da inhibe edildiğini belirtmişlerdir. Ca^{+2} varlığında enzimin pH 8.0–10.0 aralığında 80°C' ye kadar stabil olduğunu belirtmişlerdir. Fenilmetilsulfonil florid (PMSF), 3,4-dikloroizokomarın (DCI) ve N- α -

p-tosil-L-lisin klorometil keton (TLCK) enzim aktivitesini tamamen inhibe ettiğinden dolayı enzimin tripsin benzeri bir serin proteaz olabileceğini belirtmişlerdir.

Yang ve ark. (2000), kuzey Tayvan' dan izole edilen *Bacillus subtilis* Y-108' e ait proteaz enziminin kitinin hazırlığında kabukluların çöplerinin deproteinizasyonunda kullanılabileceğini rapor etmişlerdir. *Bacillus subtilis* Y-108' e ait proteaz enzimini saflaştırmışlardır. SDS-PAGE elektroforezi ile enzimin molekül ağırlığını 44 kDa olarak belirlemişlerdir. Substrat olarak kazein kullanıldığında, pH 8.0 ve 50°C' de enzimin daha aktif olduğunu belirtmişlerdir. Enzimin 5 mM Mn⁺², Zn⁺², Fe⁺², Mg⁺², ve Co⁺² iyonları ile aktivasyonu sağlanırken, Hg⁺² (3 mM) iyonunun ise enzimi tamamen inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Enzimin EDTA, sülfhidril ajanı olarak β-merkaptotanol ve sistein hidroklorid, histidin, gliserol gibi metal şelatlayıcı ajanlar ile inhibe olduğunu rapor etmişlerdir. Enzimi tamamen inhibe etmesi sebebiyle EDTA' nın en etkili inhibitör olduğunu belirtmişlerdir. Bunun sonucunda enzimin metal şelatörlere duyarlı nötral proteaz olduğunu belirtmişlerdir.

Sookkheo ve ark. (2000), *Bacillus stearothermophilus* TLS33' e ait S, N ve B diye adlandırılan 3 termostabil ekstraselüler proteazın saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimlerin molekül ağırlıklarını SDS-PAGE ve zimogram analizi ile sırasıyla 36, 53 ve 71 kDa olarak belirlemişlerdir. Proteazların (S, N ve B) optimum pH değerlerinin sırasıyla 8.5, 7.5 ve 7.0 olduğunu belirtmişlerdir. Proteazların (S, N ve B) optimum sıcaklık değerlerinin sırasıyla 70, 85, 90°C olduğunu belirtmişlerdir. Proteazlar (S, N ve B) 5 mM CaCl₂ varlığında 30 dk. sırasıyla 72, 78 ve 90°C' de aktivitelerinin yarısını koruduğunu belirtmişlerdir. Bütün termostabil proteaz enzimlerinin metal şelatör olan EDTA ve 1,10-fenantrolin ile güçlü bir şekilde inhibe olduğunu ve proteolitik aktiviteleri ZnCl₂ eklenerek ile yeniden oluşturulduğunu ve 3 proteazın da metaloproteaz olarak sınıflandırılabileceğini belirtmişlerdir.

Kim ve ark. (2001), *Bacillus cereus* KCTC 3674' e ait yeni bir ekstraselüler proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. *Bacillus cereus* KCTC 3674' ün kültür ortamına birkaç çeşit proteaz salgıladığını belirtmişlerdir. SDS-PAGE ile enzimlerin molekül ağırlıklarını yaklaşık olarak 36 kDa ve 38 kDa olduğunu belirtmişlerdir. 38 kDa' luk proteaz 37°C' de ve 36 kDa' lık proteaz ise 20°C' de kültüre alınarak enzimlerin karakterizasyonunun yapıldığını belirtmişlerdir. 38 kDa'

luk proteaz ekstraselüler bir nötral (metalo-) proteaz olarak tanımlamış ve karakterize etmişlerdir. 36 kDa' luk proteazın N-terminal aminoasit dizisine, EDTA ve *o*-fenantrolin ile güçlü bir şekilde inhibe olmasına ve kanlı agardaki (37°C, 10 h) hemolitik aktivitesine dayanarak bir metaloproteaz olduğunu belirtmişlerdir. 36 kDa ve 38 kDa' luk proteazların optimum pH ve sıcaklıklarını sırasıyla 6.5, 8.0 ve 45°C, 70°C olarak belirlemişlerdir.

Ghorbel ve ark. (2003), balık endüstrisinin atık suyundan izole edilen *Bacillus cereus*' tan organik çözücülerde stabil olan proteaz enzimi üzerine çalışmalar yapılmışlardır. %25 metanol, DMSO, acetonitril ve DME varlığında, 24 saat 30°C'de pre-inkübasyondan sonra enzim aktivitesinin %95'inden fazlasını koruduğunu ve 37°C' in üzerinde enzim aktivitesi için Ca⁺² iyonunun gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Proteaz aktivitesi için optimum sıcaklık 2 mM Ca⁺² iyonu varlığında 60°C ve Ca⁺² iyonunun yokluğunda ise 50°C olduğunu belirlemişlerdir. 60°C' de 2 mM Ca⁺² iyonu varlığında proteaz aktivitesinin %500 stimule edildiğini belirtmişlerdir. Zn⁺² ve Cu⁺² iyonları güçlü bir inhibitör etki gösterirken, Mg⁺² ve Mn⁺² gibi diğer bivalent metal iyonlarının aktiviteyi sırasıyla %285 ve %157 olarak artırdığını belirlemişlerdir. Enzimin termostabilitesinin 40°C' in üzerindeki sıcaklık değerlerinde Ca⁺² iyonu ile arttığını belirtmişlerdir. 10 mM Ca⁺² iyonu varlığında enzim 15 dk 55, 60, 70°C' de ısıtıldıktan sonra sırasıyla aktivitesinin %100, 93 ve 26'sını koruduğunu belirtmişlerdir. Kalsiyumun yokluğunda enzim 55°C' de 15 dk inkübe edildiğinde enzimin aktivitesini tamamen kaybettiğini belirlemişlerdir. Enzimin optimum pH' sın 8.0 olduğunu ve enzim 50°C' de 1 ve 3 saat inkübe edildiğinde enzimin pH 6.0–9.0 arası çeşitli pH tamponlarında tamamen stabil olduğunu belirlemişlerdir. Enzim aktivitesinin EDTA ile inhibe edilmesi enzimin metaloproteaz(lar) içerdiğini desteklediğini belirtmişlerdir.

Adinarayana ve ark. (2003), yeni izole edilen *Bacillus subtilis* PE-11' e ait termostabil serin alkalın proteazın saflaştırılması ve kısmi karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve Sefadeks G-200 jel geçirgenlik kromatografisinden oluşan 2 aşamalı prosedür kullanarak saflaştırmışlardır. SDS-PAGE ile enzimin 15 kDa' luk düşük bir bağıl molekül ağırlığa sahip olduğunu belirlemişlerdir. Enzimi %7.5 verimle 21 kat saflaştırılmışlardır. Substrat olarak kazein kullanarak enzimin 60°C ve pH 10' da maksimum aktivite gösterdiğini ve enzimin pH 8 – 10 aralığında stabil olduğunu belirtmişlerdir. Enzim 60°C' de 350 dk inkübasyondan

sonra bile % 100 stabil olduğunu belirtmişlerdir. Enzimin Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} gibi metal iyonları ile güçlü bir şekilde aktifleştğini belirtmişlerdir. Enzim aktivitesinde iodoasetat, p-kloromerkurik benzoat (pCMB) ve β -merkaptotanol (β -ME) ile zayıf inhibisyon gözlenirken, fenilmetilsulfonyl floride (PMSF) ve diizopropil fluro fosfatlar ile güçlü inhibisyon olduğunu fakat EDTA ile inhibisyonun olmadığını belirtmişlerdir. 10 mM $CaCl_2$ ve 1 M Glisin' in varlığında enzimin ticari ve lokal deterjanlarla uygunluğunu çalışmışlardır. Çalışılan bu enzimin çeşitli deterjanların temizlik gücünü geliştirdiğini belirtmişlerdir. 10 mM $CaCl_2$ ve 1 M Glisin' in varlığında enzim deterjanlar ile kullanıldığında kan lekelerini tamamen ortadan kaldırdığını belirtmişlerdir.

Beg ve ark. (2003), SDS-PAGE ile molekül ağırlığı 30 kDa olarak belirlenen *Bacillus mojavensis*' den ekstraselüler tiyole bağlı ve oksidasyona karşı stabil olan alkalın serin proteazı, anyon değişim kromatografisinden elde edilen fraksiyonları önceden pH 10.5 tampon ile dengelenen Q-sefaroze kolonundan hızlıca geçirilerek %37'den daha fazla verimle 17 kat saflaştırmışlardır. Enzimin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 60°C ve 10.5 olduğunu ve geniş bir pH aralığında (7.0–11.5) 48 saat stabil olduğunu belirtmişlerdir. Çeşitli stabilizatör ve katkı maddelerinin proteazı 60°C' de 4 saatten fazla ve 65°C' de 45 dk stabilize ettiğini rapor etmişlerdir. 2-merkaptotanol, glutatyon ve dithiothreitol (DTT)' in enzim aktivitesini 2 kattan daha fazla arttırırken, PMSF, bestatin, iyodoasetik asit, N-bromosüksinimid gibi spesifik proteaz inhibitörlerinin enzim aktivitesini tamamen inhibe etmesi enzimin tiyole bağlı bir serin proteaz olduğunu desteklediğini belirtmişlerdir. Metal iyonları arasında Cu^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının enzim aktivitesini %36 arttırdığını belirtmişlerdir. Enzimin ticari olarak kullanılan birçok laboratuvar beyazlatıcılara (H_2O_2 , sodyum perborat), sürfaktanlara (Tween'ler, Triton X-100, sodyum şelat) ve çamaşır endüstrisinde kullanılan diğer ticari deterjanlara karşı stabil olduğu belirlenmiştir. Jelatin, elastin, albumin, hemoglobin ve skim milk (süt tozu) gibi bir çok protein kaynaklı doğal substratları hidroliz etmesi proteazın etkili bir deterjan katkı maddesi olarak kullanılabileceğini desteklediğini belirtmişlerdir. Yıkama performans analizine dayanarak enzimin 60°C' de kan ve çim lekesi gibi çeşitli lekeleri en etkili şekilde ortadan kaldırabileceğini belirtmişlerdir.

Nascimento ve ark. (2004), termofilik *Bacillus* sp. SMIA-2 suşuna ait ekstraselüler proteaz enziminin özellikleri ve üretimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Termofilik *Bacillus* sp. SMIA-2 tarafından üretilen ekstraselüler proteaz enziminin üretiminin trisodyum sitrat içeren sıvı kültür ortamında 9 saatte maksimum üretime ulaştığını belirlemişlerdir. Mikroorganizmanın proteaz üretimi için kullandığı birçok karbon kaynağı arasında en iyi karbon kaynağı olarak nişastayı, nişastayı takiben trisodyum sitrat, sitrik asit ve sükrozu kullandığını belirlemişlerdir. Organik ve inorganik azot kaynakları arasında en iyi azot kaynağının amonyum nitrat olduğunu belirlemişlerdir. Enzimin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 60°C ve pH 8.0 olduğunu belirtmişlerdir. Enzimin 40°C ve 80°C’ de orijinal aktivitesinin sırasıyla %14 ve %84’ ünü kaybettiğini belirtmişlerdir. Ham enzim solüsyonunun pH 5.5, 8.0 ve 9.0’ da 24 saat inkübasyonundan sonra enzimin orijinal aktivitesinde sırasıyla yaklaşık %51, %18 ve %66’ lık bir azalma olduğunu belirlemişlerdir. K⁺, Hg⁺² ve Cu⁺² iyonlarının varlığında güçlü bir inhibitör etki gözlemlemişlerdir. 1 mM Hg⁺² konsantrasyonunda enzim aktivitesinin tamamının kaybolduğunu gözlemlemişlerdir. Mn⁺² ve Ca⁺² iyonları aktiviteyi stimüle ettiğini ve bu iyonların enzimin molekül yapısında fonksiyonel bir role sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Frikha ve ark. (2005), *B.cereus* BG1 tarafından üretilen kalsiyuma bağlı proteaz enziminin üretimi ve saflaştırılması üzerine çalışmalar yapmışlardır. Proteazın üretiminin özellikle kültür ortamındaki kalsiyumun konsantrasyonuna bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Kalsiyumun proteaz üretimini ve/ veya enzim sentezinden sonra stabilizasyonunu indüklediğini belirtmişlerdir. Proteaz üretiminin optimizasyonu için en iyi karbon ve azot kaynağı olarak sırasıyla nişasta(%0.5) ve maya özütünü (%0.2) kullanmışlardır. Diğer metal iyonları proteaz üretimini indükleyemediği için kalsiyum ihtiyacının son derece spesifik olduğunu belirtmişlerdir. *B.cereus* BG1 suşuna ait proteaz enzimini ultrafiltrasyon, sıcaklık uygulaması, sefaril S-200 jel filtrasyonu, DEAE–selüloz iyon değişim kromatografisi ve son olarak ikinci bir sefaril S-200 jel filtrasyonu ile spesifik aktivitesinde 39 kat artış ve %23 verimle saflaştırmışlardır. SDS-PAGE analizi ile enzimin molekül ağırlığının 34 kDa olabileceğini bulunmuşlardır. 100 mM Tris-HCl tamponu ve 2mM CaCl₂ varlığında enzimin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 60°C ve pH 8.0 olduğunu belirtmişlerdir.

Patel ve ark. (2005), yeni izole edilen haloalkalifilik *Bacillus* sp.' den ekstraselüler alkalın proteaz enziminin üretimi ve optimizasyonu üzerine çalışmalar yapmışlardır. Enzim üretiminin bakterinin üremesi ile uyumlu olduğunu ve tuğla kırmızısı renginde pigmentasyonla durağan fazın erken dönemlerinde maksimum seviyeye ulaştığını (410 U/ml) belirtmişlerdir. Proteaz üretiminin jelatin içeren sıvı besi yerinde maksimum (397 U/ml) olduğunu belirtmişlerdir. Üremenin ve proteaz üretiminin %10 NaCl içeren besi yerinde optimum olurken, enzim üretimi olmadan sadece düşük değerdeki bakteri üremesinin tuzun yokluğundan kaynaklandığı belirtmişlerdir. Haloalkalifilik *Bacillus* sp. pH 7-9' da üreyebilir ve proteaz üretebilir fakat optimum üreme ve enzim üretiminin sırasıyla pH 8 ve 9' da gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Optimum proteaz üretimi kazamino asit ve kazamino asidi takiben jelatin içeren besi yerinde olurken, optimum üremeyi pepton ve maya özütünün kombinasyonunu içeren besi yerinin sağlandığını belirtmişlerdir. Soya pepton ve tripton içeren besi yerinde enzim üretiminin büyük ölçüde azaldığını belirlemişlerdir. İnorganik azot kaynaklarını daha az elverişli olduğunu belirtmişlerdir. Proteaz enziminin üretimi üzerinde güçlü katabolik represyonun glukoz ve amonyum ile gözlemlendiğini belirtmişlerdir.

Gençkal ve ark. (2006), ekstrem alkalın koşullardan izole edilen ve yüksek proteaz aktivitesi gösteren *Bacillus* sp. tarafından üretilen alkalın proteaz enziminin üretimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. İzole edilen 85 izolatın arasında I18, L18 ve L21 olarak kodlanan *Bacillus* suşları yüksek alkalın proteaz potansiyeli gösterdiğini gözlemlenmişlerdir. Optimum sıcaklıkları I18 suşu için 30°C, L18 ve L21 suşları için 37°C olarak belirlemişlerdir. Her 3 suş için inokulum oranını ve inkübasyon süresini sırasıyla %5 (w/v) ve 96 saat olarak belirlemişlerdir. En yüksek spesifik proteaz aktivitesi (60 U/mg protein) ve daha geniş bir pH aralığı gösterdiği için çalışmanın devamında *Bacillus* sp L21 suşunun seçildiğini belirtmişlerdir. *Bacillus* sp L21 suşunun ham enziminin; çamaşır suyunda stabil, optimum sıcaklık ve pH' sının sırayla 60°C ve pH 11 olmasına dayanarak serin alkalın proteaz olduğunu belirtmişlerdir. Enzimin deterjan endüstrisindeki uygulamalar için potansiyel bir aday olabileceğini belirtmişlerdir.

Setyorini ve ark. (2006), mayalanmış balık ezmesinden izole edilen *Bacillus subtilis* FP-133 tarafından üretilen ve %0-20 NaCl konsantrasyonunda aktivite gösteren

ve stabil olan halotolerant iki yeni ekstraselüler proteazın (exopro-I ve exopro-II) saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Saflaştırılan exopro-I' in optimum pH'sı 7.5 olduğu için alkalın olmayan serin proteaz olduğunu belirtmişlerdir. Exopro-I' in molekül ağırlığının 29 kDa olduğunu belirtmişlerdir. Molekül ağırlığı 34 kDa olan exopro-II' in bir metaloproteaz olduğunu belirtmişlerdir. Exopro-II enziminin, daha önce hiç bakteriyal proteaz aktivatörü olarak rapor edilmeyen Fe^{+2} iyonu ile aktifleştğini belirtmişlerdir. %7.5 NaCl konsantrasyonunda her iki proteazın da doğal substrat olarak bitkisel proteinlere hayvansal proteinleri tercih ettiğini belirtmişlerdir. Tuzlu koşullarda exopro-I ve II enzimlerinin sırasıyla jelatin ve kazeine karşı yüksek katalitik aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Sousa ve ark. (2007), karbon ve azot kaynağı olarak yünü kullanan *Bacillus cereus*' a ait proteazı saflaştırmışlardır. Molekül ağırlığı 45.6 kDa olan *Bacillus cereus*'a ait proteazın nötral bir metaloproteaz olduğunu belirtmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 45°C ve pH 7.0 olduğunu belirlemişlerdir. Aktivitenin EDTA ile %100 inhibe olması enzimin bir metaloproteaz olduğunu belirlemiştir. Enzimin optimal aktivitesini gösterebilmesi için Ca^{+2} iyonuna ihtiyaç duyduğunu belirtmişlerdir. Saflaştırılan enzimin azokazein, azocoll, keratin azure ve yün gibi protein substratlarını hidrolizlediğini belirtmişlerdir.

Joshi ve ark. (2007), temiz bir su gölünden izole edilen gram pozitif *Bacillus cereus* MTCC 6840' a ait ekstraselüler alkalın proteaz enziminin üretimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Bakteri 25°C ve pH 9.0' da 24 saat ürettiğinde maksimum miktarda enzim ürettiğini belirlemişlerdir. Çeşitli substratların kullanıldığını, karbon kaynağı olarak fruktozun, azot kaynağı olarak ta maya özütü ve peptonun kombinasyonunun maksimum enzim üretimini (120 U/ml) sağladığını belirtmişlerdir. Ca^{+2} , Cu^{+2} , K^{+} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} iyonları enzim aktivitesini inhibe ederken, Fe^{+2} ve Co^{+2} iyonlarının da stimüle ettiğini belirtmişlerdir. Enzimin NaCl, SDS ve aseton' un varlığında büyük ölçüde stabil olduğunu belirlemişlerdir. EDTA ve PMSF' in enzim aktivitesinde önemli kayıba neden olduğunu belirlemişlerdir. Enzimin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 20°C ve pH 9.0 olduğunu belirtmişlerdir.

Nilegaonkar ve ark. (2007), bizon (kara sığır) postundan izole edilen *Bacillus cereus* MCM B-326' in ekstraselüler olarak ürettiği proteaz enziminin kısmi

saflaştırılmasını gerçekleştirmişlerdir. Proteaz enziminin maksimum üretiminin 36 saatte, nişasta-soya besi yerinde 30°C’de ve pH 9.0’ da gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir. Enzimin optimum pH ve sıcaklık değerlerini sırasıyla 9.0 ve 55°C olarak belirlemişlerdir. Enzimin, aktivite ve stabilite için değil de enzim üretimi için Ca⁺² iyonlarının gerek duyduğunu belirtmişlerdir. Enzim, bizon postunun kıllarından arındırılmasında etkili bir şekilde kullanılabilir. Enzimin bu özelliği de enzimin deri işleme endüstrisindeki potansiyelini işaret ettiğini belirtmişlerdir.

Ghosh ve ark. (2008), sulak bir alan olan Doğu Calcutta bölgesinde mikrobiyal çeşitliliğe dayanan fonksiyonel bir tarama sırasında izole edilen *Bacillus cereus* DCUW suşu tarafından üretilen ve yüksek bir molekül ağırlığına sahip olan ekstraselüler proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmalarla enzimin tüy atıklarının parçalanmasında kullanıldığını ispatlamışlardır. Tüy hidrolizi sırasında parçalanan ürünlerin kullanımını geliştirmişlerdir. Saflaştırılan keratinolitik proteazın optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 8.5 ve 50°C olduğunu belirlemişlerdir. PMSF’ nin enzimi tamamen inhibe ettiğini bulmuşlardır. SDS-PAGE analizi ile saflaştırılan enzimin molekül ağırlığını 80 kDa olarak belirlemişlerdir. Proteazın keratin, kazein, kollojen, BAPNA ve jelatini içeren geniş bir substrat spesifitesi gösterdiğini belirtmişlerdir.

Wang ve ark. (2009), *Bacillus cereus* TKU006 tarafından üretilen kitinaz ve proteaz enzimlerinin saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda bakterinin 2 gün 25°C’ de % 2 karides kabuğu unu içeren 25 ml besi yerinde en iyi proteaz ve kitinaz üretimini gerçekleştirdiğini belirlemişlerdir. SDS-PAGE ile TKU006’ a ait proteaz ve kitinazın molekül ağırlıklarının yaklaşık 39 ve 35 kDa olduğunu belirtmişlerdir. TKU006’ a ait proteazın optimum pH, optimum sıcaklık, pH stabilite ve termal stabilitesinin sırayla 9, 50°C, 3-11 ve 50°C olduğunu belirtmişlerdir. TKU006’ a ait kitinazın optimum pH, optimum sıcaklık, pH stabilite ve termal stabilitesinin sırayla 5, 40°C, 3-11 ve 60°C olduğunu belirtmişlerdir. TKU006’ a ait proteaz aktivitesi EDTA tarafından tamamen inhibe edildiği için enzimin bir metaloproteaz olduğunu belirtmişlerdir. TKU006’ a ait proteazın %2 Tween-20, Tween-40 ve Triton X-100 ve 1 mM SDS varlığında sırayla aktivitesinin %61, %60, %73 ve %100’ünü koruduğunu belirtmişlerdir. TKU006’ a ait kitinazın %2 Tween-20, Tween-40 ve Triton X-100 ve 1 mM SDS varlığında sırayla aktivitesinin %60, %60, %71 ve

%96' sını koruduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak; TKU006'a ait proteaz ve kitinazın pH ve sürfaktanlara karşı yüksek stabilite gösterdiğini belirtmişlerdir. Yüksek katma değerli bir ürün üretmek için denizcilik atıklarının kullanılabilceğini ve fonksiyonel gıdaların üretimindeki gizli potansiyelinin ortaya çıkarıldığını belirtmişlerdir.

Doddapaneni ve ark. (2009), mezbaha atık örneklerinden izole edilen *B.cereus*' tan proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzim; amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi ile 1.8 kat saflaştırıldığını ve %49 verim elde edildiğini belirtmişlerdir. Enzimin bağıl molekül ağırlığını, optimum pH ve sıcaklık değerlerini sırasıyla 28 kDa, 10 ve 60°C olarak belirlemişlerdir. Enzimin pH 7.0-12.0 aralığında stabil olduğu belirtmişlerdir. Enzim aktivitesi, EDTA ile inhibe edilirken, aktivitenin Cu^{+2} iyonlarının varlığında (4 kat) arttığını belirtmişlerdir. Aktivitenin Cu^{+2} iyonlarının varlığında artması, çalışılan proteaz enziminin metalloproteaz olduğunu göstermiştir. Enzimin; deterjanların, aniyonik sürfaktanların ve organik çözücülerin varlığında bile stabilite ve aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Almas ve ark. (2009), tabakhane atığından izole edilen *Bacillus* strain SAL1' den alkalın proteaz enziminin saflaştırılmasını karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzim, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE sefakril iyon değişim kromatografisi ve fenil sefaroz hidrofobik etkileşim kromatografisi kombinasyonu ile saflaştırılmıştır. Proteaz enzimi 11.8 kat saflaştırılmış ve enzimin spesifik aktivitesinin 4250 PU/mg olduğu belirtilmiştir. SDS-PAGE ile enzimin bağıl molekül ağırlığının 27 kDa olduğu belirlemişlerdir. Enzimin proteolitik aktivitesi jelatin zimogram jeli ile belirlenmiştir. Enzimin pH 7.0-10.0 aralığında stabil olduğunu ve 50°C' de 1 saat stabilitesini koruyabildiğini belirtilmiştir.

Haddar ve ark. (2010), *Bacillus mojavensis* A21 tarafından üretilen ham proteazın karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Karakterize edilen proteazın tavuk tüylerinin hidrolizinde kullanılıp kullanılmayacağını araştırmışlardır. Proteolitik aktivitenin optimum pH' sını ve optimum sıcaklığını sırasıyla 8-11 ve 60°C olarak belirlemişlerdir. Ham proteazın iyonik olmayan (%5 Tween 80 and %5 Triton X-100) ve aniyonik (%1 SDS) sürfaktanlara karşı ve oksitleyici ajanlara karşı çok stabil olduğunu belirlemişlerdir. Enzimin 30°C' den 50°C' ye kadar çeşitli katı (7 mg/ml) ve

sıvı deterjanlara (%1 v/v) karşı mükemmel stabilite ve uyum gösterdiğini belirlemişlerdir. Yıkama performans analizleri, A21 ham proteazının kan lekelerini etkili bir şekilde yok ettiğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte, *Bacillus mojavensis* A21' in tüy parçalanmasında önemli proteolitik aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Enzimin bu özellikleri göz önüne alındığında; *Bacillus mojavensis* A21 tarafından üretilen proteaz enzimi, özellikle de deterjan ve kümes hayvanları atıklarının işleme sürecindeki kullanımı ile gelecekte biyoteknolojik süreçlerde kullanım için potansiyel bir aday olabileceğini belirtmişlerdir.

Deng ve ark. (2010), alkalifilik *Bacillus* sp. B001' in üretim ortamında ekstraselüler olarak ürettiği yüksek bir proteolitik aktiviteye (34277 U/mL) sahip olan alkalin proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çalışılan proteaz enziminin optimum pH'sının ve sıcaklığının sırasıyla 10.0 ve 60°C olması, sürfaktanlara ve oksitleyici ajanlara karşı yüksek stabilite göstermesi bu yüksek alkalin proteazın çeşitli endüstriyel süreçler için potansiyel uygulamalara sahip olduğunu desteklediğini belirtmişlerdir.

Shah ve ark. (2010), Süveyş Körfezinde ham petrol bulaşmış örneklerden izole ettikleri AK187 izolatının organik çözücü, deterjan ve oksitleyici ajanlara karşı toleranslı bir serin alkalin proteaz ürettiğini belirlemişlerdir ve serin alkalin proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. 3 aşamalı saflaştırma basamağı ile proteaz enzimini 58 kat saflaştırmayı başarmışlardır. Enzimin optimum pH ve sıcaklığını sırasıyla 9.0 ve 60°C olarak belirlemişlerdir. Cr^{+3} , Hg^{+2} ve Cu^{+2} gibi ağır metaller enzimi inhibe ederken, Li^{+} , Ba^{+2} , K^{+} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının ise aktiviteyi etkilemediğini belirlemişlerdir. Enzimin, Triton X-100 ve Tween 80 gibi iyonik olmayan deterjanların ve hidrojen peroksit gibi oksitleyici ve beyazlatıcı ajanların varlığında stabil olduğunu belirlemişlerdir. Saflaştırılıp karakterize edilen proteaz enziminin deterjan formulasyonunda, enzimatik peptid sentezinde, biyotransformasyon reaksiyonlarında ve kirlenme karşıtı ajanların formulasyonunda kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Sundararajan ve ark. (2011), protein içeriği zengin olan toprak örneğinden izole ettikleri bakteriyi 16S rRNA gen dizi analizi metodu ile *B.cereus* olarak tanımlamışlardır. Maksimum proteaz üretimini 16. Saatte 200.1 ± 0.68 U/ml aktivite ile

soya fasulyesi kazein karışımı besi yerinde gözlemlemişlerdir. 30°C’de ve pH 8.0’da ham enzimin maksimum aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Proteaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, Sephadex G-50 ve G-100 gel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırmışlardır. Non-denatüre PAGE ile saf enzimin molekül ağırlığının 32 kDa olduğunu belirtmişlerdir. Saflaştırılan proteazın fenilmetilsulfonyl (PMSF) tarafından inhibe edildiği için serin proteaz olduğunu belirtmişlerdir. Ham enzimin deri işleme sürecinde keçi derilerinin kıllardan arındırılmasında etkili olduğunu bulmuşlardır.

Shankar ve ark. (2011), hayvan gübresinden izole ettikleri *Beauveria* sp MTCC 5184 fungal izolattan alkalen proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin pH 9.0 ve 50°C’ de aktif olan alkalen proteaz salgıladığını belirtmişlerdir. Alkalen proteaz 10.2 kat saflaştırılmış ve %38.6 verim elde edilmiştir. Enzimin molekül ağırlığının ve izoelektrik noktasının sırasıyla 29 kDa ve 9.3 olduğunu bulmuşlardır. Enzimin 40°C’ ye kadar ve pH 3-11 aralığında stabil olduğunu belirtmişlerdir. Proteaz enziminin Cd⁺², Hg⁺² ve Mn⁺² iyonları tarafından inhibe edildiğini ve 1mM PMSF’ nin varlığında enzim aktivitesinin tamamen kaybolduğunu belirtmişlerdir. Bunun sonucunda enzimin serin proteaz olduğunu belirtmişlerdir. Enzimin maksimum aktiviteyi kazeinden sonra hemoglobin ve BSA’ da gösterdiğini belirtmişlerdir. Saflaştırılan enzimin endotelial hücreleri ayırabildiğini ve hayvansal hücre kültüründe kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Kumar ve ark. (2011), yeni izole edilen alkalifilik *Bacillus altitudinis* GVC11 tarafından üretilen serin alkalen proteazın saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimi, aseton çöktürmesi ve DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisi ile spesifik aktivitede 7.3 kat artışla ve %15.25 verimle saflaştırmışlardır. Alkalın serin proteazın molekül ağırlığının SDS-PAGE ile 28 kDa olabileceğini ve aktivitesinin zimogram analiziyle de tayin edildiğini belirtmişlerdir. Enzimin optimum pH değerinin 9.5 olduğunu ve geniş bir pH aralığında (pH 8.5-12.5) yüksek oranda aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Saflaştırılan enzimin optimum sıcaklığının 45°C olduğunu ve termal stabilitesinin Ca⁺² iyonlarını tarafından arttırıldığını belirlemişlerdir. Enzim aktivitesinin Ca⁺² ve Mg⁺² iyonları tarafından arttırıldığını ve Hg⁺² iyonu tarafından da inhibe edildiğini belirlemişlerdir. Yapılan çalışmanın, *Bacillus altitudinis* GVC11 tarafından üretilen yüksek oranda alkalın proteaz üretiminin ve proteazın 18

2. KAYNAK ÖZETLERİ

saatte kıl ve kollojen bütünlüğünü bozmadan keçi derisini kıllardan arındırma yeteneğinin tanımlandığı ilk çalışma olduğunu belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmamızda biyolojik materyal olarak Bingöl Kös kaplıcasından izole edilen *Bacillus cereus* KG5 kullanıldı.

3.1.1. Kimyasal Maddeler

3.1.1.1. Besi Yeri Maddeleri

Nutrient Broth (NB) ve Agar Merck' ten temin edilmiştir.

3.1.1.2. Azot Kaynakları

Yeast ekstrakt (maya özütü), beef ekstrakt (et özütü), üre, amonyum sülfat, amonyum klorür, sodyum nitrat ve tripton Merck' ten; pepton Oxoid' ten ve jelatin Difco' dan temin edilmiştir.

3.1.1.3. Karbon Kaynakları

Maltoz, laktoz ve fruktoz Sigma' dan, glukoz, gliserol ve sükroz Merck' ten, galaktoz Difco' dan temin edilmiştir.

3.1.1.4. Kimyasal Maddeler, Deterjanlar ve Metaller

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Merck' ten, Triton X-100 Sıgma' dan, Tween-80 Merck' ten ve Alo ticari olarak temin edilmiştir.

Kalsiyum klorür (CaCl_2), bakır klorür (CuCl_2) ve civa klorür (HgCl_2) Merck' ten, mangan klorür (MnCl_2) Sigma' dan, magnezyum klorür (MgCl_2) Kimetsan' dan ve çinko klorür (ZnCl_2) Carlo Erba Reagent' tan temin edilmiştir.

Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) Merck Darmstadt' dan, 1-10 Phenantrolin Aldrich' ten, Fenilmetilsulfonil florid (PMSF) Fluka Biochemica' dan temin edilmiştir.

3.1.1.5. Elektroforetik Maddeler

Tris-Base [Tris(hidroksimetil) amino methane], akrilamid, N-N-metilen bisakrilamid, TEMED (N-N-N'-N'-Tetrametiletlen diamin), APS (Amonyum

3. MATERYAL VE METOT

persülfat), standart proteinler (ticari β -galaktozidaz, Fruktoz-fosfat, α -amilaz) ve Glisin Sigma Chemical Co., St. Louis' den, Comassie Brilliant Blue R-250 Rio-Rad' dan, BFB (Brom Fenol Blue) ve Gliserol Merck Darmstadt' dan temin edildi.

3.1.2. Besi Yerleri

3.1.2.1. Katı Besi Yerleri

8 g Nutrient Broth besiyerine 15 g agar ilave edilip distile su ile 1000 ml' ye tamamlanıp otoklavlandı.

3.1.2.2. Sıvı Besi Yerleri

Nutrient Broth (NB)

8 g NB ve distile su ile 1 litreye tamamlanıp otoklavlandı.

Bazal medium (BM) Besi Yeri

% 2 Çözünebilir Nişasta, % 0.2 Yeast Ekstrakt, %1 Beef Ekstrakt, % 0.02 CaCl_2 , ve % 0.01 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ oranlarında tartılarak distile su ile çözümleri sağlanarak otoklavlandı.

Glukoz Pepton Medim (GPM) Besi Yeri

% 0.1 Glukoz, % 1 Pepton, % 0.02 Yeast Ekstrakt, % 0.01 MgSO_4 , % 0.01 CaCl_2 , % 0.05 K_2HPO_4 oranlarında tartılarak distile su ile çözümleri sağlanarak otoklavlandı.

3.1.3. Tamponlar

- 0.1 M Sodyum Fosfat tamponu pH: 6-6.5 hazırlandı.
- 0.1 M Tris-HCl tamponu pH: 7.0 - 9.0 hazırlandı.
- 0.1 M Glisin-NaOH tamponu pH: 9.0 - 11.0 hazırlandı.

3.1.4. Kullanılan Aletler

Steril Kabin	(Telstar AV -100)
Spektrofotometre	(Varian Cary UV-Visible Spectrophotometer)

Soğutmalı Santrifüj	(Sigma Christ 2K15)
Magnetik Karıştırıcı	(Stuart)
Etüv	(Termo Scientific Heraus Incubator)
Vorteks	(Vwr International)
Çalkalayıcı	(P Selecta Unitronicor)
İnkübatör	(Sanyo)
Deep-Freeze	(Harris, -95 °C)
Hassas Terazi	(Geg, Avery)
Otoklav	(Hiclave Hv-50L)
Su Banyosu	(Grant 6G, -20, +100 °C)
Sterilizatör	(Heraus)
pH metre	(Metler Toledo MP220)

3.2. METOT

3.2.1. Bakterilerin Kültüre Alınması

B.cereus KG5 NB ve BM sıvı besi yerlerinde kültüre alındı. 100 ml' lik erlenlerin içerisindeki 25 ml sıvı besi yerine, 250 µl bakteri inoküle edildi. İnkübasyon 37°C çalkalamalı su banyosunda 120 rpm' de gerçekleştirildi. Bakteri peleti 10 000 rpm' de 10 dk. santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. Üst sıvı (süpernatant) alındı. Elde edilen üst sıvı proteaz aktivite tayini için kullanıldı.

3.2.2. Proteaz Aktivite Tayini

Leington ve ark.' na (1973) göre yapılan proteaz aktivite tayininde 150 µl enzim solüsyonuna (süpernatant) 0.1 M Tris-HCl pH 7.0 tamponunda hazırlanan %0.5' lik azokazein çözeltisinden (çalışılan sıcaklıkta preinkübasyona tutularak) 250 µl ilave edilerek 45°C' de 30 dakika su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyon, 1 ml %10' luk Trikloroasetik asit solüsyonu (TCA) ilave edilerek durduruldu. 15 dakika buzlukta bekletildikten sonra +4°C' de 10 000 rpm' de santrifüj

3. MATERYAL VE METOT

edildi. 500 µl 1.8 N NaOH solüsyonu üzerine 1 ml üst sıvı (süpernatant) ilave edilerek 420 nm’ de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

1 Ünite enzim, 1 µ mol azokazeini 1 dakikada aminoasitlerine parçalayan enzim miktarıdır.

3.2.3. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini Lowry (1977) metoduna göre yapıldı. Standart eğrinin çizilebilmesi için konsantrasyonu bilinen 1 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA) hazırlandı. Tüplere artan konsantrasyonlarda hazırlanan BSA solüsyonundan, 50 µl enzim solüsyonundan bırakılarak tüplerin hepsine 5 ml alkalın çözeltisi eklendi. 15 dk. 40 °C’ de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra bütün tüplere 1:1 oranında seyreltilmiş 500 µl FCR ayırıcı (Folin-Ciocalteu reagent) eklendi ve 30 dk. karanlıkta bekletildi. 660 nm’ de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

Alkalın çözeltisinin hazırlanışı

- 100 ml % 4 sodyum karbonat (Na_2CO_3) hazırlandı.
- 10 ml % 4 oranında sodyum potasyum tartarat hazırlandı.
- 10 ml % 2 oranında bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) hazırlandı.

100 ml % 4 Na_2CO_3 içerisine 1’er ml Na-K tartarat ve $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ eklenerek karıştırıcıda karışmaları sağlandı. Alüminyum folyo ile sarılı balon joje içerisinde oda sıcaklığında saklandı.

Spesifik aktivite, bovine serum albumin (BSA) standart olarak kullanılarak Lowry yöntemi ile tespit edilen 1 mg protein başına düşen proteaz üniteleri olarak tanımlanmıştır.

3.2.4. Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Proteaz enziminin aktivitesi üzerinde sıcaklığın etkisini belirlemek amacı ile 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C ve 70°C sıcaklıklarında aktivite tayini yapıldı ve optimum sıcaklık değeri belirlendi.

3.2.5. pH' ın Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Proteaz enziminin aktivitesi üzerinde pH'ın etkisini belirlemek amacı ile 0.1 M sodyum fosfat (6.0-6.5), 0.1 M Tris-HCl (7.0-9.0) ve 0.1 M NaOH-Glisin (9.0-11.0) tamponlarında %0.5' lik azokazein solüsyonu hazırlanarak aktivite tayini yapıldı ve optimum pH değeri belirlendi.

3.2.6. Farklı Besi Yerlerinin Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Farklı besi yerlerinin enzim üretimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacı ile NB, BM ve GPM besi yerleri ayrı ayrı hazırlanarak 100 ml' lik erlenlerde bulunan 25 ml besiyerlerine 250 µl bakteri inoküle edilerek inkübasyon 37°C' de 120 rpm' de gerçekleştirildi. Besiyerlerinden 24. saatte örnek alındı. Alınan üst sıvılarla proteaz aktivite tayini yapılarak enzim üretiminin en iyi olduğu besi yeri belirlendi.

3.2.7. Değişik İnkübasyon Sürelerinin Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Değişik inkübasyon sürelerinin enzim üretimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacı ile 25 ml BM besi yeri içeren 100 ml' lik erlenlere 250 µl bakteri inoküle edilerek inkübasyon 37°C' de 120 rpm' de gerçekleştirildi.

BM besi yerinden 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 ve 108 saatlerinde üst sıvılar alınarak proteaz aktivite tayini ve protein miktar tayini yapıldı.

3.2.8. Farklı Azot Kaynaklarının Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Farklı azot kaynaklarının enzim üretimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacı ile BM besi yerinden %0.2 yeast ekstrakt ve %1 beef ekstrakt çıkarılarak, %1.2 oranında yeast ekstrakt, beef ekstrakt, pepton, jelatin, üre, amonyum sülfat, amonyum klorür, sodyum nitrat ve tripton eklenerek otoklavlandı. Besi yerine bakteri inoküle edilerek inkübasyon 37°C' de 120 rpm' de gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda alınan üst sıvılardan proteaz aktivite tayini ve protein miktar tayini yapıldı.

3.2.9. Farklı Yeast Ekstrakt Konsantrasyonlarının Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarının enzim üretimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacı ile yapılan deneyler sonucunda BM besi yeriden enzim aktivitesini düşürdüğü bilinen beef ekstrakt çıkarılarak %0.5, %1, %1.5, %2, ve %3 yeast ekstrakt içeren BM besi yeri hazırlanıp otoklavlandı. Bakteri inoküle edilerek inkübasyon 37°C’ de 120 rpm’ de gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda süpernatantta proteaz aktivite tayini ve protein miktar tayini yapıldı.

3.2.10. Farklı Karbon Kaynaklarının Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Farklı karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacı ile BM besi yerinden % 2’ lik nişasta çıkarılarak aynı oranda glukoz, sükroz, maltoz, laktoz, galaktoz, fruktoz ve gliserol eklendi. Gliserolün sterilizasyonu ayrı bir erlende otoklavlanarak gerçekleştirildi. Gliserol haricindeki karbon kaynakları sterilizasyon amacı ile 20 dk. ultraviyole ışın (UV) altında tutuldu. Sterilizasyonu gerçekleştirilen bütün karbon kaynakları BM besi yerine eklendi. Bakteri inoküle edilerek inkübasyon 37°C’ de 120 rpm’ de gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda süpernatantta proteaz aktivite tayini ve protein miktar tayini yapıldı.

3.2.11. Farklı Metal İyonlarının Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Farklı metal iyonlarının enzim üretimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacı ile CaCO₃, CaCl₂, NaCl, MgCl₂ ve MnCl₂ %0.5 oranında BM besi yerine eklenerek otoklavlandı. Bakteri inoküle edilerek inkübasyon 37°C ’de 120 rpm’ de gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda süpernatantta proteaz aktivite tayini ve protein miktar tayini yapıldı.

3.2.12. CaCl₂’ nin Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

CaCl₂’ nin enzim üretimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacı ile besi yerinde konsantrasyonu %0, %0.01, %0.02, %0.05, %0.1, %0.2, %0.5 ve %1 olacak şekilde BM besi yerine CaCl₂ eklenerek otoklavlandı. Bakteri inoküle edilerek inkübasyon 37°C’ de

120 rpm' de gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda süpernatantta proteaz aktivite tayini ve protein miktar tayini yapıldı.

3.2.13. Enzimin Saflaştırılması

3.2.13.1. Çöktürme ve Diyaliz

Diyaliz işlemi +4°C' de gerçekleştirildiğinden, deneylerde kullanılan BM besi yerinin içeriğinde bulunan nişasta +4°C' de çöktüğünden dolayı nişasta yerine laktoz kullanıldı.

İçeriğinde % 2' lik nişasta bulundurmayan BM besi yeri otoklavlandıktan sonra, nişasta ile aynı oranda tartılan laktozun sterilizasyonunu sağlamak amacıyla 20 dk. UV altına tutulup steril kabinde besi yerine eklendi. Bakteri inoküle edilerek inkübasyon 37°C' de 120 rpm' de 24 saat gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrasında besi yeri soğutmalı santrifüjde 10 000 rpm' de 10 dk. santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Elde edilen süpernatanta %40, %45, %50, %55, %60, %65 ve %70' lik amonyum sülfat çöktürmesi için gereken amonyum sülfat miktarı, buz altında ve magnetik karıştırıcı üzerinde azar azar eklenerek çözünmesi sağlandı. Amonyum sülfat süpernatant içerisinde çözüldükten sonra elde edilen sıvı 15 000 rpm' de 20 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen peletin çözünmesi 0.05 M Tris-HCl pH 7.0 tamponu kullanılarak sağlandı.

0.05 M Tris-HCl pH 7.0 tamponunda çözülmüş pelet, kaynayan saf suda 5 dk bekletildikten sonra tekrar saf sudan geçirilerek temizlenen diyaliz hortumuna bırakıldı. Santrifüj sonrasında elde edilen sıvıyı amonyum sülfattan arındırmak amacı ile 1 gece +4°C' de magnetik karıştırıcı üzerinde 1 litre 0.05M Tris-HCl pH 7.0 tamponu kullanılarak inkübasyona bırakıldı. Diyaliz aşamasında toplam 2 litre tampon kullanıldı. Diyaliz sonunda final hacim ölçüldü. Ham ekstrakt ve diyaliz sonrasında Lowry (1977) yöntemine göre protein miktar tayini ve proteaz aktivite tayini yapıldı.

3.2.13.2. Sefadeks G-75 Jel Geçirgenlik Kolon Kromatografisi

Çöktürme ve diyaliz sonrası kısmi saflaştırılan enzimin daha ileri derecede saflaştırılması için proteinleri molekül büyüklüğüne göre ayırma esasına dayanan jel geçirgenlik kolon kromatografisi gerçekleştirildi. Yükleme öncesinde sefadeks G-75

3. MATERYAL VE METOT

kolon materyali ürünün hazırlanış prosedürüne göre hazırlanıp kolona dolduruldu ve 2mM CaCl₂ içeren 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) tampon çözeltisi ile dengelendi.

Enzim ile yüklenmiş kolon öncelikle 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) tampon çözeltisi ile 1.5 ml/dk akış hızında yıkandı. Yıkama sonrasında kolondan alınan 1.5 ml' lik her fraksiyonun 280 nm' de absorbansı alındı.

Kolon yıkandıktan sonra fraksiyonların 280 nm' de okunan absorbans değerleri kaydedildi. Daha sonra yüksek spesifik aktivite gösteren fraksiyonlar bir araya toplandı. Bu fraksiyonlar 50 mM 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) tampon çözeltisine karşı +4°C' de gece boyunca diyaliz edildi. Liyofilizasyon sonrasında elde edilen solüsyonda proteaz enzim aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldı.

3.2.14. Bazı Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Bazı metal iyonlarının kısmi olarak saflaştırılan enzimin aktivitesi üzerindeki etkisinin araştırılması amacı ile CaCl₂, CuCl₂, MnCl₂, MgCl₂, ZnCl₂ ve HgCl₂' den 10' ar ml 90 mM' lık stok çözelti hazırlandı. Deney tüplerinde enzim solüsyonu ve belirlenen miktarlarda metal iyonları oda sıcaklığında 15 dk. ön inkübasyona bırakıldı. Ön inkübasyon süresi sonunda deney tüplerine substrat eklenerek enzim için optimum olan koşullarda aktivite tayini yapıldı.

3.2.15. Bazı Metal Şelatör ve Kimyasal Maddelerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması

B.cereus KG5 %2' lik laktöz içeren BM besi yerinde üretilerek 24. saatte kültür 10 000 rpm' de 5 dk. santrifüjlendi. Elde edilen üst sıvı (süpernatant) enzim aktivite tayininde kullanılmak üzere çöktürme ve diyaliz işlemlerine tabi tutuldu.

Kısmi saflaştırılmış enzimin aktivitesinde bazı metal şelatör ve kimyasal maddelerin etkisini belirlemek için EDTA, 1,10-Phenanthroline ve PMSF maddelerinden 1-10 mM arasındaki konsantrasyonlar kullanıldı. 1,10-Phenanthroline metanolde ve PMSF etanolde hazırlandığı için aynı orandaki metanol ve etanolün enzim aktivitesine olan etkisi araştırıldı. EDTA, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda çözülmüştür. Uygun konsantrasyonlardaki metal şelatör ve kimyasallar enzim solüsyonu ile oda sıcaklığında 15 dk. muamele edildi. Deney tüplerinde enzim

solüsyonu ve belirlenen miktarlarda metal şelatör ve kimyasal maddeler oda sıcaklığında 15 dk. ön inkübasyona bırakıldı. Ön inkübasyon süresi sonunda deney tüplerine substrat eklenerek enzim için optimum olan koşullarda aktivite tayini yapıldı.

3.2.16. Bazı Deterjanların Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Bazı deterjanların kısmi olarak saflaştırılan enzimin aktivitesi üzerindeki etkisinin araştırılması amacı ile SDS, Triton X-100, Tween-80 ve içeriğinde enzim bulundurmeyen ticari ALO deterjanından 10' ar ml %5' lik stok çözeltisi hazırlandı. Deney tüplerinde enzim solüsyonu ve belirlenen miktarlarda deterjan oda sıcaklığında 15 dk. ön inkübasyona bırakıldı. Ön inkübasyon süresi sonunda deney tüplerine substrat eklenerek enzim için optimum olan koşullarda aktivite tayini yapıldı.

3.2.17. Enzimin Termal Stabilitesinin Belirlenmesi ve CaCl₂' nin Termostabiliteye Etkisinin Araştırılması

Kısmi saflaştırılmış enzim solüsyonunun termostabilitesinin araştırılması amacı ile enzim, 40–50 °C sıcaklık aralıklarında 30-120 dk. tutularak yapıldı.

CaCl₂' nin enzimin termostabilitesine etkisini belirlemek için reaksiyonun toplam hacminde 2 mM CaCl₂ olacak şekilde hazırlanan CaCl₂ stoğundan uygun miktar alınarak enzim solüsyonu ile birlikte 50°C' de 30-120 dk. bekletildi. Enzim solüsyonu test edilen her sıcaklıkta 30-120 dk. bekletildi. Daha sonra enzim için optimum olan koşullarda aktivite tayini yapıldı. Kalan aktivitenin hesaplanması amacıyla analiz sonuçları orijinal enzim aktivitesiyle karşılaştırıldı.

3.2.18. Proteaz Enziminin Elektroforetik Analizi

Çözeltiler

% 30 akrilamid / % 0.8 bis akrilamid: 30 g akrilamid, 0.8 g bis akrilamid saf su ile 100 ml'ye tamamlandı, filtre edildi. Koyu renkli şişede 4°C' de saklandı.

1.5 M Tris.HCl pH 8.8: 54.45 g Tris-base 150 ml' ye tamamlandı, 1N HCl ile pH 8.8' e ayarlandı, hacim saf su ile 300 ml' ye tamamlandı, filtre edilerek 4°C' de saklandı.

0.5 M Tris-HCl pH 6.8: 6 g Tris-base 60 ml saf suda çözüldü, 1N HCl ile pH 6.8' e getirildi, hacim saf su ile 100 ml' ye tamamlandı, filtre edilerek 4°C' de saklandı.

3. MATERYAL VE METOT

%10' luk APS (amonyum per sülfat) : 0.1 g APS saf su ile 1 ml' ye tamamlandı. Taze olarak hazırlanmalıdır.

Elektroforez tamponu: 3 g Tris, 14.4 g glisin, 0.1 g SDS, 1000 ml saf su ilave edilerek hazırlandı ve 4°C' de saklandı.

Non – Denatüre Jel İçin %0.01 SDS İçeren İz boya (örnek boya) : 7 ml 0.1 M Tris. HCl pH 6.8, 0.001 g SDS, 3.6 ml gliserol, 1.2 mg BFB ile 10 ml saf su ilave edildi. 1' er ml olacak şekilde, ependorflara konarak -70°C' de saklandı.

Denatüre jel için SDS İçermeyen İz boya (örnek boya): 7 ml 0.1M Tris. HCl pH 6.8, 3.6 ml gliserol, 1.2 mg BFB ile 10 ml saf su ilave edildi. 1' er ml olacak şekilde ependorflara konarak -70°C' de saklandı.

% 10' luk SDS: 0.1 g SDS saf su ile 1 ml' ye tamamlandı.

% 0.1' lik jelatin: 0.0075 g jelatin saf su ile 1 ml' ye tamamlandı.

3.2.18.1. %0.1 Jelatin İçeren Non -denatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Zimogram Analizi ve SDS-PAGE ile Enzimin Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi

3.2.18.1.2. Jellerin hazırlanması

Çalışmalarımızda %10' luk jel kullanıldı. Ayırma jeli döküldükten sonra doyurulmuş bütanol ile hava teması kesildi. Oda ısısında 30–60 dakika polimerizasyon gerçekleşti. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra bütanol distile su ile yıkandı.

Konsantrasyon jeli hazırlanarak kuyucukların oluşması için tarak yerleştirildi ve jel döküldü. Konsantrasyon jeli döküldükten sonra doyurulmuş bütanol ile hava teması kesildi. Oda ısısında 30–60 dakika polimerizasyon gerçekleşti. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra bütanol distile su ile yıkandı.

3.2.18.1.3. Elektroforez İşlemi

SDS-PAGE' de SDS' li iz boya ile karıştırılan örnekler, kaynayan suda 5 dk. bekletilmek suretiyle denatüre edildi. Denatüre edilen ham özüt, çöktürme& diyaliz ve Sefadeks G-75 jel geçirgenlik kromatografisi sonrası örneklerinden her kuyucuğa iz boya ve örnek karışımından uygun miktarlarda yüklenerek elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

Non-denatüre jel elektroforezinde ham özüt, çöktürme& diyaliz ve Sefadex G-75 jel geçirgenlik kromatografisi sonrası elde edilen enzim solüsyonlarının uygun miktarlar non-denatüre iz boya ile karıştırıldı ve sonrasında elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

Elektroforez yapılacağı zaman jelin üzerindeki su alındı. Örnekler kuyucuklara sırasıyla konuldu. 1.00 mm' lik jele 150V (50 mA) akım verildi, yaklaşık 3 saat sonra elektroforez işlemi tamamlandı.

Camlar arasındaki %0.1 jelatin içeren non-denatüre jeli çıkarıldıktan sonra SDS'yi uzaklaştırarak renatüre olmalarını sağlamak için jel 45 dk %2.5 Triton X-100 içeren 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda yıkandı. Jel daha sonra 3 saat % 2.5 Triton X-100 ve 5 mM CaCl₂ içeren 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda bekletildi. Sonra tampon çözeltisi dökülüp jelatinli jel Comassie Brilliant Blue R-250 boyasında 2 saat bekletildikten sonra boya çıkarma solüsyonuna alınıp incelemeye alındı.

Camlar arasındaki SDS-PAGE jeli çıkarıldıktan sonra jel Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyandı ve boya çıkarma solüsyonu ile iyice yıkandı. R_f değerleri hesaplanan numunelerin semilogaritmik bir skalada standart proteinlerle karşılaştırılarak belirlenerek enzimin molekül ağırlığının yaklaşık değeri hesaplandı.

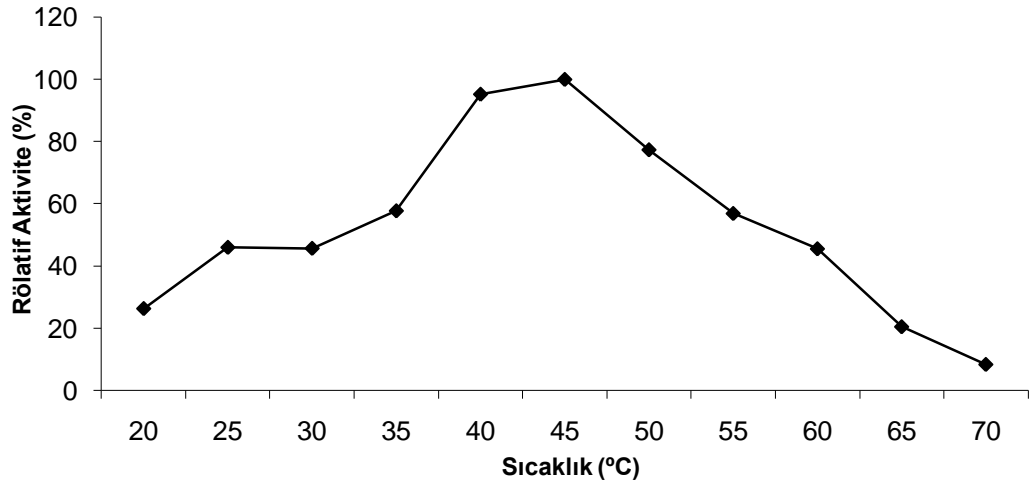
$$R_f = \frac{\text{Numunenin aldığı yol}}{\text{İz boyanın aldığı yol}}$$

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

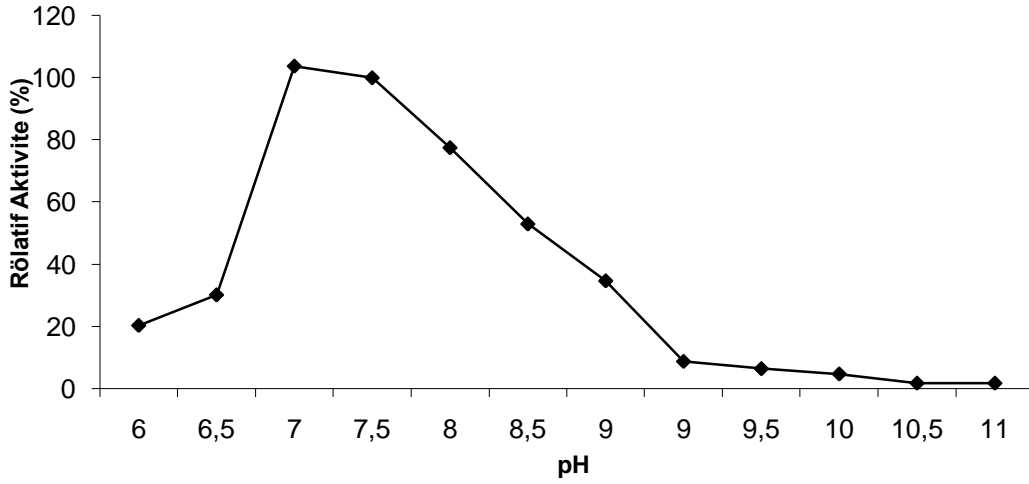
Proteaz enziminin aktivitesi üzerinde sıcaklığın etkisini belirlemek amacı ile 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C ve 70°C sıcaklıklarında aktivite tayini yapıldı ve optimum sıcaklık değeri belirlendi. Enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değerinin 40-45°C arasında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi

4.1.2. pH 'ın Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

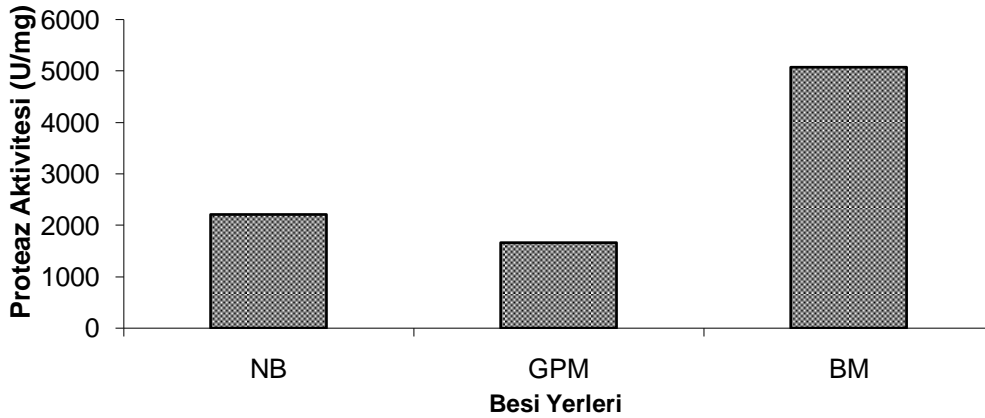
Proteaz enziminin aktivitesi üzerinde pH'ın etkisini belirlemek amacı ile 0.1 M sodyum fosfat (6.0-6.5), 0.1 M Tris-HCl (7.0-9.0) ve 0.1 M NaOH-Glisin (9.0-11.0) tamponlarında %0.5' lik azokazein solüsyonu hazırlanarak aktivite tayini yapıldı ve optimum pH değeri belirlendi. Enzim aktivitesinin pH 6.5-7.0 arasında hızlı bir artış gösterdiği, pH 7.0-7.5 arasında optimuma yakın aktivite gösterdiği, pH 7.5' tan sonra gittikçe azalan bir aktivite eğiliminde olduğu görülmüştür. Optimum pH 7.0 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. pH'ın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi

4.1.3. Farklı Besi Yerlerinin Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisi

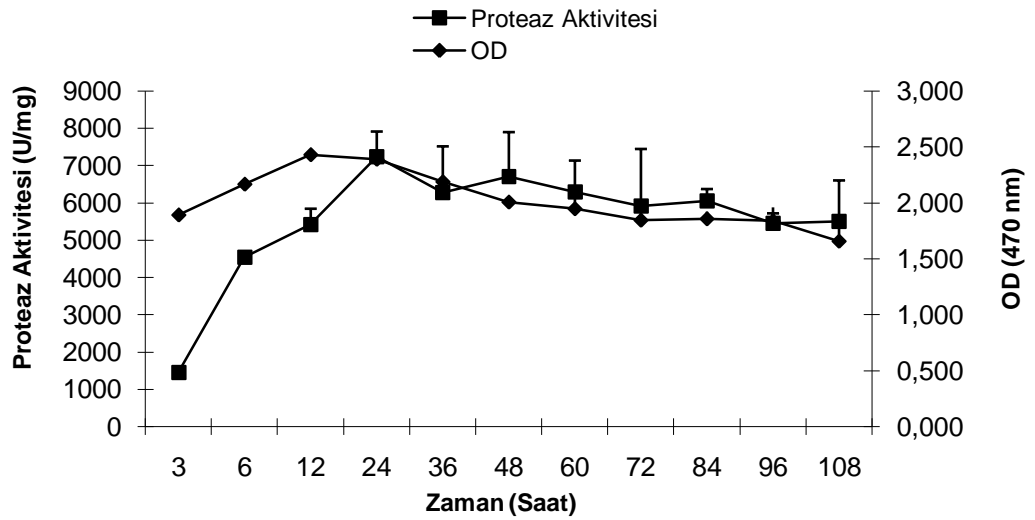
Farklı besi yerlerinin enzim üretimi üzerindeki etkisinin araştırılması için içerikleri farklı olan NB, GPM ve BM besi yerlerinde bakteriler 37°C' de 120 rpm' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinden sonra üst sıvılardan proteaz aktivite tayini yapılmıştır. Analiz sonuçlarına proteaz aktivite sıralaması BM > NB > GPM şeklinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Besi yerlerinin enzim üretimi üzerindeki etkisi

4.1.4. BM Besi Yerinde Değişik İnkübasyon Sürelerinin Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisi

3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 ve 108 saatler arasında BM besiyerinde kültüre alınan bakterilerde zamana bağlı enzim üretimi araştırılmıştır. İnkübasyon süresinden sonra elde edilen üst sıvılar ile bakteri OD (optik yoğunluk) 'si ölçülüp hem proteaz aktivite tayini hem de protein miktar tayini yapılarak spesifik aktivite (U/mg) tespit edilmiştir. Enzim aktivitesinin 3. saatten 24. saate artarak devam ettiği gözlemlenmiştir. Maksimum enzim aktivitesi 24. saatte elde edilmiştir. Enzimin spesifik aktivite değerleri 3, 6, 12, 24 saatlerinde sırasıyla 1450.6 U/mg, 4546.0 U/mg, 5415.0 U/mg, 7235.4 U/mg, olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.4.).



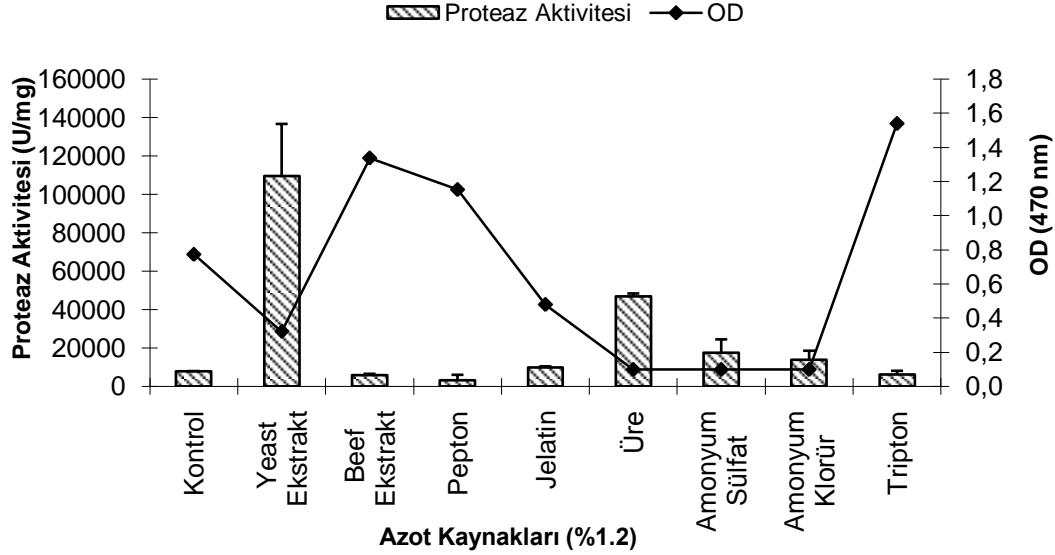
Şekil 4.4. BM besiyerinde değişik inkübasyon sürelerinin enzim üretimi üzerindeki etkisi

4.1.5. Farklı Azot Kaynaklarının Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisi

Farklı azot kaynaklarının enzim üretimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla BM besiyerinden %0.2 yeast ekstrakt ve %1 beef ekstrakt çıkarılarak, %1.2 oranında yeast ekstrakt, beef ekstrakt, pepton, jelatin, üre, amonyum sülfat, amonyum klorür ve tripton eklenerek otoklavlandı. Ekimi yapılan bakteriler 37°C' de 120 rpm' de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinden sonra elde edilen üst sıvılar ile bakteri OD' si ölçülüp hem proteaz aktivite tayini hem de protein miktar tayini yapılarak spesifik aktivite (U/mg) tespit edilmiştir. Kontrolle karşılaştırıldığında (7761 U/mg) kullanılan azot kaynaklarından amonyum sülfat (17563 U/mg), amonyum klorür (14003 U/mg) ve jelatinde (9930 U/mg) enzim aktivitesi tespit edilmiştir. Tripton (6188 U/mg) ve peptonda (3033 U/mg) kontrole göre daha düşük bir aktivite elde edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

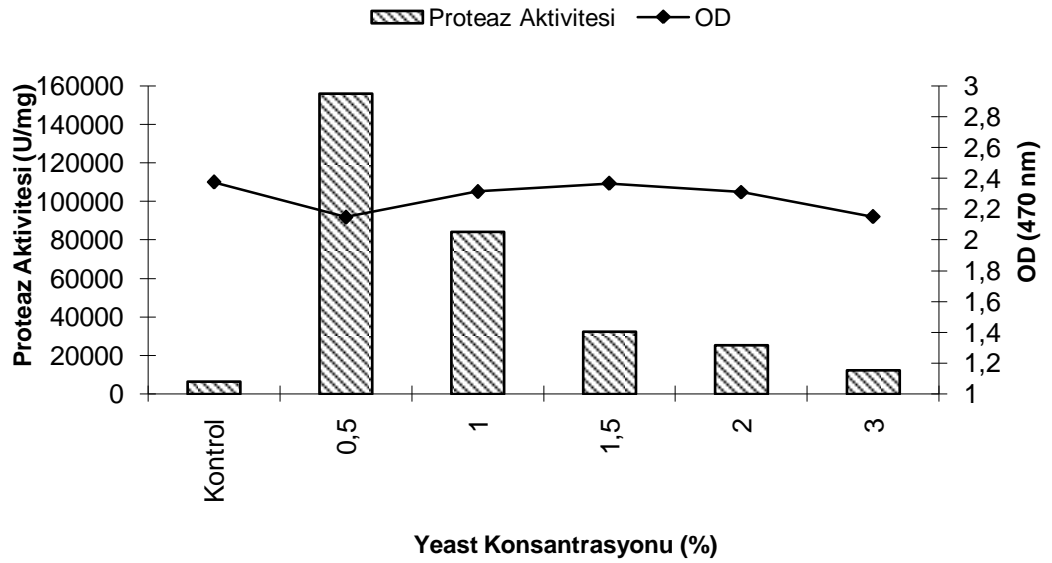
En yüksek aktivite yeast ekstrakta (109646 U/mg) ve ürede (46844 U/mg) elde edilmiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Farklı azot kaynaklarının enzim üretimi üzerindeki etkisi

4.1.6. Farklı Yeast Ekstrakt Konsantrasyonlarının Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisi

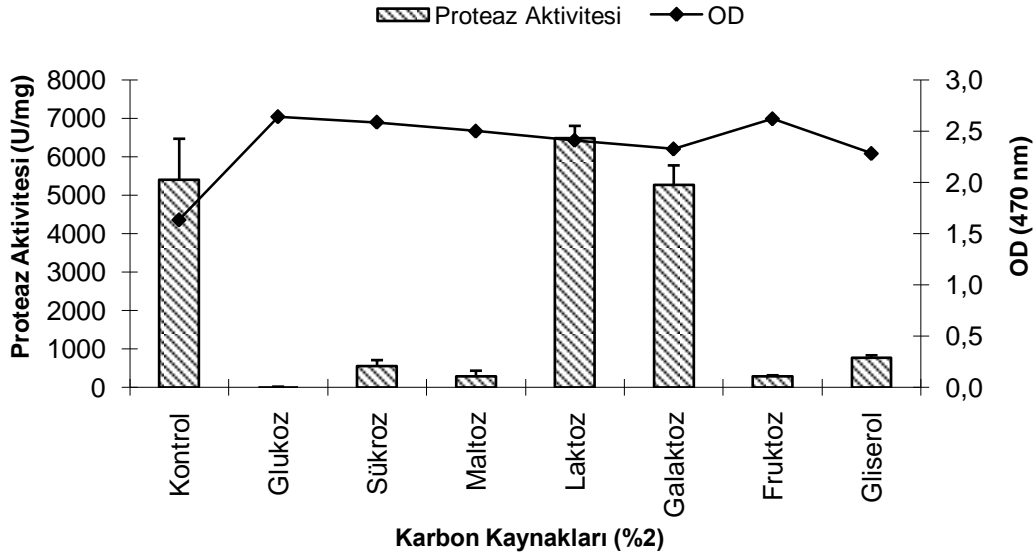
Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarının enzim üretimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacı ile %0.5, %1, %1.5, %2, ve %3 yeast ekstrakt içeren BM besi yeri hazırlanıp otoklavlanarak bakteri ekimi yapıldı. Ekimi yapılan bakteriler 37°C’ de 120 rpm’ de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinden sonra elde edilen üst sıvılar ile bakteri OD’ si ölçülüp hem proteaz aktivite tayini hem de protein miktar tayini yapılarak spesifik aktivite (U/mg) tespit edilmiştir. Kontrole (6476 U/mg) karşılaştırıldığında %0.5 (156370 U/mg), %1 (84285 U/mg), %1.5 (32414 U/mg), %2 (32414 U/mg), ve %3 (12350 U/mg)’ teki konsantrasyonlarının tamamında enzim aktivitesinde artış gözlemlenmiştir. En yüksek enzim aktivitesi %0.5 (156370 U/mg), en düşük ise %3 (12350 U/mg) konsantrasyonlarında elde edilmiştir. Artan yeast konsantrasyonlarında enzim aktivitesinde azalmalar gözlemlenmiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarının enzim üretimi üzerindeki etkisi

4.1.7. Farklı Karbon Kaynaklarının Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisi

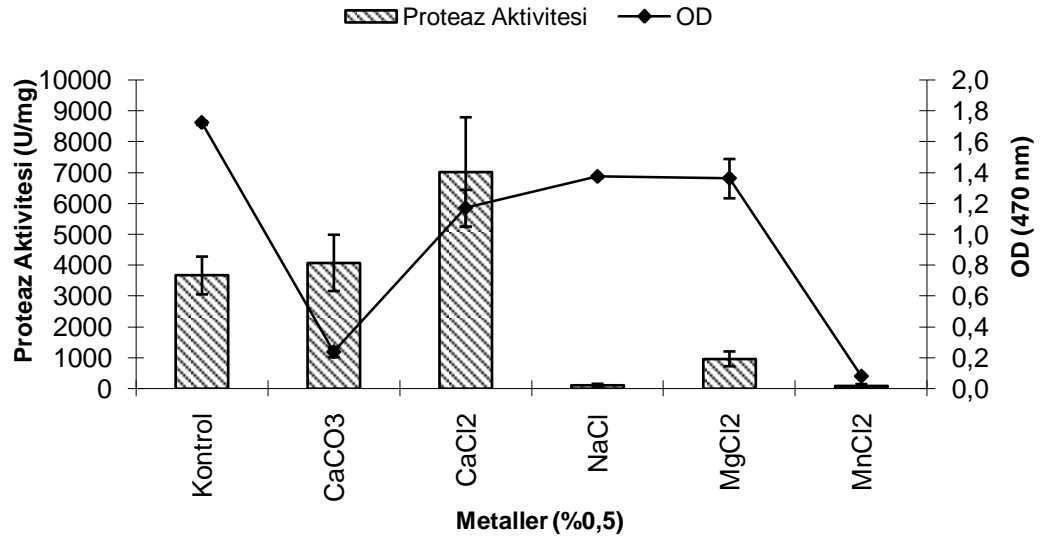
Farklı karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacı ile BM besiyerinden %2' lik nişasta çıkarılarak aynı oranda glukoz, sükroz, maltoz, laktoz, galaktoz, fruktoz ve gliserol eklenerek bakteri ekimi yapıldı. Ekimi yapılan bakteriler 37°C' de 120 rpm' de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinden sonra elde edilen üst sıvılar ile bakteri OD' si ölçülüp hem proteaz aktivite tayini hem de protein miktar tayini yapılarak spesifik aktivite (U/mg) tespit edilmiştir. Kontrole (5399.9 U/mg) karşılaştırıldığında, galaktoz (5279.7 U/mg), gliserol (772.4 U/mg), sükroz (561.4 U/mg), maltoz (292.6 U/mg) ve fruktozda (297.5 U/mg) daha düşük aktivite elde edilmiştir. En yüksek ve en düşük aktivite sırasıyla laktozda (6485.2 U/mg) , glukozda (21.1 U/mg) elde edilmiştir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Farklı karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerindeki etkisi

4.1.8. Farklı Metal İyonlarının Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisi

Farklı metal iyonlarının enzim üretimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacı ile CaCO_3 , CaCl_2 , NaCl , MgCl_2 ve MnCl_2 %0.5 oranında BM besiyerine eklenerek otoklavlanarak bakteri ekimi yapıldı. Ekimi yapılan bakteriler 37°C ' de 120 rpm' de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinden sonra elde edilen üst sıvılar ile bakteri OD' si ölçülüp hem proteaz aktivite tayini hem de protein miktar tayini yapılarak spesifik aktivite (U/mg) tespit edilmiştir. Kontrol (3672 U/mg) ile karşılaştırıldığında besiyerine %0.5 oranında CaCl_2 (7029 U/mg)' nin eklenmesi enzim üretimini yaklaşık 2 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Kontrole göre CaCO_3 ' ün enzim üretimini arttırdığı, MgCl_2 ' nin ise enzim üretiminde bir azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir. NaCl (115 U/mg) ve MnCl_2 (83.6 U/mg)' nin kontrole göre enzim üretimini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (Şekil4.8.).

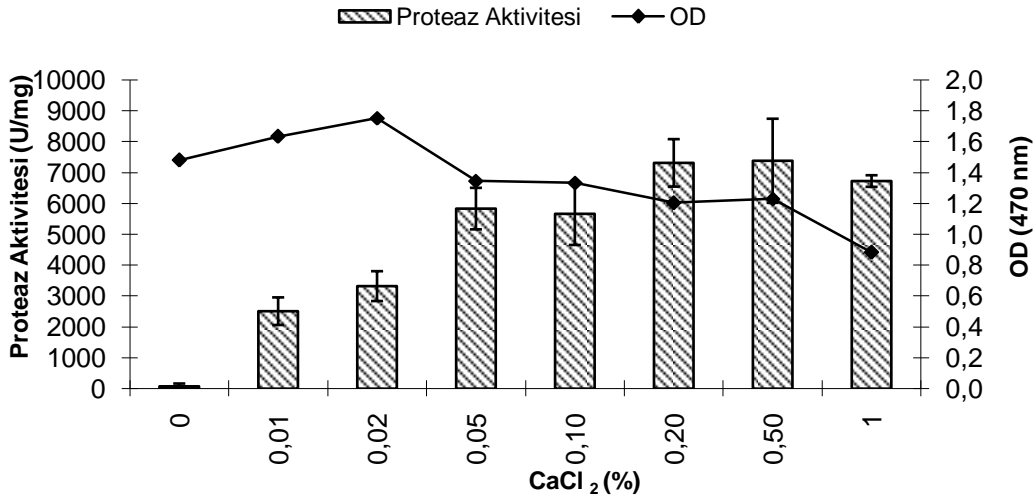


Şekil 4.8. Farklı metal iyonlarının enzim üretimi üzerindeki etkisi

4.1.9. CaCl₂' nin Enzim Üretimi Üzerindeki Etkisi

CaCl₂' nin enzim üretimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacı ile besi yerinde konsantrasyonu %0, %0.01, %0.02, %0.05, %0.1, %0.2, %0.5 ve %1 olacak şekilde BM besi yerine CaCl₂ eklenerek otoklavlanarak bakteri inokülasyonu yapıldı. İnokülasyonu yapılan bakteriler 37°C' de 120 rpm' de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinden sonra elde edilen üst sıvılar ile bakteri OD' si ölçülüp hem proteaz aktivite tayini hem de protein miktar tayini yapılarak spesifik aktivite (U/mg) tespit edilmiştir.

Kontrolle (3327,6 U/mg) karşılaştırıldığında %0.05, %0.1, %0.2, %0.5 ve %1' lik CaCl₂ konsantrasyonlarında enzim aktivitesinde artış gözlemlenmiştir. En yüksek enzim aktivitesi %0.5 (5841.0 U/mg), en düşük ise %0 (76.9 U/mg) CaCl₂ konsantrasyonlarında elde edilmiştir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. CaCl₂'nin enzim üretimi üzerindeki etkisi

4.1.10. Proteaz Enziminin Saflaştırılması

B.cereus KG5 BM besi yerinde üretilerek 24. saatte kültür 10 000 rpm' de 5 dk. santrifüjlenmiştir. Elde edilen üst sıvı (süpernatant) çöktürme ve diyaliz işlemlerine tabi tutulmuştur. Çöktürme ve diyaliz sonrası kısmi saflaştırılan enzimin daha ileri derecede saflaştırılması için proteinleri molekül büyüklüğüne göre ayırma esasına dayanan Sephadex G-75 jel geçirgenlik kolon kromatografisi gerçekleştirilmiştir. *B.cereus* KG5' e ait proteaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi&diyaliz ve Sefadex G-75 jel geçirgenlik kromatografisi ile %23 verimle 13 kat saflaştırılmıştır (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Proteaz enziminin saflaştırma tablosu

Saflaştırma Adımı	Total Protein (mg)	Total Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
Ham Ekstrakt	68.8	520174.0	7557.1	1	10
Çöktürme & Diyaliz	2.7	211862.4	77496.4	10	41
Sefadex G-75 Jel Geçirgenlik Kromatografisi	1.2	118798.8	96941.1	13	23

4.1.11. Bazı Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

B.cereus KG5 BM besi yerinde üretilerek 24. saatte kültür 10 000 rpm' de 5 dk. santrifüjlenmiştir. Elde edilen üst sıvı (süpernatant) enzim aktivite tayininde kullanılmak üzere çöktürme ve diyaliz işlemlerine tabi tutulmuştur.

Bazı metal iyonlarının kısmi olarak saflaştırılan enzimin aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek amacı ile 90 mM' lık CaCl_2 , CuCl_2 , MnCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 ve HgCl_2 'den stok solüsyonlar hazırlandı. Enzim solüsyonu bu metaller ile 15 dk. muamele edilmiştir ve aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Analiz sonuçlarının kontrol ile karşılaştırılması sonucunda CaCl_2 ve MgCl_2 ' in enzim aktivitesinde artışa yol açtığı görülmüştür. 5 mM CaCl_2 enzim aktivitesini %129, 10 mM MgCl_2 ise %89 oranında artmasına yol açtığı gözlenmiştir. CuCl_2 , HgCl_2 ve ZnCl_2 en yüksek inhibisyon etkilerini 10 mM' da sırasıyla %100, %100' den fazla ve %96 oranında enzim aktivitesini inhibe ederek göstermiştir. MnCl_2 ' nin 2 mM' da enzim aktivitesini %29 oranında arttırırken, 10 mM' da %50 oranında inhibe etmiştir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkisi

Metaller	Rölatif Aktivite (%)			
	1 mM	2 mM	5 mM	10 mM
Kontrol	100	100	100	100
CaCl_2	224	242	229	209
MgCl_2	165	161	189	189
CuCl_2	7	10	1	0
ZnCl_2	63	16	5	4
HgCl_2	17	9	2	-
MnCl_2	107	129	89	50

4.1.12. Bazı Metal Şelatör ve Kimyasal Maddelerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

B.cereus KG5 BM besi yerinde üretilerek 24. saatte kültür 10 000 rpm' de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen üst sıvı (süpernatant) enzim aktivite tayininde kullanılmak üzere çöktürme ve diyaliz işlemlerine tabi tutulmuştur.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Kısmi saflaştırılmış enzimın aktivitesinde bazı metal şelatör ve kimyasal maddelerin etkisini belirlemek için EDTA, 1,10-Phenanthroline, PMSF maddelerinden 1-10 mM arasındaki konsantrasyonlar kullanılmıştır. Uygun konsantrasyonlardaki metal şelatör ve kimyasallar enzim solüsyonu ile oda sıcaklığında 15 dk. muamele edilmiştir. 1,10-Phenanthroline metanolde ve PMSF etanolde hazırlandığı için aynı orandaki metanol ve etanolün enzim aktivitesine olan etkisi araştırıldı. EDTA, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda çözüldü. Kontrol ile karşılaştırıldığında EDTA ve 1-10 phenanthroline' in 10 mM' da proteaz enzimini sırasıyla %96 ve %95 değeriyle güçlü bir şekilde inhibe ettiği görülmektedir. PMSF' nin etkisinde ise etanole bağlı bir inhibisyonun olduğu görülmektedir (Çizelge 4.3.).

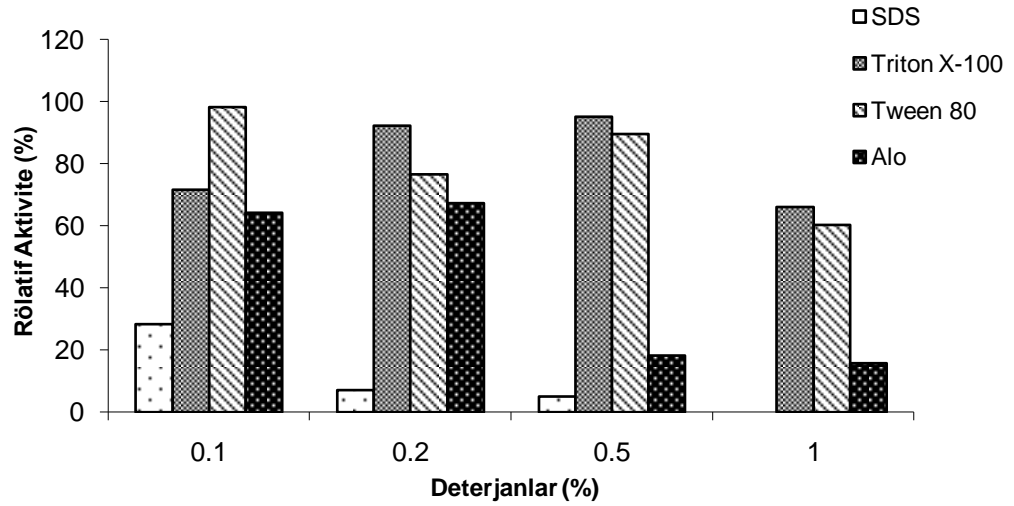
Çizelge 4.3. Bazı metal şelatör ve kimyasal maddelerin enzim aktivitesi üzerindeki etkisi

Metal şelatör ve inhibitörler	Rölatif Aktivite (%)			
	1 mM	2 mM	5 mM	10 mM
Kontrol	100	100	100	100
EDTA	6	5	4	4
PMSF	95	85	58	29
ETANOL	98	93	61	42
1,10-Phenanthroline	6	8	5	5
METANOL	98	95	89	65

4.1.13. Bazı Deterjanların Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Kısmi saflaştırılan enzimde bazı deterjanların etkisini belirlemek için %0.1, %0.2, %0.5 ve %1 oranında deterjan çözeltileri ile enzim solüsyonu 15 dk. pre-inkübasyona bırakılmış ve daha sonra proteaz aktivite tayini yapılmıştır. Deterjan olarak SDS, Triton X-100, Tween-80 ve içeriğinde enzim bulunmayan ticari Alo kullanılmıştır.

Analiz sonuçlarının orijinal enzim aktivitesiyle karşılaştırılması sonucu enzim aktivitesini %1 SDS tamamen, %1 Alo %84 oranında, %0.5 Triton X-100 %5 oranında ve %0.1 Tween-80 %2 oranında inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.10.).

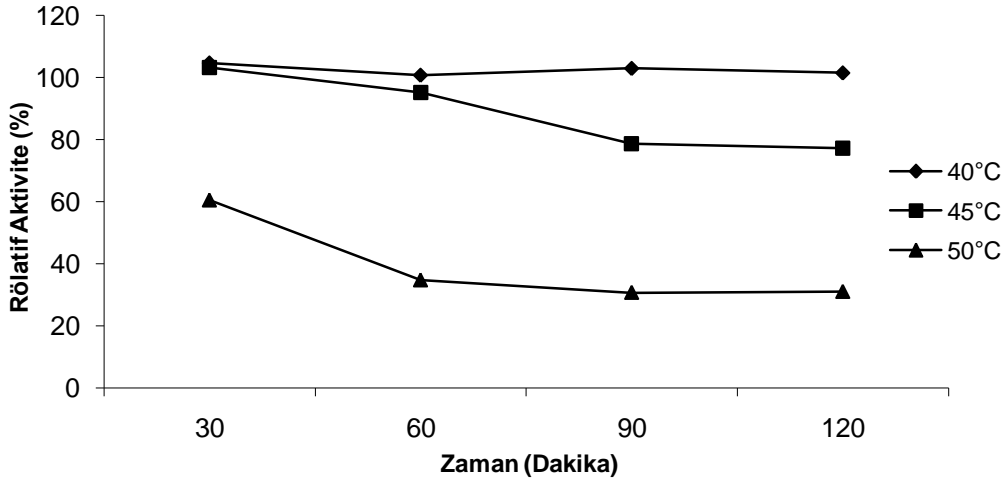


Şekil 4.10. Bazı deterjanların enzim aktivitesi üzerindeki etkisi

4.1.14. Enzimin Termal Stabilitesinin Belirlenmesi

Bakteriler BM besiyerinde üretilerek 24. saatte besi yeri 10 000 rpm' de 5 dk. santrifüjlendi, elde edilen enzim solüsyonunun kısmi saflaştırılması gerçekleştirildi. Elde edilen enzim solüsyonunun termostabilitesinin araştırılması 40–50°C sıcaklık aralıkları kullanılarak yapıldı. CaCl₂' in enzimin termostabilitesine etkisini belirlemek için reaksiyonun toplam hacminde 2 mM CaCl₂ olacak şekilde hazırlanan CaCl₂ stoğundan uygun miktar alınarak enzim solüsyonu ile birlikte 50°C' de 30-120 dk. bekletildi.

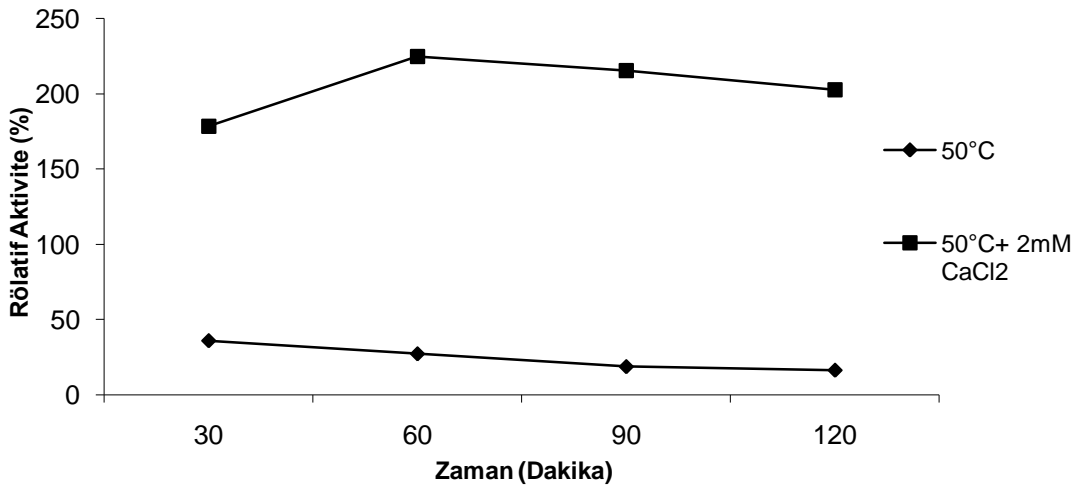
Enzim solüsyonu test edilen her sıcaklıkta 30-120 dk. bekletildi. Daha sonra 250 µl substrat eklendi ve 30 dk. 45°C inkübasyona bırakıldı. 40°C' de 120 dakika sonunda enzimin oldukça stabil olduğu ve aktivitesinin % 101 olduğu tespit edilmiştir. 45°C' de enzim 60 dk. sonunda %95 oranında aktivite gösterirken 120 dk. sonunda kalan enzim aktivitesinin %77 olduğu tespit edilmiştir. 50°C' de ise 120 dk. sonunda kalan enzim aktivitesinin %31 olduğu tespit edilmiştir (şekil 4.11.).



Şekil 4.11. Enzimin termal stabilitesinin belirlenmesi

4.1.15. CaCl₂' nin Termostalibiteye Etkisinin Araştırılması

CaCl₂' nin enzimin termostalibitesine etkisini belirlemek için reaksiyonun toplam hacminde 2 mM CaCl₂ olacak şekilde hazırlanan CaCl₂ stoğundan uygun miktar alınarak enzim solüsyonu ile birlikte 50°C' de 30-120 dk. bekletildi. Enzim solüsyonu test edilen her sıcaklıkta 30-120 dk. bekletildi. Daha sonra 250 µl substrat eklendi ve 30 dk. 45°C' de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyon durdurularak 420 nm' de absorbans değerleri alındı. Kalan aktivitenin hesaplanması amacıyla analiz sonuçları orijinal enzim aktivitesiyle karşılaştırıldı. 50°C' de 2 mM CaCl₂ ile birlikte enzimin 30 dk., 60 dk. ve 120 dk. sonunda sırasıyla kalan aktiviteleri % 125, % 115 ve % 102 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.12.).

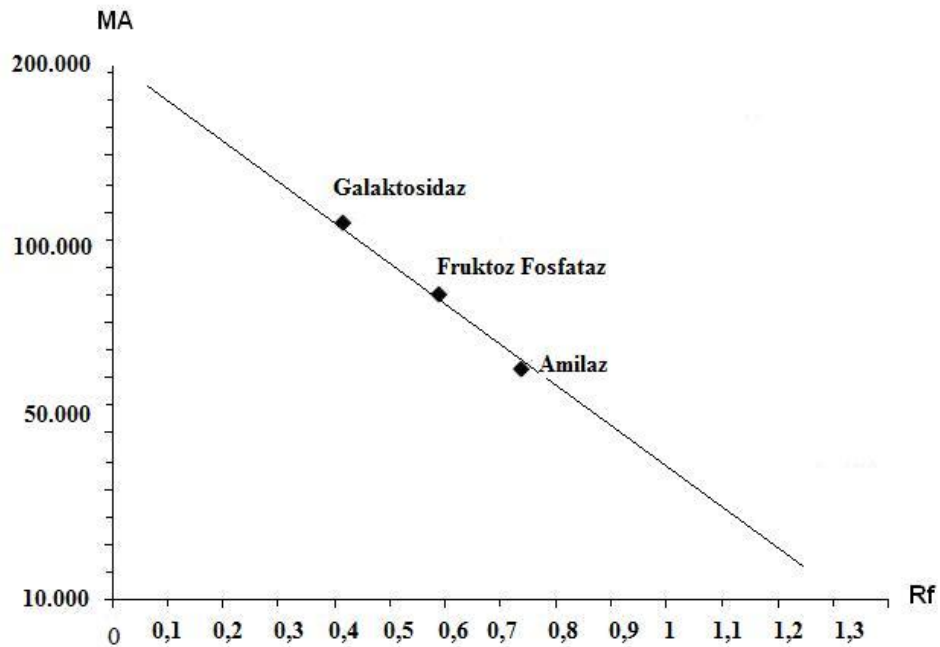
Şekil 4.12. CaCl₂' nin termostalibiteye etkisi

4.1.16. Proteaz Enziminin Elektroforetik Analizi

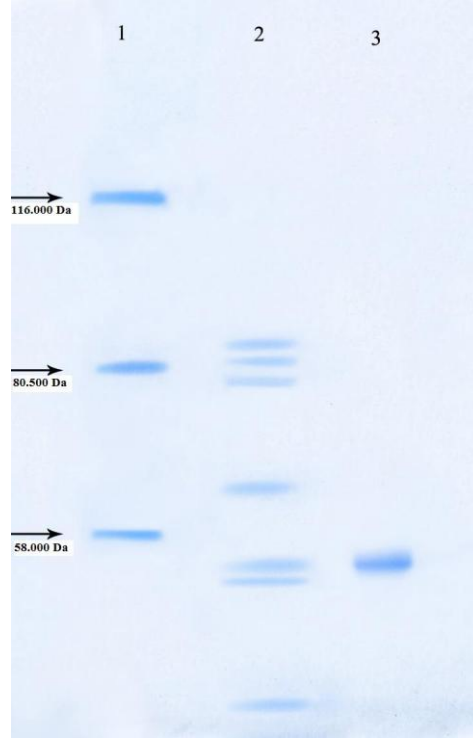
4.1.16.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile Enzimin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Çalışmamızda *B.cereus* KG5' e ait proteazın sefadeks G-75 jel geçirgenlik kromatografisi ile saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Molekül ağırlığı bilinen protein standartları yardımıyla saflaştırılan enzimin yaklaşık molekül ağırlığının tespiti amacıyla jelde oluşturulan kuyucuklara sırasıyla standart protein karışımı (β -galaktozidaz, fruktoz fosfat, α -amilaz) (1), çöktürme&diyaliz (2) ve sefadeks G-75 jel geçirgenlik kromatografisi sonrası (3) elde ettiğimiz örnekler paralel olarak elektroforetik işleme tabi tutulmuştur. Bu işlem sonucunda elektroforeze uygulanan çöktürme&diyaliz ve sephadeks G-75 jel geçirgenlik kromatografisi sonrası protein örnekleri ve standart olarak kullanılan proteinlerin göçü Şekil 4.14.' te görülmektedir.

Şekil 4.13.' te de görüldüğü gibi elektroforezde yürütülen örneklerin R_f değerleri hesaplanarak enzimin molekül ağırlığının yaklaşık olarak 48 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.13. Standart proteinlerin R_f değerleri yardımıyla proteaz enziminin molekül ağırlığının belirlenmesi



Şekil 4.14. SDS-PAGE (1:standart protein karışımı (β -galaktozidaz, fruktoz fosfat, α -amilaz), 2:çöktürme&diyaliz, 3:sefadeks G-75 jel geçirgenlik kromatografisi sonrası)

4.1.16.2. %0.1 Jelatin İçeren Non-denatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Zimogram Analizi

Sefadeks G-75 jel geçirgenlik kromatografisi ile saflaştırılan proteaz enziminin varlığı tespit etmek amacıyla jelde oluşturulan kuyucuklara sırasıyla pozitif kontrol olarak kullanılan *Bacillus polymxa*' ya ait proteaz enzimi (A), ham ekstrakt (ham özüt) (B), çöktürme&diyaliz (C), sefadeks G-75 jel geçirgenlik kromatografisi sonrası (D) elde edilen örnekler örnekler paralel olarak elektroforetik işleme tabi tutulmuştur. Bu işlem sonucunda elektroforeze uygulanan ham ekstrakt, çöktürme&diyaliz ve sefadeks G-75 jel geçirgenlik kromatografisi sonrası protein örneklerinin ve pozitif kontrol olarak kullanılan *Bacillus polymxa*' ya ait proteaz enziminin göçü Şekil 4.15.' te görülmektedir.

Şekil 4.15.' te g3r3len proteaz enziminin bulunduğu yer, enzimin jelatini parçalamasından dolayı diğer b3lgelere oranla daha açık renkte g3r3necektir ki bu da proteaz enziminin varlığını teyit etmektedir (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. %0.1 Jelatin içeren non-denat3re jel elektroforezi (A:*Bacillus polymxa*' ya ait proteaz enzimi, B:ham ekstrakt, C:3kt3rme&diyaliz, D:sefadeks G-75 jel geçirgenlik kromatografisi sonrası)

4.2. TARTIŞMA

Reyhan Gül Güven tarafından Bingöl Kös kaplıcasından izole edilen *Bacillus cereus* KG5' in katı besi yerinde yapılan kazein hidrolaz testi sonucunda besi yerindeki kazeini parçalamak için yüksek miktarda proteaz sentezlemesinden dolayı çalışmamızda kullanılmıştır (Gül Güven 2007).

Çalışmamızda enzimin optimum pH ve sıcaklık değerini belirlemek amacı ile sırasıyla 6.0-11.0 ve 20-70°C aralıkları test edilmiştir. Şekil 4.1.' de görüldüğü gibi enzimin optimum sıcaklık değeri 40-45°C arası olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.2.' de görüldüğü gibi enzim pH 7.0-7.5 aralığında optimuma yakın aktivite göstermektedir. Optimum pH ise 7.0 olarak tespit edilmiştir. Sandhya ve ark. (2005), nötral pH' da hidrofobik aminoasit bağlarını hidrolizleme işleminde spesifik fonksiyona sahip olduğu için nötral proteazların yiyecek endüstrisi için çok önemli olduğu ve böylece gıda protein hidrolizatlarının acısının azaltıldığını belirtmişlerdir. Nötral proteaz uygulamasının pirinç nişastası izolasyonunda etkili olabileceğini bulmuşlardır. Çalıştığımız enzimin pH 7.0-7.5 aralığında optimuma yakın aktivite göstermesi nötral proteaz olduğu ve çeşitli endüstri dallarında kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir.

Rifaat ve ark. (2005), *Streotomyces microflavus*' ta, Zambare ve ark. (2010), *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327' de, Vijayanand ve ark. (2010), haloalkalifilik *Halobacterium* sp' de, ve Wu ve ark. (2011), *Lepista nuda*' da proteaz enziminin optimum pH değerinin 7.0 olduğunu belirtmişlerdir.

Proteaz enziminin sırasıyla optimum pH ve sıcaklık değerini; Motta ve Punj (1998), *Bacillus polymxa*' da 7.5, 50°C, Banik ve Prakash (2004), *Bacillus cereus*' ta 10.5, 50°C, Sousa ve ark. (2007), *Bacillus cereus*' ta 7.0 45°C , Vijayanand ve ark. (2010), haloalkalifilik *Halobacterium* sp' de 7.0, 40°C, Kebabcı ve Cihangir (2011), *Bacillus cereus*' ta 7.0-9.0 arası ve 50°C olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızda enzim üretimi üzerine farklı besi yerlerinin etkisi araştırılmıştır. Bu amaç ile içerikleri farklı olan NB, BM ve GPM besi yerleri kullanılmıştır. Şekil 4.3.' te görüldüğü gibi BM besi yerinde proteaz üretimi en yüksek değerde gözlenmiştir. Bu durum BM besi yerinin içerik olarak proteaz enzim üretimi için yeterli olması şeklinde

açıklanabilir. Kullanılan diğer besi yerlerinin enzim üretimi açısından fazla olandan en aza olana doğru NB>GPM olarak tespit edilmiştir. Abidi ve ark.(2008), mikroorganizmalardan proteazların üretiminin büyük ölçüde özellikle karbon ve azot kaynakları gibi besi yeri komponentleri ve sıcaklık, pH, inkübasyon zamanı, inoküle yoğunluğu gibi fiziksel faktörler ile etkilendiğini belirtmişlerdir. Aynı zamanda besi yerindeki karbon kaynağının hem bakteri çoğalmasını hem de ekstraselüler proteazların üretimini etkilediğini de belirtmişlerdir.

Banik ve Prakash (2004), *Bacillus cereus*' un ve Frikha ve ark. (2005), *Bacillus cereus* BG1' in maksimum proteaz üretimi için en uygun kültür ortamının farklı oranlarda CaCl₂ içerdiğini belirtirken, Genckal ve Tari (2006), alkalifilik *Bacillus* sp' den alkalın proteaz üretimi için besi yerinin %0.5 yeast ekstrakt içerdiğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda bakterinin BM besi yerinde 3-60. saatlerindeki inkübasyon sürelerinde zamana bağlı proteaz aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 4.4.' te görüldüğü gibi maksimum enzim üretimi 24. saatte tespit edilmiştir. Bakteri üretiminin hızlı olduğu dönemde enzim üretiminde fazla olduğu görülmüştür. Bakteri üreme hızında düşüş gözlenmesiyle enzim üretiminde de azalma gözlenmeye başlanmıştır.

Towatana ve ark. (1999), alkalifilik ve termofilik *Bacillus* sp. PS719' da, Mehrotra ve ark. (1999), izole edilen *Bacillus* türlerinde, Johnvesly ve Naik (2001), termofilik ve alkalifik *Bacillus* JB-99' da, Rahman ve ark. (2003), *Bacillus stearothermophilus* F1' de, Sousa ve ark. (2007), *Bacillus cereus*' ta, Shafee ve ark. (2005), *Bacillus cereus*' ta, Haddar ve ark. (2010), *Bacillus mojavensis* A21' de ve Shivanand ve Jarayaman (2009), *Bacillus aquimaris* VITP4' te proteaz enziminin üretimi için en uygun inkübasyon süresini 24 saat olarak belirlerken, Ghorbel ve ark. (2003), *Bacillus cereus* BG1' de ve Yossan ve ark. (2006), *Bacillus megaterium*' da 48 saat, Nilegaonkar ve ark. (2007), *Bacillus cereus* MCM B-326' da ise 36 saat olarak belirlemişlerdir.

Çalışmamızda enzim üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisini belirlemek amacı ile BM besi yeri ortamından %0.2 yeast ekstrakt ve %1 beef ekstrakt çıkartılarak %1.2 oranında farklı azot kaynakları eklenerek proteaz aktivite tayinine bakılmıştır. Şekil 4.5.' te de görüldüğü gibi azot kaynaklarından yeast ekstrakt ve ürede kontrole

göre daha yüksek aktivite elde edilmiştir. Amonyum sülfat, amonyum klorür ve jelatine enzim aktivitesinde daha zayıf bir artış gözlenirken, tripton ve pepton kullanıldığında kontrole göre daha düşük bir enzim aktivitesi elde edilmiştir. Kontrole karşılaştırıldığında en düşük enzim aktivitesi ise peptonda tespit edilmiştir. Enzim üretiminin yeast ekstrakta ve ürede artması, bakterinin bu azot kaynaklarını kullanarak enzim sentezini arttırdığı şeklinde düşünülebilir.

Frikha ve ark. (2005), *Bacillus cereus* BG1' in azot kaynağı olarak %0.2 oranında yeast ekstrat kullanıldığında proteaz üretiminin önemli miktarlarda arttığını tespit etmişlerdir. Patel ve ark. (2005), haloalkalifilik *Bacillus* sp' in azot kaynağı olarak jelatin ve kazamino asit kullanıldığında proteaz üretiminin arttığını ve tripton, ve soya pepton kullanıldığında ise proteaz üretiminin yüksek oranda azaldığını belirtmişlerdir. Shafee ve ark. (2005), *Bacillus cereus* 146' in organik azot ve inorganik azot kaynaklarından sırasıyla beef eksrakt ve üre kullanıldığında en yüksek proteaz aktivitesinin elde edildiğini belirtmişlerdir. Nilegaonkar ve ark. (2007), *Bacillus cereus* MCM B-326' in azot kaynağı olarak %1 soya küspesi kullanıldığında en yüksek proteaz aktivitesinin elde edildiğini belirtmişlerdir. Abidi ve ark. (2008), *Botrytis cinerea*' in azot kaynağı olarak yeast ekstrakt ve pepton karışımı kullanıldığında proteaz üretiminin arttığını ve üre kullanıldığında ise proteaz üretimini inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda enzim üretimi üzerine farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarının etkisini belirlemek amacı ile BM besi yerinden beef ekstrakt çıkarılarak farklı konsantrasyonlarda yeast ekstrakt içeren besi yerlerinde inkübasyon sonrası proteaz aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 4.6.' da görüldüğü gibi kontrole (6476 U/mg) karşılaştırıldığında %0.5 (156.37 U/mg), %1 (84285 U/mg), %1.5 (32414 U/mg), %2 (32414 U/mg), ve %3 (12350 U/mg)' teki konsantrasyonlarının tamamında enzim aktivitesinde artış gözlemlenmiştir. En yüksek enzim aktivitesi 156.37 U/mg değeri ile %0.5, en düşük aktivite ise 12350 U/mg değeri ile %3 yeast konsantrasyonunda elde edilmiştir. Besi yeri ortamına yeast ekstraktın eklendiğinde bakterinin enzim sentezi sırasında yeast ekstraktı kullanarak enzim sentezini arttırması ile açıklanabilir. Johnvesly ve Naik (2001), yeast ekstraktın %0.1-0.5 konsantrasyonları enzim sekresyonuna izin verirken organik azot kaynaklarının yüksek konsantrasyonlarının (%1 w/v) proteaz sekresyonunu repress ettiğini belirtmişlerdir.

Farklı azot kaynaklarından Banerjee ve ark. (1999), *Bacillus brevis*' in %1 soya tozunun yanısıra %1 yeast ekstrakt kullanıldığında da, Johnvesly ve Naik (2001), termofilik ve alkalifik *Bacillus* JB-99' da %1 NaNO₃ ve %0.4 yeast ekstrakt kullanıldığında, Frikha ve ark. (2005), *Bacillus cereus* BG1' in besi yerine %0.2 oranında yeast ekstrakt eklendiğinde maksimum proteaz üretiminin sağlandığını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda enzim üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisini belirlemek amacı ile BM besi yeri ortamından %2 nişasta çıkarılarak %2 oranında farklı karbon kaynakları eklenerek proteaz aktivite tayinine bakılmıştır. Şekil 4.7.' de görüldüğü gibi kontrolle (5399.9 U/mg) karşılaştırıldığında galaktoz (5279.7 U/mg), gliserol (772.4 U/mg), sükroz (561.4 U/mg), maltoz (292.6 U/mg) ve fruktozda (297.5 U/mg) daha düşük aktivite elde edilmiştir. En yüksek ve en düşük aktivite sırasıyla laktozda (6485.2 U/mg) ve glukozda (21.1 U/mg) elde edilmiştir. Enzim üretiminin laktoz ve galaktozda artması, bakterinin bu karbon kaynaklarını kullanarak enzim sentezini arttırdığı şeklinde düşünülebilir. Glukozun enzim sentezini neredeyse represe etmesi katabolik bir represyonun olduğunun göstergesi olarak yorumlanabilir.

Mabrouk ve ark. (1999), *Bacillus licheniformis* ATCC 21415' in farklı karbon kaynaklarından %4 laktoz ve %1.5 glukoz karışımını kullandığında, Banerjee ve ark. (1999), *Bacillus brevis*' in, Oh ve ark. (2000), *Pseudomonas aeruginosa* K-187' nin ve Abdelnasser ve ark. (2009), alkalifik *Bacillus halodurans*' in laktozu kullandığında maksimum proteaz üretiminin sağlandığını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda olduğu gibi Johnvesly ve Naik (2001), termofilik ve alkalifik *Bacillus* sp. JB-99' da ve Vijayanand ve ark. (2010) da haloalkalifik *Halobacterium* sp. de proteaz enzim üretiminin glukoz tarafından represe edildiğini tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda %0.5 oranında CaCO₃, CaCl₂, NaCl, MgCl₂ ve MnCl₂ gibi metal iyonlarının enzim üretimi üzerine etkisi araştırıldı. Şekil 4.8.' de görüldüğü gibi kontrol (3672 U/mg) ile karşılaştırıldığında besi yerine %0.5 oranında CaCl₂ (7029 U/mg)' nin eklenmesi enzim üretimini yaklaşık 2 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında CaCO₃' ün enzim üretimini arttırdığını, MgCl₂ ise enzim üretiminde bir azalmaya neden olmuştur. NaCl (115 U/mg) ve MnCl₂ (83.6 U/mg)' nin kontrole göre enzim üretimini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Enzim üretiminin CaCO₃

ve CaCl_2 ' de artması, bakterinin özellikle Ca^{+2} iyonunu kullanarak enzim sentezini arttırdığı şeklinde düşünülebilir.

Çalışmamızda CaCl_2 ' nin enzim üretimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacı ile %0, %0.01, %0.02, %0.05, %0.1, %0.2, %0.5 ve %1 CaCl_2 ' nin enzim üretimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Şekil 4.9.' da da görüldüğü gibi kontrolle (3327.6 U/mg) karşılaştırıldığında %0.05, %0.1, %0.2, %0.5 ve %1 CaCl_2 konsantrasyonlarında enzim aktivitesinde artış gözlemlenmiştir. En yüksek enzim aktivitesi 5841.0 U/mg spesifik aktivite değeriyle %0.5, en düşük ise 76.09 U/mg spesifik aktivite değeriyle %0 CaCl_2 konsantrasyonlarında elde edilmiştir. Besiyerine %0.5 oranında CaCl_2 eklenmesi kontrole göre enzim üretimini yaklaşık 2 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Çalışılan enzimin üretimi için CaCl_2 gerekli değildir ama maksimum enzim üretimi için CaCl_2 ' e ihtiyaç vardır. Enzim üretiminin %0.5 CaCl_2 ' de artması, bakterinin özellikle Ca^{+2} iyonunu kullanarak enzim sentezini arttırdığı ve enzimin aktif konformasyonunun Ca^{+2} iyonu tarafından stabilize edildiği şeklinde düşünülebilir.

Enzim üretiminde kalsiyumun biyolojik rolünü araştırmak için birçok çalışma yürütülmüştür.

Secades ve ark. (2001), *Flavobacterium psychrophilum*' un proteaz üretim seviyesinin spesifik olarak CaCl_2 konsantrasyonuna bağlı olduğunu belirtmişlerdir.

Frikha ve ark. (2005), proteaz sentezinin artışını açıklayabilmek için 3 hipotez kurmuşlardır:

1. Hipotez: Ca^{+2} enzim sekresyonu (salgılanması) için gerekli olabilir.
2. Hipotez: kalsiyum tarafından enzim üretimi indüklenebilir.
3. Hipotez: enzim sentezinden sonra iyonik kalsiyum (Ca^{+2}) tarafından enzimin aktif konformasyonunu stabilize edilebilir.

Suş, besi yerinde CaCl_2 eksikliğinde çoğaldığında hücrelerin içinde aktivitenin belirlenmediği için 1. Hipotez olası görünmüyor. Dahası, suşlar MgCl_2 içeren besi yerinde ürediğinde kültür süpernatantında ve hücrenin içinde aktivite belirlenmemiştir. Bakteriler CaCl_2 içeren besi ortamında kültüre alındığında süpernatantta %88' den fazla aktivite belirlenmiştir.

Secades ve ark. (2001), bir balık patojeni olan *Flavobacterium psychrophilum*' dan metaloproteazın indüklenmesinin sadece üreme ile olduğunu, statik fazda kalsiyumun eklenmesi enzim üretimini indüklemediğini belirtmişlerdir.

Frikha ve ark. (2005), mikroorganizmanın üremesinin erken aşamalarından üssel fazın katlanarak artan değerlerle sonunda ve statik fazda bile artarak devam eden aktivite belirlendiği için proteazın biyosentezinin üreme ile ilgili olduğunu belirtmişlerdir.

Başlangıçta besi yerine CaCl_2 'nin eklenmesi ile karşılaştırıldığında üssel ve üreme (4. Saat) (log) fazında besi yerine CaCl_2 eklendiğinde proteaz üretimi %30 arttığını belirtmişlerdir. Fakat statik fazda CaCl_2 'nin eklenmesi enzim oluşumunda önemli bir azalmaya neden olduğunu ve besi yerinde CaCl_2 'nin eksikliğinde aktivitenin olmadığını belirtmişlerdir. Böylece proteaz üretiminin kalsiyum ile stimule edildiğine ilişkin hipotezin de hükümsüz görüldüğünü belirtmişlerdir. Bu sonuçlardan enzimin termoaktivite ve termostabilitesi CaCl_2 'nin varlığında oldukça arttığını ve ihtiyaç duyulan enzim aktivitesinin moleküler konformasyonunu korumak için CaCl_2 'nin gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Diğer yandan EDTA gibi metal şelatörleri ile muamele edilerek inhibe edilen enzim aktivitesi kalsiyum iyonlarının (2-50 mM) eklenmesi ile onarılmadığı enzimin tersiyer yapısının şelatlayıcı metal iyonları tarafından geri dönüşümsüz bir şekilde bozulduğunu destekler. Bu sonuçlar *B. cereus* proteazının üç boyutlu yapısında Ca^{+2} bağlayıcı 4 bölge olduğunu göstermektedir. Besiyerinde farklı CaCl_2 konsantrasyonlarından %0.2 CaCl_2 'nin enzim üretimini önemli miktarda arttırdığını belirtmişlerdir.

Rahman ve ark. (2003), *B. stearothermophilus* F1' de kalsiyum ve stronsiyum (Sr) iyonlarının proteaz üretimi yaklaşık 2 kat arttığını belirtmişlerdir. Kalsiyumun proteaz üretimi üzerindeki etkisini araştırırken CaCl_2 'nin enzim oluşumu için gerekli olmadığını ve fakat 4.5 mM CaCl_2 'nin besiyerine eklenmesi verimi arttırdığını belirtmişlerdir. Aynı zamanda 5.5, 6 ve 6.5 mM konsantrasyonlarında CaCl_2 'nin enzim üretimini azalttığı da belirtilmiştir. Mabrouk ve ark. (1999), *Bacillus licheniformis* ATCC 21415' te bazı metal iyonlarını besi yerine ekleyerek proteaz üretimi üzerinde etkilerini araştırırken %0.07 CaCl_2 enzim aktivitesinde kontrole göre %26.6 artış gösterdiğini belirtmişlerdir.

Shafee ve ark. (2005), *Bacillus cereus* 146' ın. inkübasyonun 24. saatinde maksimum enzim üretiminin Mn^{+2} ve Ca^{+2} iyonlarında tespit edildiğini ve test edilen ağır metallere Cu^{+2} ve Li^{+1} iyonlarının inhibisyona neden olduğunu belirtmişlerdir. Besi yerine Ca^{+2} , Cu^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının eklenmesi sadece inkübasyonun 48. saatinde yüksek proteaz üretimine neden olduğunu belirtmişlerdir. Frikha ve ark. (2005) ise *Bacillus cereus* BG1' de etkisi araştırılan inorganik tuzlardan sadece $CaCl_2$ enzim üretiminde (3.800 U/ mL) güçlü bir artışa neden olduğunu ve $MgSO_4$ (28 U/ mL)' ün ise çok düşük seviyede bir enzim üretimi sağladığı belirtmişlerdir. Aynı zamanda $CaCl_2$ ve $MgSO_4$ ' ün bakteri üremesini arttırdığını da belirtmişlerdir. $ZnSO_4$, $CuSO_4$ ve $MnSO_4$ ' ün üremeyi inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Zambare ve ark. (2010), *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327' nin besisi yerine %0.3 oranında $FeSO_4$, $MnSO_4$ ve $ZnSO_4$ eklendiğinde kontrolle karşılaştırıldığında enzim üretimini azalmaya neden olduklarını belirtmişlerdir. %0.3 kalsiyum iyonu ise proteaz üretimini ne arttırdığını ne de baskıladığını bunun da enzimin kalsiyumdan bağımsız olduğunun anlamına geldiğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda kısmi saflaştırılan enzimde bazı metaller, metal şelatörleri ve kimyasal maddeler ve deterjanların etkisi incelenmiştir. Çizelge 4.1.' de bazı metallerin enzim aktivitesine olan etkileri görülmektedir. $CaCl_2$, $MgCl_2$ ve $MnCl_2$ enzim aktivitesinde artışa yol açmıştır. 2 mM $CaCl_2$ enzim aktivitesini %142.5 ve 10 mM $MgCl_2$ ise enzim aktivitesinin %89.2 mM $MnCl_2$ ise aktivitenin %29 oranında artmasına sebep olmuştur. 10 mM $CuCl_2$, $HgCl_2$ ve $ZnCl_2$ ise enzim aktivitesini sırasıyla %100, %100' den fazla ve %96 oranında inhibe ettiği tespit edildi. Bu durum çalıştığımız enzimin Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarına bağlı bir enzim olduğu şeklinde açıklanabilir.

Adinarayana ve ark. (2003), *B.subtilis* PE-11' in salgıladığı kısmen saflaştırılmış enzimin aktivitesini 5 mM $CaCl_2$ ve $MgCl_2$ iyonlarının sırasıyla %35 ve %16 arttırdığını belirtmişlerdir. Ghorbel ve ark. (2003), 5mM $CaCl_2$, 5 mM Mg ve Mn iyonlarının *B.cereus* BG1' e ait proteaz aktivitesini sırasıyla %350, %185, % 57 oranında arttırırken Cu ve Zn iyonlarının da sırasıyla %65, % 72 oranında inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Nascimento ve Martins (2004), termofilik *Bacillus sp.*'e ait ekstraselüler proteaz aktivitesinin $HgCl_2$, $CuCl_2$, $ZnCl_2$ ve KCl tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiğini belirtmişlerdir. $HgCl_2$ ' nin 1 mM konsantrasyonda bile enzimi tamamen inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Nilegaonkar ve ark. (2007), *Bacillus cereus* MCM B-326' da proteaz

aktivitesinin Cu^{+2} , Zn^{+2} ve Mg^{+2} iyonları tarafından dikkat çekici bir şekilde (%80-93), Na^+ , Fe^+ ve Mn^{+2} iyonları tarafından ise kısmen (%30-60) inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Devi ve ark. (2008), *Aspergillus niger*' e ait alkalın proteaz enzim aktivitesinin 5 mM Cu^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} iyonları tarafından inhibe edilirken, 5mM CaCl_2 'nin aktiviteyi arttırdığını belirtmişlerdir. Hmidet ve ark. (2009), *Bacillus licheniformis* NH1' e ait alkalın proteaz enzim aktivitesini 5 mM Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Cu^{+2} iyonları sırasıyla %24, %14 ve %11 oranında arttırdığını belirtmişlerdir. Zn^{+2} , Ba^{+2} ve Cu^{+2} iyonları ise aktiviteyi sırasıyla %3, %9 ve %35 oranında inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Çizelge 4.2.' de bazı kimyasal maddelerin ve metal şelatörlerin enzim aktivitesine olan etkileri görülmektedir. Kontrol ile karşılaştırıldığında EDTA ve 1,10-phenantroline' in 1 mM-10 mM arasında proteaz enzimini güçlü bir şekilde inhibe ettiği görülmektedir. PMSF' nin etkisinde ise etanole bağlı bir inhibisyonun olduğu görülmektedir. Çalışılan enzimin PMSF ile inhibe olmaması serin proteaz olmadığına göstergesidir. Çalışılan proteaz enziminin EDTA ve 1,10-phenantroline ile inhibe olması metaloproteaz olduğunun göstergesidir.

Motta ve Punj (1998), *Bacillus polymxa*' ya, Kim ve ark. (2001), *Bacillus cereus* KKTC 3674' e, Secades ve ark. (2001), bir balık patojeni olan *Flavobacterium psychrophilum*' a, Devi ve ark. (2008), *Aspergillus niger*' e, Wang ve ark. (2009), *B.cereus* TKU006' a, Doddapaneni ve ark. (2009), *Bacillus cereus*' a, Wu ve ark. (2011), bir mantar türü olan *Lepista nuda*' ya ait proteaz enziminin EDTA ile inhibe olması sebebiyle birer metaloproteaz olduğunu belirtmişlerdir.

Şekil 4.10.' da deterjanların farklı konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri görülmektedir. Kontrolle karşılaştırıldığında sonucu enzim aktivitesini %1 SDS' nin tamamen, %1 Alo' nun %84 oranında, %0.5 Triton X-100' ün %5 oranında ve %0.1 Tween-80' in %2 oranında inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Bu durum Triton X-100 ve Tween-80 gibi nötral deterjanların enzimimizi çok önemli oranda inhibe etmediği şeklinde açıklanabilir.

Dodia ve ark. (2008); Haloalkalifilik bacterium sp. AH-6' ya ait seri alkalın proteazın %0.05 SDS' in varlığında enzim aktivitesi % 2 oranında azalırken,%0.2 SDS' nin varlığında aktivite tamamen inhibe olmuştur. %0.05 TritonX-100' ün varlığında enzim aktivitesi %23 artarken %0.2 TritonX-100' ün varlığında aktivite tamamen inhibe

olmuştur. %0.1 Tween-80 varlığında enzim aktivitesi %35 artarken, %2 Tween-80 varlığında aktivite tamamen inhibe olmuştur. Wang ve ark.(2009) ise *B.cereus*'a TKU006 ' a ait proteaz enzim aktivitesini %2 Tween-20, Tween-40, Triton X-100 ve 1 mM SDS varlığında sırasıyla %61, %60, %73 ve % 100 koruduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızda kısmen saflaştırılmış enzimde zamana bağlı sıcaklık stabilitesinin belirlenebilmesi amacı ile 40°C, 45°C ve 50°C sıcaklık değerlerinde sadece enzim kullanılarak 30 ile 120 dk. arasında ön inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra proteaz aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 4.11.' de görüldüğü gibi sadece enzim kullanılarak yapılan termostabilite analizinde 40°C' de 120 dakika sonunda enzimin oldukça stabil olduğu ve enzim aktivitesinin % 1 oranında arttığı tespit edilmiştir. 45°C' de enzim 60 dk. sonunda %95 oranında aktivite gösterirken 120 dk. sonunda kalan enzim aktivitesinin %77 olduğu tespit edilmiştir. 50°C' de ise 120 dk. sonunda kalan enzim aktivitesinin %31 olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda enzimin sıcaklığa karşı dayanıklılığını arttırmak için 2 mM CaCl₂' nin enzimin termal stabilitesine olan etkisi araştırılmıştır. Bunun için enzim 2 mM CaCl₂ ile birlikte 50°C' de 30 ile 120 dk. arasında ön inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra proteaz aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 4.12.' de 2 mM CaCl₂' nin enzimin termal stabilitesine olan etkisi görülmektedir. 50°C' de 2 mM CaCl₂ ile birlikte enzimin 30 dk., 60 dk. ve 120 dk. sonunda sırasıyla kalan aktivitelerinin %125, %115 ve %102 olarak tespit edilmiştir. CaCl₂ enzimin termostabilitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Bu durum yüksek sıcaklık gerektiren biyoteknolojik uygulamalarda enzimin, biyoteknolojik olarak kullanılabilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Ghorbel ve ark. (2003), *B.cereus* BG1' e ait proteaz enzimin optimum sıcaklığının Ca⁺² iyonu yokluğunda 50°C iken 2 mM Ca⁺² iyonu varlığında 60°C olduğunu ve enzimin Ca⁺² iyonu yokluğunda 55°C' de 15 dk. tutulduğunda tamamen inhibe olduğunu belirtmişlerdir. Adinarayana ve ark. (2003), *B.subtilis* PE-11' e ait termostabil serin alkalın proteaz enziminin 10 mM CaCl₂ varlığında 60°C' de 350 dk. inkübasyondan sonra bile %100 stabil olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızda *B.cereus* KG5' e ait proteaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi&diyaliz ve sefadeks G-75 jel geçirgenlik kromatografisi ile %23 verimle 13 kat saflaştırılmıştır (Çizelge 4.1.). Adinarayana ve ark. (2003), *Bacillus subtilis* PE-11'

e ait proteaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ve sefadeks G-200 jel geçirgenlik kromatografisi %7.5 verimle 21 kat saflaştırmışlardır. Beg ve ark. (2003), *Bacillus mojavensis*' e ait alkalın serin proteaz enzimini Q-sefarozyon anyon değişim kromatografisi ile %37' den fazla verimle 17 kat saflaştırmışlardır. Frikha ve ark. (2005), *B.cereus* BG1' e ait proteaz enzimini ultrafiltrasyon, sıcaklık uygulaması, sefaril S-200 jel filtrasyonu, DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ve son olarak ikinci bir sefaril S-200 jel filtrasyonu ile spesifik aktivitesinde 39 kat artış ve %23 verimle saflaştırmışlardır. Doddapaneni ve ark. (2009), *B.cereus*' a ait proteaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi ile %49 verimle 1.8 kat saflaştırmışlardır. Almas ve ark. (2009), *Bacillus* strain SAL1' e ait alkalın proteaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE sefakril iyon değişim kromatografisi ve fenil sefarozyon hidrofobik etkileşim kromatografisi kombinasyonu ile 11.8 kat saflaştırmışlardır. Kazan (2010), *Bacillus marmariensis* GMBE 72' ye ait alkalın proteaz enziminin amonyum sülfat çöktürmesi&diyaliz ve DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ile %31.10 verimle 17 kat saflaştırıldığı belirtilmiştir. Xu ve ark. (2010), *B.cereus* WQ9-2' e ait proteaz enzimini etanol çöktürmesi ve DEAE-sefarozyon iyon değişim kromatografisi kombinasyonu ile %57' den fazla verimle 3.8 kat saflaştırmışlardır. Shankar ve ark. (2011), bir fungal izolat olan *Beauveria* sp. MTCC 5184' e ait alkalın proteaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi %38.6 verimle 10.2 kat saflaştırmışlardır.

Çalışmamızda *B.cereus* KG5 tarafından salgılanan proteaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi&diyaliz ve Sefadeks G-75 jel geçirgenlik kromatografisi ile saflaştırılmıştır. 2 basamakta saflaştırılan proteaz enziminin varlığını teyit etmek amacıyla %0.1 jelatin içeren non-denatüre poliakrilamid jel elektroforezi (şekil 4.15.) ve enzimin yaklaşık olarak molekül ağırlığını belirlemek amacıyla sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) (Şekil 4.14.) yapılmıştır. SDS-PAGE' nin yardımıyla proteazın molekül ağırlığının yaklaşık olarak 48 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir.

Towatana ve ark. (1999), alkalifilik ve termofilik *Bacillus* sp. PS719' a, Sousa ve ark. (2007), *Bacillus cereus*' a, Nilegaonkar ve ark. (2007), *Bacillus cereus* MCM B-326' ya, Wang ve ark. (2009), *B.cereus* TKU006' a ait proteaz enzimlerinin molekül ağırlıklarını sırasıyla 42, 45.6, 45 ve 39 kDa olduğunu tespit etmişlerdir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Biyoteknolojinin klasik tanımı kısaca "**Biyokatalizatörlerin teknik boyutta kullanımı**" dır. Konuya bu boyutta yaklaşıldığında bir yandan olağanüstü bir seçimlilikte etki gösteren biyokatalizatörlerin (enzimler ve hücreler) endüstriyel uygulamalara elverişli immobilize formlarının geliştirilmesi, diğer yandan enstrümantasyon alanındaki teknolojik gelişmeler bugüne kadar kimyanın etkinlik alanına giren birçok prosesin yerini daha ekonomik olan biyoproseslere bırakması sonucunu doğurmuştur (Telefoncu ve Pazarlıoğlu 1995).

Bu çalışmada Bingöl Kös sıcak su kaynağından izole edilen *Bacillus cereus* KG5' in salgıladığı ekstrasellüler proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Enzimin optimum sıcaklığı ve pH değeri sırasıyla 40-45°C ve 7.0 olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda proteaz üretiminin 3. saatten 24. saate artarak devam ettiği gözlemlenmiştir. Maksimum enzim üretimi 24. saatte elde edilmiştir.

Çalışmamızda farklı besi yerlerinin enzim üretimi üzerindeki etkisi incelendiğinde BM besi yerinde proteaz üretiminin maksimum değerde olduğu tespit edilmiştir.

%1.2 oranındaki azot kaynaklarının enzim üretimi üzerindeki etkisi incelendiğinde yeast ekstrakt ve ürenin enzim üretimini kontrole göre arttırdığı tespit edilmiştir.

Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarının enzim üretimi üzerindeki etkisi incelendiğinde %0.5 yeast ekstraktın enzim üretimini kontrole göre yaklaşık 25 kat arttırdığı tespit edilmiştir.

%2 oranındaki karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerindeki etkisi incelendiğinde kontrole göre laktozun enzim üretimini arttırırken glukozun ise üretimi önemli ölçüde azalttığı (represe ettiği) tespit edilmiştir.

%0.5 oranındaki farklı metal iyonlarının enzim üretimi üzerindeki etkisi incelendiğinde %0.5 CaCl₂' in enzim üretimini kontrole göre yaklaşık 2 kat arttırırken, NaCl ve MnCl₂' nin üretimi represe ettiği tespit edilmiştir.

Farklı CaCl₂ konsantrasyonlarının enzim üretimi üzerindeki etkisi incelendiğinde besiyerine %0.5 oranında CaCl₂ eklenmesi kontrole göre enzim üretimini yaklaşık 2 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Kontrole karşılaştırıldığında en yüksek enzim aktivitesinin %0.5, en düşük aktivitenin ise %0 CaCl₂ konsantrasyonlarında elde edilmiştir.

Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yapılarak kısmi saflaştırılan enzimin aktivitesi üzerine bazı metaller, bazı metal şelatör ve kimyasal maddeler ve bazı deterjanların etkisi araştırılmıştır.

Enzim aktivitesi üzerine bazı metallerin etkisi incelendiğinde CaCl₂, MgCl₂ ve MnCl₂' nin enzim aktivitesinde artışa yol açarken, CuCl₂, ZnCl₂ ve HgCl₂' nin de enzim aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Bazı metal şelatör ve kimyasal maddelerin enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde PMSF aktivite üzerinde önemli bir değişikliğe yol açmazken metal şelatörleri olan EDTA ve 1,10-Phenantrolin' in enzim aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu durum enzimin bir metaloproteaz olduğunun göstergesidir.

Bazı deterjanların enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde Triton X-100 ve Tween 80 gibi nötral deterjanların enzim aktivitesinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. %1 SDS konsantrasyonunda enzim aktivitesinin tamamen ve ticari bir deterjan olan ALO' nun %0.5 ve %1 konsantrasyonunda aktivitenin inhibe olduğu tespit edilmiştir.

Kısmi saflaştırılan enzimin termostabilitesinin belirlenmesi için enzim aktivitesi 40-50°C sıcaklıkları ve 30-120 dk. arasındaki sürelerde incelenmiştir. Enzimin aktivitesini 40°C 120 dk. sonunda %101 oranında koruduğu, 45°C' de ise 120 dk. sonunda aktivitesini %77 oranında koruduğunu, 50°C' de ise 120 dk. sonunda aktivitesini %69 oranında kaybettiği tespit edilmiştir.

2mM CaCl₂' nin enzimin termostabilitesinin arttığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda *B.cereus* KG5' e ait proteaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi&diyaliz ve Sefadeks G-75 jel geçirgenlik kromatografisi ile %23 verimle 13 kat saflaştırılmıştır. Çalışmamızda Sephadex G-75 kolon kromatografisi ile saflaştırılan enzimin yaklaşık molekül ağırlığını belirlemek ve varlığını tespit etmek amacıyla sırasıyla SDS-PAGE ve %0.1 jelatin içeren non-denatüre poliakrilamid jel elektrofezi yapılmıştır.

SDS-PAGE analizi sonucu *B.cereus* KG5' e ait proteaz enziminin molekül ağırlığının yaklaşık 48 kDa civarında olabileceği tespit edilmiştir.

Sıcak su kaynaklarından izole edilen *Bacillus cereus* KG5' in sentezlediği ekstrasellüler proteaz enziminin tayin edilen optimum şartları (pH , sıcaklık, inhibisyon vs.) ve karakterizasyonu doğrultusunda endüstride kullanım potansiyelinin yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Enzimin pH 7' de aktif olması nötral bir proteaz olduğunun göstergesidir. Bu nedenle çalışılan enzimin nötral hidrofobik aminoasit bağlarını hidrolizleme işleminde ve gıda protein hidrolizatlarının acısını azaltmada kullanılıp kullanılmayacağı araştırılması gerekmektedir.

Enzim üretimini arttıran azot ve karbon kaynakları ve kalsiyumun tespitinin yanısıra maksimum enzim üretiminin 24 saat gibi kısa zamanda olması hem zaman hem de ekonomik açıdan avantajlı bir durumdur. Ayrıca enzimin 2 mM CaCl₂ varlığında 50°C' de aktif olması yüksek sıcaklık gerektiren endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir olduğu göstermektedir.

Sıcak su kaynaklarından izole edilen *Bacillus cereus* KG5' in sentezlediği ekstrasellüler proteaz enziminin tayin edilen optimum şartları (pH, sıcaklık, inhibisyon vs.) ve karakterizasyonu doğrultusunda endüstride kullanılma potansiyelinin yüksek olduğu tespit edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

Abdelnasser, S.S.I., Al-Salamah, A.A. 2009. Optimization of Media and Cultivation For Alkaline Protase Production by Alkaliphilic *Bacillus halodurans*. Research Journal of Microbiology, ISSN 1816-4935.

Abidi, F., Limam, F., Nejb, M.M. 2008. Production Of Alkaline Proteases By *Botrytis cinerea* Using Economic Raw Materials: Assay as Biodetergent. Process Biochemistry, 43: 1202–1208.

Adinarayana, K., Ellaiah, P., Prasas, D.S. 2003. Purification and Partial Characterization of thermostable Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE-11. a Publication of the American Association of Pharmaceutical Scientists, 4 (4): Article 56.

Almas, S., Hameed, A., Shelly, D., Mohan, P. 2009. Purification and Characterization of a Novel Protease from *Bacillus* Strain SAL1. African Journal of Biotechnology, 8(15): 3603-3609.

Alpan Gheorghiu, L. 2008. Bazı Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin Alkali Proteazlarının Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara, 65.

Anwar, A., Saleemuddin, M. 1998. Alkaline Proteases: A Review. Bioresource Tecnology, 64: 175-183.

Appak, S. 2006. Farklı Kaynaklardan İzole Edilen Ekstraselüler Enzim Üreten Stafilkokların Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 89.

Balkan, B. 2008. Katı Substrat Fermentasyonu ile Ham Nişastayı Parçalayan Yeni Bir Fungal Amilaz Üretimi Saflaştırılması ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 85.

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 Biochemistry, 35: 213-219.

Banik, R.M., Prakash, M. 2004. Laundry Detergent Compatibility of The Alkaline Protease from *Bacillus cereus*. Microbiological Research, 159: 135-140.

Başaga, H., Çetindamar D. 2000. Uluslararası Rekabet Stratejileri: Biyoteknoloji. TÜSİAD Rekabet Stratejileri Dizisi-7, Yayın No: TÜSİAD-T/2000-12/289. 31-56.

6. KAYNAKLAR

Beg Q.K., Shai, V., Gupta, R. 2003. Statistical Media Optimization and Alkaline Protease Production from *Bacillus mojavensis* in a Bioreactor. *Process Biochemistry*, 39: 203-209.

Beilen, J.B., Li, Z. 2002. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 338–344.

Çelik, N., 2006. *Bacillus clausii* GMBAE 42’den Saflaştırılan Alkalen Proteazın Termal İnaktivasyon Kinetiğinin Belirlenmesi ve Cu^{+2} İyonları İle Termostabilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi FenBilimleri Enstitüsü Kocaeli, 105.

Çırakoğlu, B. 1990. Biyoteknolojideki Gelişmelerin Sanayiye Uygulamaları ve Türkiye’deki Durumu. Erişim: [<http://arsiv.mmo.org.tr/pdf/10608.pdf>]. Erişim Tarihi:22.06.2011].

Demirjian, D.C., Moris-Varas, F., Cassidy, C.S. 2001. Enzymes From Extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5: 144–151.

Deng, A., Wu, J., Zhang, Y., Zhang, G., Wen, T. 2010. Purification and Characterization of a Surfactant-Stable High-Alkaline Protease From *Bacillus* sp. B001. *Bioresource Technology*, 101:7100–7106.

Devi, M.K., Banu, A.R., Gnanaprabhal, G.R., Pradeep, B.V., Palaniswamy, M. 2008. Purification, Characterization of Alkaline Protease Enzyme from Native İsolate *Aspergillus niger* and its Compatibility With Commercial Detergents. *Indian Journal of Science and Technology*,1(7).

Doddapaneni, K.K., Tatineni, R., Vellanki, R.N., Rachcha, S., Anabrolu, N., Narakuti V., Mangamoori L.N. 2009. Purification and Characterization of A Solvent And Detergent-Stable Novel Protease from *Bacillus cereus*. *Microbiological Research*, 164: 383-390.

Dodia, M.S., Rawal, C.M., Bhimani, H.G., Joshi, R.H., Khare, S.K., Singh, S.P. 2008. Purification And Stability Characteristics of an Alkaline Serine Protease From a Newly İsolated Haloalkaliphilic bacterium sp. AH-6. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35: 121-131.

Duran, K., Özdemir, D., Namlıgöz, S. 2007. İpek Liflerindeki Serisinin Enzimatik Olarak Uzaklaştırılması. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 3: 182-186.

Fadıloğlu, S., Erkmén, O. 2004. Gıda Sanayiinde Enzimlerin Önemi. *Gıda Dergisi*, 29(5): 393-400.

Frikha, B.G., Sellami-Kamoun, A., Fakhfakh, N., Haddar, A., Manni, L., Nasri, M. 2005. Production And Purification of a Calcium-Dependent Protease from *Bacillus cereus* BG1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 32: 186–194.

Gençkal, H. 2004. Studies On Alkaline Protease Production from *Bacillus* sp. Yüksek Lisans Tezi, İzmir Teknoloji Enstitüsü, Biyomühendislik ve Biyoteknoloji Bölümü, İzmir, 98.

Gençkal, H., Tari, C. 2006. Alkaline Protease Production from Alkalophilic *Bacillus* sp. Isolated From Natural Habitats. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 703–710.

Ghorbel, B., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M., Stability Studies of Protease From *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 513–518.

Ghosh, A., Chakrabarti, K., Chattopadhyay, D. 2008. Degradation of Raw Feather By A Novel High Molecular Weight Extracellular Protease from Newly Isolated *Bacillus cereus* DCUW. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35: 825–834.

Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P. 2002. Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 59: 15–32.

Gül Güven, R. 2007. Sıcak Su Kaynaklarından Bakteri İzolasyonu, Tanımlanması Ve *Alcyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmanni*'nin β -Galaktozidaz Enziminin Saflaştırılması. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 212.

Gül Güven, R. 2011. Termofilik Bakteriler Ve Biyoteknolojik Açından Önemli Bazı Enzimleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 9(1): 1-10.

Gözükara, M.E. 1997, *Biyokimya*, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara.

Haddar, A., Sellami-Kamoun, A., Fakhfakh-Zouari, N., Hmidet, N., Nasri, M. 2010. Characterization of Detergent Stable and Feather Degrading Serine Proteases from *Bacillus mojavensis* A21. *Biochemical Engineering Journal*, 51: 53–63.

Hmidet, N., Ali, N.E.H., Haddar, A., Kanoun, S., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M. 2009. Alkaline Proteases and Thermostable α -amylase Co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and Potential Application as Detergent Additive. *Biochemical Engineering Journal*, 47: 71–79.

Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products For Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4): 735-750.

Huang, Q., Peng, Y., Li, X., Wang, H., Zhang Y. 2003. Purification and Characterization of an Extracellular Alkaline Serine Protease with Dehairing Function from *Bacillus pumilus*. *Current Microbiology*, 46: 169–173.

Johnvesly, B., Naik, G.R. 2001. Studies On Production of Thermostable Alkaline Protease from Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 In a Chemically Defined Medium. *Process Biochemistry*, 37: 139–144.

6. KAYNAKLAR

Joshi, G.K., Kumar, S., Sharma, V. 2007. Production of Moderately Halotolerant, SDS Stable Alkaline Protease from *Bacillus cereus* MTCC 6840 İsolated From Lake Nainital, Uttaranchal State, India. Brazilian Journal of Microbiology, 38: 4.

Kalaylı, E., Beyatlı, Y. 2003. Bacillus Cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA 'ları. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi 1(12): 24-35.

Kalkan, S., Halkman, K. 2006. *Bacillus cereus* ve İçme Sütünde Oluşturduğu Sorunlar. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi 4(1): 1-11.

Karademir, A., Akgül, M., Tutuş, A. 2002. Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin Modifikasyonu, Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi, 5(1): 61-71.

Karmakar, S.R. 1999. Chemical Technology in The Pretreatment Process of Textiles. Elsevier Science B.V., 18-24, Hollanda.

Kazan, M. 2008. Zorunlu Alkalifilik *Bacillus marmariensis* GMBE 72 Soyundan İzole Edilen Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 253.

Kebabcı, Ö., Cihangir, N. 2011. Partial Purification of Protease by a Novel Bacterium, *Bacillus cereus* and Enzymatic Properties. Hacettepe Journal Biology & Chemistry, 39(1): 39–43.

Kıran Eren, Ö., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N. 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(1) 12-18.

Kim, S.S., Jae Kim, Y., Rhee, I.K. 2001. Purification and Characterization of a Novel Extracellular Protease from *Bacillus cereus* KCTC 3674. Archives of Microbiology, 17 : 458–461.

Kirk, O., Borchert, T.C., Fuglsang, C.C. 2002. Industrial enzyme applications. Current Opinion in Biotechnology, 13: 345–351.

Kumar, C.G., Tiwari, M.P., Jany, K.D. 1999. Novel Alkaline Serine Proteases from Alkalophilic *Bacillus* spp.: Purification and Some Properties. Process Biochemistry, 34: 441–449.

Kumar Vijay, E., Srijana, M., Kiran Kumar, K., Harikrishna, N., Reddy, G. 2011. A Novel Serine Alkaline Protease from *Bacillus altitudinis* GVC11 and Its Application as a Dehairing agent. Bioprocess and Biosystems Engineering, 34: 403–409.

Leighton, T.J., Doi, R.H., Warren, R.A.J., Kelln, R.A. 1973. The Relationship of Serine Protease Activity to RNA Polymerase Modification and Sporulation in *Bacillus subtilis*. Journal of Molecular Biology, 76, 103-22.

Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1977. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal Biology Chemical, 193:265.

Mabrouk, S.S., Hashem, A.M., El-Shayeb, N.M.A., Ismail, A.M.S., Abdel-Fattah, A.F. 1999. Optimization Of Alkaline Productivity By *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. Bioresource Technology, 69: 155-159.

Mehrotra, S., Pandey, P.K., Gaur, R., Darmwal, N.S. 1999. The Production of Alkaline Protease by a *Bacillus* Species Isolate. Bioresource Technology, 67: 201-203.

Motta, H., Punj, V. 1998. Isolation And Partial Characterization of A Thermostable Extracellular Protease of *Bacillus polymyxa* B-17. International Journal of Food Microbiology, 42: 139-145.

Nascimento, W.C.A., Martins, M.L.L. 2004. Production and Properties of an Extracellular Protease from Thermophilic *Bacillus* sp. Brazilian Journal of Microbiology, 35: 91-96.

Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., Antranikian, G. 1999. Extremophiles as a Source of Novel Enzymes for Industrial Application, Application Microbiology Biotechnology, 51: 711-729.

Nilegonkar, S.S., Zambare, V.P., Kanekar, P.P., Dhakephalkar, P.K., Sarnaik, S.S. 2007. Production and Partial Characterization of Dehairing Protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. Bioresource Technology, 98: 1238-1245.

Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., Saxena, R.K., Gupta, R. 2001. Characterization Wash Performance Analysis of an SDS-Stable Alkaline Protease from a *Bacillus* sp. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 17: 493-497.

Oh, Y.S., Shih, I.L., Tzeng, Y.M., Wang, S.L. 2000. Protease Produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and Its Application In The Deproteinization of Shrimp And Crab Shell Wastes. Enzyme and Microbial Technology, 27: 3-10.

Özçömlekçi, E. 2006. Proteaz Enziminin Glutaraldehit Kullanarak Kovalent Bağlanması İle İmmobilizasyonunda Optimum Şartların Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 85.

6. KAYNAKLAR

Özgen, Ö., Emirođlu, H., Yıldız, M., Taş, A.S., Puruđuođlu E. 2007. Tüketiciler Ve Modern Biyoteknoloji: Model Yaklaşımlar. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yayınları No:1, Ankara.

Ölmez Çakar, S., Özdemir, A.H. 2006. İrlanda Biyoteknoloji Çalışma Gezisi Raporu. Türkiye Teknoloji Geliştirme Vakfı.

Öztürk, S. 2007. Ülkemizden İzole Edilen *Bacillus licheniformis* BA17' den Elde Edilen Alkalen Proteaz Enziminin Safılaştırılması Ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 93.

Patel, R., Dodia M., Singh, S.P. 2005. Extracellular Alkaline Protease from a Newly Isolated Haloalkaliphilic *Bacillus* sp. : Production and Optimization. Process Biochemistry, 40: 3569–3575.

Rahman, R.N.Z.R.A., Basrı, M., Salleh, A.B. 2003. Thermostable Alkaline Protease From *Bacillus stearothermophilus* F1; Nutritional Factors Affecting Protease Production. Annals of Microbiology, 53: 199-210.

Rao , M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67(3): 597-635.

Rifaat, H.M., Hassanein, S.M., El-Said, O.H., Saleh, S.A., Selim. M.S.M. 2005. Purification and Characterization of Extracellular Neutral Protease From *Streptomyces microflavus*. Arab Journal Biotechnology, 9(1): 51-60.

Salleh, A.B., 2006. Protease:Introduction. Editörler: Salleh, A.B., Rahman, R.N.Z.R.A., Basrı, M. New Lipases and Proteases. Nova Bimedical, 23-39, New York.

Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs , G., Pandey, A. 2005. Comparative Evaluation of Neutral Protease Production by *Aspergillus oryzae* İn Submerged and Solid-State Fermentation. Process Biochemistry, 40: 2689–2694.

Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. 2004. Developments İn The Use of *Bacillus* Species For Industrial Production. Canadian Journal Of Microbiology. **50**: 1–17.

Secades, P., Alvarez, B., Gujarro, J.A. 2001. Purification and Characterization of a Psychrophilic, Calcium-Induced, Growth-Phase-Dependent Metalloprotease from The Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. Applied And Environmental Microbiology. 67(6): 2436–2444.

Setroyını, E., Takenaka, S., Murakami, S., Aoki, K. 2006. Purification and Characterization of Two Novel Halotolerant Extracellular Alkaline Proteases from *Bacillus subtilis* strain FP-133. Bioscience, Biotechnology And Biochemistry, 70(2): 433-440.

Sevinç, N. 2010. Türkiye Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* Suşlarından Proteaz Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, 116.

Shafee. N., Aris, S.N., Rahman, R.N.Z.R.A., Basri, M., Salleh, A.B. 2005. Optimization of Environmental and Nutritional Conditions for The Production of Alkaline Protease by a Newly Isolated Bacterium *Bacillus cereus* Strain 146. Journal of Applied Sciences Research, 1(1): 1-8.

Shah, K., Mody, K., Keshri, J., Jha, B. 2010. Purification and Characterization Of a Solvent, Detergent and Oxidizing Agent Tolerant Protease from *Bacillus cereus* İsolated from The Gulf of Khambhat. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,67: 85–91.

Shankar, S.,Rao, M.,Laxman R. S.2011. Purification and Characterization of an Alkaline Protease by a New Strain of *Beauveria* sp. Process Biochemistry, 46: 579–585.

Shivanand, P., Jayaraman, G. 2009. Production of Extracellular Protease From Halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 İsolated from Kumta Coast. Process Biochemistry, 44: 1088–1094 .

Shrinivas, P. K., 2008. Industrial Enzymes. Reference and Education: Science, Erişim: [<http://ezinearticles.com/?Industrial-Enzymes&id=890345>] Erişim Tarihi: 23.06.2011.

Sookkheo, B., Sinchaikul, S., Phutrakul, S., Chen, S.T. Purification and Characterization of the Highly Thermostable Proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. Protein Expression and Purification, 20: 142–151.

Sousa, F., Jus, S., Erbel, A., Kokol, V., Cavaco-Paulo, A., Gubitz, G.M. 2007. A Novel Metalloprotease From *Bacillus cereus* For Protein Fibre Processing. Enzyme and Microbial Technology, 40: 1772–1781.

Sundararajan, S., Kannan, C.N., Chittibabu1, S. 2011. Alkaline Protease from *Bacillus cereus* VITSN04: Potential Application as a Dehairing Agent. Journal of Bioscience and Bioengineering, 111(2): 128–133.

Şahin, T. 2003. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Biyoteknoloji. Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yunus Araştırma Bülteni, 3:1.

6. KAYNAKLAR

Telefoncu, A., Pazarlıoğlu, N. 1995. evre Koruma Faaliyetlerine Biyoteknolojinin Katkısı. evre Dergisi, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı. 39-43. Erişim:[<http://www.ekolojidergisi.com.tr/resimler/3-10.pdf>] Erişim tarihi:22.06.2011.

Towatana-Hutadilok, N., Pamupong, A., Suntınanalert, P. 1999. Purification and Characterization of An Extracellular Protease from Alkaliphilic and Thermophilic *Bacillus* sp. PS7 19. Journal of Bioscience and Bioengineering, 87(5): 581-587.

Uhlıg, H., 1998. Proteases. Wiley & Sons, J. Industrial Enzymes and Their Applications. 116-144, USA.

Vijayanand, S., Hemapriya, J., Selvin, J., Kiran, S. 2010. Production and Optimization of Haloalkaliphilic Protease by an Extremophile- *Halobacterium* Sp. Js1, Isolated From Thalassohaline Environment. Global Journal of Biotechnology & Biochemistry, 5 (1): 44-49.

Wang, S.L., Chao, C.H., Liang, T.W., Chen, C.C. 2009. Purification and Characterization of Protease and Chitinase from *Bacillus cereus* TKU006 and Conversion of Marine Wastes By These Enzymes. Journal of Marine Biotechnology,11: 334-344.

Wu, Y.Y., Wang, H.X., Ng, T.B. 2011. A Novel Metalloprotease from The Wild Basidiomycete Mushroom *Lepista nuda*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 21(3): 256–262.

Xu, J., Jiang, M., Sun, H., He, B. 2010. An Organic Solvent-Stable Protease from Organic Solvent-Tolerant *Bacillus cereus* WQ9-2: Purification, Biochemical Properties, and Potential Application in Peptide Synthesis. Bioresource Technology, 101: 7991–7994.

Yang, J.K., Shih, I.L., Tzeng, Y.M., Wang, S.L. 2000. Production and Purification of Protease from a *Bacillus subtilis* that Can Deproteinize Crustacean Wastes. Enzyme and Microbial Technology, 26: 406–413.

Yossan, S., Reungsang, A., Yasuda, M. 2006. Purification and Characterization of Alkaline Protease from *Bacillus megaterium* Isolated from Thai Fish Sauce Fermentation Process. ScienceAsia 32: 377-383.

Yücel, F. 2010. Hibridoma Teknolojisi. Erciyes Üniversitesi. Yayın No:180 Erişim: [<http://misoyasal.nku.edu.tr/admin/userfiles/biyoteknolojiyesildevrin3.pdf>]. Erişim tarihi:20.06.2011.

Zambare, V., Nilegaonkar, S., Kanekar, P. 2010. A Novel Extracellular Protease From *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: Enzyme Production and Its Partial Characterization. New Biotechnology, 00: 00.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nazenin AHMETOĞLU

Doğum Yeri: DİYARBAKIR

Doğum Tarihi: 12.02.1986

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Fatih Lisesi (Y.D.A.) (1999-2003)

Lisans : Yüzüncü Yıl Üniversitesi (2005-2009)

Yüksek Lisans : Dicle Üniversitesi (2009-2011)